

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS DE CÃES**

Vanessa Borges Costa Ferreira

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS DE CÃES**

Vanessa Borges Costa Ferreira

Orientador: Prof. Adj. Alexandre Lima de Andrade

Co-orientadora: Prof. Ass. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VANESSA BORGES COSTA FERREIRA – Natural de Uberlândia-MG, em 22 de março de 1984, filha de Washington Borges Costa e Maria Aparecida Ferreira Costa. Em 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) Prof. Haroldo Sampaio Ribeiro, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Participou de projetos de extensão universitária entre os anos de 2003 e 2006. Graduiu-se como Médica Veterinária em janeiro de 2008 e em fevereiro do mesmo ano ingressou no Programa de Residência Médico-Veterinária, área de Diagnóstico Veterinário (Patologia Clínica Veterinária) pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, concluído em janeiro 2010. Iniciou o Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal em março de 2010, área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, tornando-se bolsista CAPES em junho do mesmo ano.

“No meio da dificuldade, encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

Aos meus pais, **Washington e Maria**,
pois sem eles tudo seria mais difícil.

À professora **Suely**, minha “mãe”,
que tudo fez por mim.

AGRADECIMENTOS

A minha sincera gratidão...

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa e Vice-Diretor Prof. Dr. Max José de Araujo Faria Júnior, pela oportunidade da realização deste curso e pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, na pessoa de sua Coordenadora Professora Adjunto Juliana Regina Peiró e todo o corpo docente, pelo conhecimento transmitido com tanta dedicação e amor aos seus alunos. E aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, que tudo fazem para tirar nossas dúvidas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, que foi fundamental para minha permanência e dedicação exclusiva ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Adjunto Alexandre Lima de Andrade, que me acolheu como sua orientada quando mais precisei.

À Professora Ass. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim, minha querida co-orientadora, que sempre ficou ao meu lado em todas as situações, me dando forças, dividindo conhecimento, sendo uma verdadeira mãe, em todos os sentidos.

Ao Professor Adjunto Paulo César Ciarlini, meu ídolo, por ser sempre exigente comigo e me auxiliar nas correções da minha pesquisa.

Aos Professores Marcelo Vasconcelos Meireles e Valéria Marçal Félix de Lima, pela generosidade em ceder as instalações de seus laboratórios para a realização deste estudo.

À Professora Adjunto Valeria Nobre Leal de Souza Oliva, pela gentileza em ceder os cães do Projeto Cão Cidadão para a execução deste projeto.

À minha amiga e irmã, a residente Renata Nogueira Figueiredo, pela dedicação, amizade e força que me foi oferecida, sem pedir qualquer tipo de retribuição! Um ombro amigo para desabafar, apoiar e auxiliar na caminhada! Foram muitos dias de contagens de plaquetas juntas... Muito obrigada pela amizade verdadeira... e pela plaquetometria realizada!

Ao meu estimável irmão, o mestrando Breno Fernando Martins de Almeida, que me ajudou da forma mais simples e bela. Você estará sempre no meu coração! Obrigada pelo empenho na realização da análise estatística desta pesquisa!

À residente Sheila Nogueira, pela disposição em colher as amostras de sangue dos cães! Seu auxílio foi imprescindível!

À técnica Jucilene Conceição de Souza, pela solução de citrato de sódio preparada, pelas pipetas de Thoma lavadas, e pelo grande coração em me ajudar sempre que possível! E claro, pelo café fresquinho todos os dias!

Aos amigos Luis Gustavo Narciso (reprodutibilidade de protocolo inigualável!) e Monally Conceição Costa de Aquino, que me acolheram, me deram carinho, atenção e força para continuar. Obrigada pela lealdade, que Deus os abençoe!

Aos residentes do Laboratório Clínico Veterinário, Thaísa Apetito Tosta (Thata) e Acácio José Lustosa Mendes (Bebê), e à eterna estagiária Gabriela Siqueira (minha Bibi!), pela colaboração e amizade durante a execução deste projeto. Uma linda amizade começou!!!

Às amigas: Mariana Macedo (minha flor), Priscila Dalmagro (eterna caloura), Juliane Teramachi (Neusa), Anaiza Simão Zucatto (pequeninha chata!), Eveline Tozzi (companheira) e Priscila Preve (dengo) pelos conselhos e carinho oferecidos durante a jornada. Amo vocês!

Às doutorandas Natália Campos e Natália Pola, e à mestranda Carolina Santinoni, do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, pelos momentos vividos, conhecimento dividido e ajuda oferecida. Laços “plaquetários” nos unem!!!!

À técnica Juliana Perosso Borges e ao doutorando Alex Nakamura, por me auxiliarem no uso das centrífugas. Sem vocês estaria perdida!

À funcionária Beatriz Helena, por me servir de exemplo profissional e por me ensinar a trabalhar com empenho e dedicação! Muito obrigada por participar da minha formação!

Aos funcionários Esaú Medeiros e Clédio Fiorentini, que por vezes me auxiliaram na contenção dos animais. Obrigada pela imensa ajuda! A boa vontade de vocês sempre será lembrada!

Aos colegas de mestrado, funcionários e residentes do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, pelo trabalho encorajado, pelo bom dia compartilhado e pelos sorrisos trocados!

Aos proprietários dos animais utilizados neste estudo, por cederem seus melhores amigos para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos cãezinhos, sempre tão dóceis, que doaram seu sangue para a execução deste trabalho!

E a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram nessa caminhada.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.	i
ABSTRACT.	ii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.	11
1 REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1 Plaquetas.	13
1.2 Fatores de crescimento.	14
1.3 Plasma rico em plaquetas.	20
REFERÊNCIAS	26
 CAPÍTULO 2 – COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS.	 33
RESUMO.	33
1 INTRODUÇÃO.	34
2 MATERIAL E MÉTODO	37
2.1 Local de realização da pesquisa.	37
2.2 Animais.	37
2.3 Colheita e acondicionamento de amostras.	37
2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).	39
2.5 Plaquetometria.	39
2.6 Reprodutibilidade.	39
2.7 Análise estatística.	39
3 RESULTADOS.	40
4 DISCUSSÃO	43
5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.	46

PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE CÃES

RESUMO – Biotécnicas como o plasma rico em plaquetas (PRP) vêm sendo amplamente utilizadas na reparação e regeneração teciduais, objetivando acelerar a cicatrização de feridas. O potencial do PRP para diminuir o tempo de recuperação dos traumas depende da concentração plaquetária, de sua função, e de seus fatores de crescimento. A escassez de protocolos para obtenção do PRP em cães, aliada às variações dos mesmos, dificulta o emprego desta biotécnica. O objetivo deste estudo foi testar três diferentes protocolos para obtenção do PRP e verificar sua eficácia na espécie canina. Foram colhidos 15 mL de sangue de 20 cães saudáveis, sendo as amostras submetidas aos protocolos para obtenção do PRP segundo Anitua, Sonnentag e Vendramin. As concentrações médias de plaquetas proporcionadas por cada protocolo foram de 247%, 351% e 439%, respectivamente. O protocolo de Vendramin se sobressaiu em relação aos demais, com melhor concentração plaquetária no PRP, e apresentou boa reprodutibilidade.

PALAVRAS-CHAVE – Biotecnologia, canino, centrifugação, cicatrização.

PROTOCOL FOR OBTAINING THE PLATELET-RICH PLASMA OF DOGS

ABSTRACT – Biotechnology as the platelet-rich plasma (PRP) have been widely used in tissue repair, aiming to accelerate the healing of wounds. The potential of PRP to reduce the recovery time of injuries depends on the concentration of platelets, its function and their growth factors. The lack of protocols for obtaining PRP in dogs, combined with variations of the same, hinders the use of biotech. The aim of this study was to test three different protocols for obtaining PRP and verify effectiveness in dogs. 15 mL were collected blood of 20 healthy dogs, and the samples were subjected to protocols to obtain PRP second Anitua, Sonnentag and Vendramin. The mean concentrations of each protocol provided by platelets were 247%, 351% and 439% respectively. The protocol Vendramin stood in relation to other, better platelet count in PRP, and has good reproducibility.

KEYWORDS – Biotechnology, canine, centrifugation, wound healing.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A engenharia tecidual tem proporcionado grandes resultados na reparação e regeneração tecidual em pacientes que necessitam de um menor tempo de recuperação. O uso da biotécnica do plasma rico em plaquetas (PRP) vem aumentando gradativamente, e seus resultados tem surtido efeito clínico satisfatório, tanto em seres humanos como em animais.

O PRP é um concentrado autólogo de plaquetas, com valores no mínimo três vezes acima do encontrado no sangue periférico. Por utilizar o sangue do próprio paciente, o PRP não transmite doenças, assim como não provoca rejeições por parte do receptor.

Como não há um protocolo que seja padronizado para a obtenção do PRP, cabe ao pesquisador ou ao clínico definir o método mais eficaz para alcançar o seu objetivo. Há diversas técnicas descritas na literatura, em que a quantidade de sangue pode ser o motivo da escolha de determinado protocolo. Há métodos que utilizam grandes volumes de sangue (bolsas de sangue) e necessitam de equipamentos e pessoal especializados para o processamento das amostras, sendo uma técnica muito onerosa. A utilização de pequeno volume de sangue e a técnica de tubos para a obtenção do PRP, além de ser mais simples e de baixo custo, pode ser realizada em clínicas e ambulatórios, com o uso de centrífugas refrigeradas comuns.

Na medicina veterinária, para a obtenção do PRP vêm sendo testados tempo e forças de centrifugação nas amostras de sangue de cães, de outros animais domésticos e de laboratório, em busca da melhor concentração de plaquetas, como também de seu conteúdo, os fatores de crescimento. As rotações são estudadas visando aumentar a quantidade de plaquetas, íntegras. A ativação prematura levaria à liberação dos fatores de crescimento de forma não bioativa, resultando em um PRP com baixo poder de cicatrização.

Em cães, o PRP é aplicado principalmente na reparação de falhas ósseas, almejando a diminuição do tempo de cicatrização e recuperação. Sua aplicabilidade pode ser estendida a cicatrização de tecidos moles, feridas cirúrgicas e queimaduras, como realizado em seres humanos.

Diante do crescente interesse na aplicação do PRP na regeneração e reparação tecidual, tanto em humanos como em animais, e da variedade de protocolos encontrados na literatura, nosso estudo objetivou testar a capacidade de três protocolos para obtenção do PRP em humanos, de única e de dupla centrifugação, em concentrar as plaquetas do sangue de cães.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos do citoplasma dos megacariócitos, em forma de discos, anucleadas, com uma membrana trilaminar fosfolipoprotéica (EVERTS et al., 2006; JAIN, 1993). Possuem um anel de microtúbulos contráteis ao redor de sua periferia, que contem actina e miosina, compondo seu citoesqueleto. O citoplasma é claro, com poucas organelas citoplasmáticas e grânulos vermelho-púrpura conhecidos como grânulos densos e α -grânulos. Os grânulos densos contem ADP, ATP, serotonina e cálcio, enquanto que os α -grânulos possuem fatores de coagulação, fatores de crescimento e outras proteínas (EVERTS et al., 2006; MEHTA; WATSON, 2008; YARDUMIAN et al., 1986).

A principal função das plaquetas está ligada a hemostasia e a cicatrização (EVERTS et al., 2006). São responsáveis por cessar temporariamente o fluxo sanguíneo após lesão vascular, mantendo a hemostasia. Quando há lesão, rapidamente aderem-se ao colágeno exposto e desencadeiam uma série de reações até reparar o dano sofrido no leito vascular (BAKER, 2007). Depois de ativadas, as plaquetas podem mudar sua forma de disco, projetando pseudópodes, levando à agregação plaquetária e posterior liberação de seu conteúdo através do sistema canalicular aberto (BAKER, 2007; EVERTS et al., 2006; YARDUMIAN et al., 1986).

As plaquetas podem ser ativadas de três formas. A primeira via de ativação está relacionada à presença de ácido araquidônico e seu metabolismo. Ao ser convertido em tromboxano A_2 (TXA₂), as plaquetas desencadeiam a vasoconstrição local e iniciam a liberação de seus grânulos, agregando mais plaquetas (EVERTS et al., 2006; YARDUMIAN et al., 1986). A segunda via de ativação inclui os ativadores plaquetários, como a trombina e o colágeno, que podem elevar rapidamente a quantidade de cálcio livre, levando a liberação dos grânulos das plaquetas, independente da via do ácido

araquidônico. A terceira forma de ativação depende da liberação do fator ativador de plaquetas (PAF), localizado na membrana fosfolipídica plaquetária (EVERTS et al., 2006; YARDUMIAN et al., 1986).

Os grânulos liberados pelas plaquetas contêm diversas substâncias, entre elas os fatores de crescimento (EVERTS et al., 2006; MEHTA; WATSON, 2008; YARDUMIAN et al., 1986). Eles são responsáveis por diversos eventos ligados à cicatrização tecidual, estimulando as atividades celulares, diminuindo o tempo de reparo local (LENHARO et al., 2004).

1.2 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento (FC) são proteínas que atuam como agentes sinalizadores para as células (LIEBERMAN et al., 2002) e estão presentes em diferentes tecidos. Seus efeitos são conhecidos por serem multifacetados, podendo se manifestar como: efeito quimiotático (início da migração direta), mitogênico (estimulação da divisão celular), morfogênico (indução de diferenciação celular), apoptótico (início da morte celular programada), metabólico (modulação da atividade metabólica), e a combinação de vários dos efeitos mencionados anteriormente (CHEN et al., 2010).

Os FC também desempenham um papel crucial na transferência de informações entre diferentes populações de células e seu microambiente, a matriz extracelular, e durante todo o processo de cicatrização de feridas, morfogênese e regeneração tecidual. Sua ação dependerá da concentração e ou tempo de exposição sobre as células alvo (CHEN et al., 2010). Três tipos de ação são possíveis: (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 influencia uma célula vizinha que tenha fenótipo diferente da célula de origem; e (3) endócrina, na qual o fator de crescimento influencia uma célula com fenótipo diferente da célula de origem e que se encontra em um local anatômico remoto (LIEBERMAN et al., 2002).

A ação dos FC inicia pela ligação a receptores transmembrana específicos na superfície das células alvo, portanto, o nível de expressão desses receptores parcialmente determina a sensibilidade das células. Assim, os FC controlam a função celular através de interações físicas diretas com os receptores extracelulares, modulando diversos aspectos da biologia e função celular (CHEN et al., 2010).

Vários tipos de células podem produzir um mesmo fator de crescimento e este pode agir em muitos tipos de células com o mesmo efeito. Os FC liberados em uma lesão tecidual são considerados necessários para o processo de cicatrização de feridas e podem ser a chave para a reparação e/ou regeneração tecidual (CHEN et al., 2010).

São vários os fatores de crescimento existentes, mas os envolvidos na reparação e regeneração tecidual incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a família do fator de crescimento transformador β (TGF- β), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (BARRIENTOS et al., 2008; CHEN et al., 2010; EVERTS et al., 2006; RIEDEL et al., 2006).

Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O PDGF foi um dos primeiros fatores de crescimento a ser identificado. É uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 30 kD, e possui duas cadeias polipeptídicas, A e B, apresentando três isoformas, PDGF-AA, PDGF-BB, e PDGF-AB (BARRIENTOS et al., 2008; MARX et al., 1998; PEREIRA et al., 2004; ROSS, 1987). Em geral o PDGF-BB é mais mitogênico que o PDGF-AB e este por sua vez, têm essa ação mais marcada que o PDGF-AA. As plaquetas e o soro são ricos em PDGF-AB e -BB, enquanto os tecidos periféricos (esqueléticos e não esqueléticos) contêm principalmente PDGF-AA (CANALIS et al., 1991). O PDGF não é apenas encontrado nos α -grânulos das plaquetas como também é sintetizado e secretado por

macrófagos, células do endotélio vascular, fibroblastos e queratinócitos (EVERTS et al., 2006; RIEDEL et al., 2006).

O PDGF é o principal fator de crescimento das plaquetas, devido ser o primeiro a estar presente no tecido lesado e guiar a revascularização, a síntese de colágeno e a neoformação óssea, sendo encontrado em todas as fases de reparação tecidual (EVERTS et al., 2006). O PDGF é um importante mitógeno das células mesenquimais derivadas do tecido conjuntivo. Também é um excelente quimiotático, induzindo as células suscetíveis a migrarem para um gradiente de concentração de PDGF (ROSS, 1987).

Uma série de eventos intracelulares ocorre após exposição ao PDGF, podendo ser imediata ou após algumas horas. Os dois mais importantes são a autofosforilação do receptor PDGF e o aumento de volume dos fosfolipídeos de membrana. A fosforilação de tirosina tem sido associada com aumento da mitogênese, em alguns casos, a autofosforilação do receptor PDGF pode ser um componente importante no mecanismo de sinalização que induz a novas mudanças dentro da célula que conduzem a uma síntese de DNA. Já o aumento de volume dos fosfolipídios de membrana pode levar a formação de diglicerídeo intracelular com a sua subsequente quebra para formar o ácido araquidônico livre, monoglicerídeo e ácido fosfatídico. A formação de diglicerídeos pode desempenhar um papel no estímulo de ativação de C-kinase, que pode levar à mobilização de cálcio, também considerada importante na indução da síntese de DNA e proliferação celular (ROSS, 1987).

Assim, as funções mais específicas do PDGF incluem a mitogênese, angiogênese e ativação de macrófagos (EVERTS et al., 2006; MARX et al., 1998). Outros efeitos celulares desencadeados por sua ação são aumento da síntese de colesterol, prostaglandinas, RNA e proteínas, como também é um excelente vasoconstritor (ROSS, 1987). Atua modulando a ação de outros fatores de crescimento, como por exemplo, induzindo a produção e secreção pelos macrófagos do fator de crescimento transformador β (TGF- β), e

estimulando a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na indução da angiogênese (BARRIENTOS et al., 2008).

Já a hiperatividade deste fator de crescimento está associada com múltiplas desordens, incluindo aterosclerose e fibrose de vários órgãos. Esta hiperatividade é vista em diferentes tipos de tumores em humanos, como tumores do sistema gastrointestinal e do sistema nervoso central (ALVAREZ et al., 2006).

PDGF está, portanto, envolvido no recrutamento de células em todas as fases da cicatrização, reparação tecidual: o estímulo das células epiteliais e endoteliais, formação da matriz e modulação das atividades de outros fatores de crescimento (RIEDEL et al., 2006).

Fator de crescimento transformador β (TGF- β)

TGF- β é o nome dado ao grupo de proteínas com peso molecular de aproximadamente 25 kD (EVERTS et al., 2006; MARX et al., 1998). A família do fator de crescimento transformador β é constituída por mediadores locais que regulam a proliferação e as funções da maioria das células dos vertebrados (PEREIRA et al., 2004). Nesta família estão incluídas as cinco isoformas do TGF- β (TGF- β 1 a TGF- β 5), as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), fatores de crescimento de diferenciação (GDFs), ativinas, inibinas, e substância Mülleriana (LIEBERMAN et al., 2002; MARX et al., 1998). As isoformas do TGF- β mais encontradas nos mamíferos são TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, sendo as isoformas TGF- β 1 e β 2 predominantes na cicatrização de feridas cutâneas (BARRIENTOS et al., 2008), como também na reparação do tecido conjuntivo e regeneração óssea (EVERTS et al., 2006).

O TGF- β é liberado pela degranulação das plaquetas, ativação de macrófagos, fibroblastos e queratinócitos no sítio da injúria (RIEDEL et al., 2006). É predominantemente produzido pelas plaquetas, cerca de 95% do total.

TGF- β possui efeito inibitório no crescimento de células de vários tecidos, exceto nas células tronco mesenquimais, onde a proliferação é maior (EVERTS et al., 2006).

As principais funções do TGF- β estão relacionadas com a resposta inflamatória, angiogênese, reepitelização, deposição e remodelação da matriz extracelular pela promoção da síntese de colágeno e proteoglicanos, enquanto inibe a ação da atividade de proteases (BARRIENTOS et al., 2008; RIEDEL et al., 2006), dessa forma, é um importante agente na reparação tecidual e merece atenção.

O TGF- β 1 é amplamente estudado em relação aos demais da família. Além das funções gerais, ele desempenha papel importante no recrutamento adicional de células inflamatórias, aumentando o debridamento dos tecidos pelos macrófagos. Uma vez estéril o local da injúria, o TGF- β 1 é capaz de desativar o superóxido dos macrófagos, protegendo o tecido saudável circunvizinho, preparando para a formação do tecido de granulação, aumentando a expressão de genes associados com a formação da matriz extracelular. Também está envolvido na regulação do VEGF, contração de feridas, proliferação de queratinócitos, produção de colágeno como também é um grande inibidor das metaloproteinases (BARRIENTOS et al., 2008). Semelhante ao PDGF, nem sempre a ação do TGF- β 1 é benéfica, pois depende da quantidade em que é liberado, como também do tempo de exposição ao tecido alvo, podendo resultar em patologias (ALVAREZ et al., 2006).

O TGF- β 2 também está envolvido em todas as fases da cicatrização, como no recrutamento de células inflamatórias e fibroblastos para o local da ferida. Atua na formação do tecido de granulação estimulando a angiogênese, e na deposição e remodelação da matriz aumentando os níveis de proteína, DNA, e produção de colágeno (BARRIENTOS et al., 2008).

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Os membros da família VEGF incluem VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fator de crescimento da placenta. A produção de VEGF é muito influenciada pelas condições do tecido local, incluindo hipóxia e produção de óxido nítrico. No geral, o VEGF provoca aumento da permeabilidade vascular e deposição de uma matriz proangiogênica, bem como a formação de vasos sanguíneos (RIEDEL et al., 2006).

O VEGF é produzido pelas células do endotélio vascular, queratinócitos, células da musculatura lisa, fibroblastos, plaquetas, neutrófilos e macrófagos. Liga-se aos receptores de tirosina quinase localizados principalmente nas células do endotélio dos vasos sanguíneos (BARRIENTOS et al., 2008).

VEGF-A é importante na cicatrização de feridas, pois promove os eventos iniciais da angiogênese, em particular a migração e proliferação de células endoteliais. Resultante da angiogênese, a perfusão tecidual é restaurada, restabelece-se a microcirculação e aumenta a tensão de oxigênio no local da ferida. Em particular, a hipóxia aumenta a expressão do VEGF-A nos monócitos, fibroblastos, queratinócitos, miócitos, e células endoteliais. Seus efeitos aparecem principalmente em casos agudos, pois sua produção e secreção estão elevadas nestas situações, sendo liberado quando há ativação das plaquetas e quando há ação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) atuando nos queratinócitos e fibroblastos (BARRIENTOS et al., 2008).

Fator de crescimento epidérmico (EGF)

Este é um dos fatores de crescimento mais relacionados à cicatrização de feridas cutâneas. O EGF é secretado pelas plaquetas, macrófagos e fibroblastos e atua de forma parácrina sobre os queratinócitos (BARRIENTOS et al., 2008). Ele interage com o receptor de EGF das células da epiderme e

fibroblastos. Além disso, o EGF estimula a secreção de collagenase pelos fibroblastos e, portanto, é importante na remodelação do tecido (RIEDEL et al., 2006). Atua ainda na angiogênese, tornando a cicatrização mais rápida e eficiente (VENDRAMIN et al., 2006).

1.3 Plasma rico em plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas tem sido considerado uma grande ferramenta na aceleração da cicatrização óssea e de tecidos moles. É uma biotécnica relativamente nova e faz parte do crescente interesse em engenharia tecidual e celular nas terapias de hoje. Trata-se de um pequeno volume de plasma autólogo, com uma concentração de plaquetas acima do valor inicial (CHEN et al., 2010; LANDESBURG et al., 2000; MARX et al., 2001; PALLUA et al., 2010; WANG; AVILA, 2007).

Por ser desenvolvido a partir do sangue autólogo, o PRP é seguro por não transmitir doenças infecto-contagiosas e não desencadear rejeições por parte do organismo receptor (MARX et al., 2001; OBARRIO et al., 2000). Devido seu aumento na concentração de plaquetas, há também aumento nos níveis dos fatores de crescimento. Os principais FC encontrados no PRP são: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (; LANDESBURG et al., 2000; MARLOVITS et al., 2004; MARX et al., 1998; MARX et al., 2001; PALLUA et al., 2010).

As principais funções das plaquetas envolvem ações na hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização. Isso se deve aos FC presentes em seus α -grânulos, que quando liberados, são capazes de estimular uma série de tipos celulares a iniciar a reparação tecidual, conduzindo a angiogênese, ao crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, com o aumento da produção de colágeno. Dessa forma, o PRP promove uma maior integração de

enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou gordurosos (MARX, 2004).

Para a obtenção do PRP vários protocolos têm sido testados, principalmente aqueles que visam o preparo fácil com baixo custo para utilização em ambulatorios e consultórios. O sangue, após uma cuidadosa colheita, é submetido a uma branda centrifugação obtendo-se níveis de precipitado: a série vermelha, sobre esta a série branca e, acima, o plasma. É colhido o plasma e a série branca, obtendo-se o PRP (LENHARO et al., 2004). Alguns autores preconizam protocolos mais simples, com apenas uma centrifugação (ANITUA et al., 1999), outros afirmam que a dupla centrifugação concentra mais as plaquetas e, por isso, o PRP obtido é mais eficaz (MARX et al., 2001).

Os benefícios da aplicação do PRP são descritos na odontologia, sendo empregado em pequenos enxertos ósseos, cirurgias maxilo-faciais e periodontais (DUGRILLON et al., 2002; KECALI et al., 2008; MARX et al., 1998; MARX et al., 2004; WHITMAN et al., 1997). Há tentativas por parte da medicina na recuperação de queimaduras extensas (PALLUA et al., 2010), com mais estudos sendo necessários; resultados promissores por parte da cirurgia plástica, com maior integralização de enxertos adiposos (ALMEIDA et al., 2008), como também na cicatrização de injúrias musculares e de tendões (MISHRA et al., 2009b). Ainda é utilizado como arcabouço tridimensional para cultura celular, no suporte ao crescimento das células e difusão dos nutrientes, principalmente em cultura de tecido cartilaginoso (MOROZ et al., 2008; MISHRA et al., 2009a).

Na medicina veterinária, o uso do PRP em ortopedia é crescente. Lesões musculoesqueléticas em cavalos atletas é motivo de preocupação por parte dos veterinários, que buscam um menor tempo de recuperação. As lesões em ligamentos e tendões de equinos, que geralmente necessitam de longos períodos para total cicatrização e recuperação, tem sido tratadas com

PRP, com resultados animadores (RINDERMAN et al., 2010; TORRICELLI et al., 2011). DeRossi et al. (2009) testaram o protocolo proposto por Vendramin et al. (2006) para verificar os efeitos do PRP na cicatrização de feridas cirúrgicas na pele de cavalos. Como resultados, a reparação tecidual das feridas tratadas com PRP foram 4 vezes mais rápidas, com uma aceleração na diferenciação epitelial e na organização do colágeno da derme, quando comparadas ao Grupo controle.

Em cães, a aplicação do PRP em fraturas de ossos longos também tem gerado boas respostas na cicatrização, tanto associado a enxertos (BARBOSA et al., 2008), como isoladamente (SOUZA et al., 2011). Há estudos em andamento que visam o uso do PRP em úlceras de córnea em cães, para estimular a migração e divisão das células mesenquimais, aumentando a matriz celular e o colágeno, como ocorre em humanos (BV – CDI FAPESP, 2011).

O PRP é resultado da modificação do uso da cola de fibrina e dos concentrados de plaquetas (WHITMAN et al., 1997). Ao observar a capacidade do coágulo natural e buscando o sucesso da regeneração, Whitman et al. (1997) propuseram o uso da cola de fibrina associada aos fatores de crescimento no tratamento de defeitos ósseos maxilo-faciais em humanos, originando assim o PRP. A técnica desenvolvida envolve a coleta pré-operatória de sangue do paciente, em bolsa de coleta (450 mL) contendo o anticoagulante citrato-fosfato-dextrose. O sangue é centrifugado inicialmente a 5600 rpm (rotações por minuto) para uma separação do plasma pobre em plaquetas (PPP) dos eritrócitos e do *buffy coat*, que contém plaquetas e leucócitos. Após, uma redução da velocidade (2400 rpm) da centrífuga leva a uma melhor separação do *buffy coat* das células vermelhas. A contagem de plaquetas obtida com esta técnica fica em torno de 500.000 a 1.000.000/ μ L. O uso de centrífugas próprias para bolsas de coleta e profissionais especializados torna o protocolo dispendioso.

Em 1998, Marx et al. também realizaram testes com o PRP, evidenciando os reais benefícios na reparação óssea, em defeitos mandibulares, com a presença de grandes quantidades dos fatores de crescimento PDGF e TGF- β . Foi estipulada uma concentração mínima de plaquetas para que o PRP apresentasse resultados clínicos favoráveis, concentrando as plaquetas em 338% acima do valor basal. A técnica utilizada para a obtenção do PRP foi a mesma descrita por Whitman et al. (1997).

Com o sucesso dos estudos de Marx et al. (1998), o PRP destacou-se na odontologia, sendo uma biotecnologia de regeneração tecidual de forma natural e segura. Mesmo com os resultados promissores, a técnica empregada, além de utilizar equipamentos de alto custo, eram necessários grandes volumes de sangue. Em 1999, Anitua propôs um protocolo simplificado de obtenção, utilizando pequenos volumes de sangue colhidos em tubos citratados (5mL), submetendo as amostras a uma única centrifugação (160G/ 6 minutos). A produção do PRP tornou-se mais simples e barata, podendo ser realizada em ambulatórios.

Após a proposta do protocolo simplificado, surgiram outros métodos de obtenção. Sonnleitner et al. (2000) e Landersberg et al. (2000) propuseram protocolos de dupla centrifugação, que, segundo eles, maximizam a concentração de plaquetas além da observada pelo protocolo sugerido por Anitua et al. (1999).

Ao buscar um protocolo barato e eficiente no preparo do PRP para uso em cirurgia plástica, Vendramin et al. (2006) realizaram vários testes de centrifugação do sangue, variando a força e o tempo de centrifugação. Os autores concluíram que a dupla centrifugação, a 300G por 10 minutos e 640G por 10 minutos, proporcionou concentrações plaquetárias superiores a 450% do valor inicial das amostras.

Vários outros protocolos foram propostos, e os detalhes técnicos para a obtenção do PRP foram aperfeiçoando com o tempo. O modelo da centrífuga,

a velocidade empregada, o anticoagulante utilizado na colheita de sangue, a concentração de plaquetas existente e os tipos de fatores de crescimento encontrados, são determinantes na produção de um PRP com qualidade e com efeito biológico satisfatório (EFEOGLU et al., 2004).

Alguns protocolos foram criados e testados na espécie canina. Ferraz et al. (2007) testaram três forças de centrifugação, em que as amostras de sangue dos cães foram submetidas a uma centrifugação inicial a 800 rpm durante 10 minutos. Após a separação do plasma das células vermelhas, as amostras foram centrifugadas novamente, nas seguintes rotações testadas: 1300 rpm, 1600 rpm e 3200 rpm. Como resultado, a rotação a 1600 rpm proporcionou uma melhor concentração plaquetária (210%), com menor dano à integridade das plaquetas.

Barbosa et al. (2008) propuseram um protocolo para obtenção do PRP em cães, como também apresentaram sua aplicação clínica. A técnica consistia em submeter o sangue a duas centrifugações, ambas a 1300 rpm por 8 minutos. Após a geleificação do PRP, foi realizada a aplicação do gel do PRP em falhas ósseas, sob quatro tratamentos – falha 1 (controle – sem tratamento), falha 2 (enxerto ósseo esponjoso), falha 3 (enxerto ósseo autólogo + PRP) e falha 4 (gel do PRP). O tratamento da falha 3 apresentou melhor preenchimento ósseo, com recuperação mais precoce que as demais, demonstrando resultados promissores. O PRP obtido com este protocolo concentrou as plaquetas em aproximadamente 620%.

Souza et al. (2011) avaliaram a cicatrização óssea de fraturas do rádio de cães, tratadas ou não com o PRP autólogo. O protocolo utilizado foi o proposto por Sonnleitner et al. (2000), técnica idealizada em humanos, de dupla centrifugação. Na primeira rotação, as amostras foram centrifugadas a 160G por 20 minutos. Após a separação do plasma das células vermelhas, foi realizada uma segunda centrifugação, a 400G durante 15 minutos. Em média, esta técnica concentrou em 550% as plaquetas em relação ao valor inicial. Os

animais foram divididos em grupos controle e tratados com gel do PRP. No grupo tratado com PRP, a cicatrização óssea foi precoce em relação ao grupo não tratado, sendo indicado como terapia adjuvante.

Outro grupo de pesquisadores testou dois protocolos na espécie canina. O primeiro método testado consistia de uma única centrifugação das amostras de sangue, a 1200 rpm por 10 minutos. No segundo método, de dupla centrifugação, o sangue foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos, e após a separação das células do plasma, uma segunda centrifugação a 1600 rpm por 10 minutos foi realizada. Após análise, a técnica de dupla centrifugação foi eleita a melhor na obtenção do PRP em cães neste estudo, com uma concentração de plaquetas média de aproximadamente 550% (ALEIXO et al., 2011).

Ao depararmos com vários métodos e com a necessidade de uma técnica que fosse eficaz no preparo do PRP na espécie canina, testamos alguns protocolos encontrados na literatura, de única e dupla centrifugação, verificando sua capacidade em concentrar as plaquetas, sem danificá-las. Optamos por testar os protocolos pioneiros na obtenção do PRP em humanos, verificando sua eficácia na espécie canina.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, G. A. S.; COELHO, M. C. O. C.; TEIXEIRA, M. N. et al. Comparação entre dois métodos para obtenção do plasma rico em plaquetas, em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 3, p. 567-573, 2011.

ALMEIDA, A. R. H.; MENEZES, J. A.; ARAÚJO, G. K. M. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 23, n. 2, p. 82-88, 2008.

ALVAREZ, R. H.; KANTARJIAN, H. M.; CORTES, J. E. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. **Mayo Clin. Proc.**, v. 81, n. 9, p. 1241-1257, 2006.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 14, p. 529-535, 1999.

BAKER, D. C. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 172-173.

BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C. et al. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciênc. Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, ago, 2008.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Rep. Reg.**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BV – CDI FAPESP. Biblioteca Virtual Centro de Documentação e Informação da Fapesp. **Uso do plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães**. 2011. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/115446/uso-plasma-rico-plaquetas-ulceras/>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

CANALIS, E.; MCCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. **Annu Rev. Med.**, v. 42, p. 17-24, 1991.

CHEN, F.-M.; ZHANG, M.; WU, Z.-F. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 24, p. 6279-6308, 2010.

DeROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cir. Bras.**, v. 24, n. 4, p. 276-281, 2009.

DUGRILLON, A.; EICHLER, H. KERN, S. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **Int. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31, n. 6, p. 615-619, 2002.

EFEUGLU, C.; YASEMIN, D. A.; SELDA, E. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, 2004.

EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Am. Soc. Extra-Corporeal Technol.**, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006.

FERRAZ, V. C. M.; FERRIGNO, C. R. A.; SHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.

JAIN, N. C. The platelets. In: JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 1. ed. Malvern, Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. p 105-132.

KECELI, H. G.; SENGUN, D.; BERBEROGLU, A. et al. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: a randomized-controlled trial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 3, p. 255-262, 2008.

LANDESBURG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, n. 3, p. 297-300, 2000.

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

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

MARLOVITS, S.; MOUSAVI, M.; GÄBLER, C. et al. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. **Eur. Spine J.**, Suppl. 1, s 102-106, 2004.

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

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

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MEHTA, S.; WATSON, J. T. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. **J. Orthop. Trauma**. v. 22, n. 6, p. 433-438, 2008.

MISHRA, A.; TUMMALA, P.; KING, A. et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. **Tissue Eng.**, v. 15, n. 3, p. 431-435, 2009a.

MISHRA, A.; WOODALL, J., VIEIRA, A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. **Clin. Sports Med.**, v. 28, n. 1, p. 113-125, 2009b.

MOROZ, A.; BITTENCOURT, R. A. C.; FELISBINO, S. L. et al. Gel de plaquetas: arcabouço 3D para cultura celular. **Acta Ortop. Bras.**, v. 17, n. 2, p. 43-45, 2008.

OBARRIO, J.J.; ARAÚZ-DUTARI, J. L.; CHAMBERLAIN, T. M. et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology: case reports. **Int. J. Periodont. & Restor. Dent.**, v.20, n.5, p.487-497, 2000.

PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. **Burns**, v. 36, n. 1, p. 4-8, 2010.

PEREIRA, V. A.; VIEIRA, E. H.; GABRIELLI, M. A. C. et al. Bases biológicas do tecido ósseo. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. **Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento**. Das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica. 1. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p. 59-64.

RIEDEL, K.; RIEDEL, F.; GOESSLER, U. R. et al. Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair (review). **Int. J. of Mol. Med.**, v. 17, n. 2, p. 183-193, 2006.

RINDERMAN, G.; CISLAKOVA, M.; ARNDT, G. et al. Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. **J. Vet. Sci.**, v. 11, n. 2, p. 173-175, 2010.

ROSS, R. Platelet-derived growth factor. **Ann. Rev. Med.**, v. 38, p. 71-79, 1987.

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. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, n. 6, p. 879-882, 2000.

SOUZA, T. F. B.; FERREIRA, G. T. N. M.; SAKAMOTO, S. S.; ALBUQUERQUE, V. B.; BOMFIM, S. R. M.; ANDRADE, A. L. Aspectos radiográficos e densitométricos de fraturas experimentais do rádio de cães tratadas com plasma rico em plaquetas. **ARS Vet.**, v. 27, n.1, p.01-06, 2011.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; FILARDO, G. et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. **Int. Orthop.**, v. 35, n. 10, p. 1569-1576, 2011.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 31, n. 1, p. 24-28, 2006.

WANG, H.-L.; AVILA, G. Platelet rich plasma: myth or reality? **Eur. J. Dent.**, v. 1, n. 4, p. 192-193, 2007.

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

YARDUMIAN, D. A.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, n. 7, p. 701-712, 1986.

CAPÍTULO 2 – COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE CÃES

RESUMO – Biotécnicas como o plasma rico em plaquetas (PRP) vêm sendo amplamente utilizadas na reparação e regeneração teciduais, objetivando acelerar a cicatrização de feridas. O potencial do PRP para diminuir o tempo de recuperação dos traumas depende da concentração plaquetária, de sua função, e de seus fatores de crescimento. A escassez de protocolos para obtenção do PRP em cães, aliada às variações dos mesmos, dificulta o emprego desta biotécnica. O objetivo deste estudo foi testar três diferentes protocolos para obtenção do PRP e verificar sua eficácia na espécie canina. Foram colhidos 15 mL de sangue de 20 cães saudáveis, sendo as amostras submetidas aos protocolos para obtenção do PRP segundo Anitua, Sonnentag e Vendramin. As concentrações médias de plaquetas proporcionadas por cada protocolo foram de 247%, 351% e 439%, respectivamente. O protocolo de Vendramin sobressaiu em relação aos demais, com melhor concentração plaquetária no PRP, e apresentar boa reprodutibilidade.

PALAVRAS-CHAVE – Biotecnologia, canino, centrifugação, cicatrização.

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de reconstrução do tecido frente a um dano está ligada ao tipo de célula existente no local e aos sinalizadores (fatores de crescimento) que desencadearão os estímulos necessários aos eventos celulares. O processo de “reparação” consiste em uma restauração tecidual sem que este apresente as características biológicas anteriormente presentes. Já a “regeneração” ocorre quando há manutenção das características existentes, ficando o tecido similar ao original (LENHARO et al., 2004). Estes processos são importantes para a manutenção dos tecidos e a sobrevivência de todos os organismos (CHEN et al., 2010).

O plasma rico em plaquetas (PRP) vem sendo utilizado para a cicatrização de feridas, sejam elas ósseas, cutâneas ou musculares. A aplicação desta biotécnica tem obtido resultados positivos em seres humanos e animais. O PRP é definido como um concentrado autólogo de plaquetas acima do valor basal, com um incremento mínimo de 338% (MARX et al., 1998). Por seu conteúdo, rico em fatores de crescimento (FC), o PRP atua na mitogênese, angiogênese e reepitelização do tecido danificado (BARRIENTOS et al., 2008; LIEBERMAN et al., 2002; MARX et al., 2001).

Pesquisadores das áreas médica e odontológica vêm empregando o gel autólogo de plaquetas na terapia de seus pacientes, como em cirurgias plásticas (EVERTS et al., 2006), consolidação óssea (LUCARELLI, et al., 2005), tendinopatias e injúrias musculares (MISHRA et al., 2009), e queimaduras (PALLUA et al., 2010), assim como em implantes dentários e cirurgias periodontais (DEMIR et al., 2007; KECELI et al., 2008). Na medicina veterinária, a aplicação do PRP é voltada principalmente para a ortopedia, com uso na reparação de falhas ósseas (BARBOSA et al., 2008; SOUZA et al., 2011; YOU et al., 2007) e como alternativa no tratamento de artrites em cães (STIEF et al., 2011), assim como em feridas cutâneas (DeROSSI et al., 2009) e

injúrias musculoesqueléticas em equinos (MONTEIRO et al., 2009; RINDERMAN et al., 2010; TEXTOR et al., 2011; TORRICELLI et al., 2011).

Os benefícios advindos do PRP são vários. Ao estabelecer um protocolo de fácil execução e baixo custo, os clínicos e cirurgiões veterinários terão a disponibilidade de uma ferramenta de trabalho, visando um menor tempo de recuperação de seus pacientes. Como o PRP atua acelerando o processo de reparação tecidual pela ação dos fatores de crescimento existentes nos grânulos α plaquetários (MARX et al., 2004), a quantidade de plaquetas pode influenciar positivamente a capacidade regenerativa. O número de plaquetas existentes no PRP dependerá da técnica utilizada para sua obtenção (WEIBRICH et al., 2002), sendo necessária a utilização de um protocolo que seja eficiente na concentração das plaquetas.

Dentre as alterações quantitativas e qualitativas que as plaquetas podem sofrer ao serem submetidas à centrifugação, está a liberação prematura dos seus grânulos. Com eles, são liberados os fatores de crescimento em um estado não bioativo, resultando em um PRP pobre, diminuindo sua eficácia, com resultados clínicos desfavoráveis (MARX et al., 2004).

Alguns protocolos foram testados em amostras de sangue de cães, com resultados significativos (FERRAZ et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; ALEIXO et al., 2011; SOUZA et al., 2011). Lamentavelmente a maioria destes protocolos relatam a força de centrifugação em rpm (rotações por minuto), não descrevendo o raio do rotor da centrífuga, impedindo a reprodução dos protocolos.

Para a obtenção do PRP vários protocolos têm sido testados, principalmente aqueles que visam o preparo fácil com baixo custo para utilização em ambulatorios e consultórios. Neste sentido, alguns autores preconizam protocolos mais simples, com apenas uma centrifugação (ANITUA, 1999), outros afirmam que a dupla centrifugação concentra mais as plaquetas e, por isso, o PRP obtido é mais eficaz (MARX et al., 2001). Protocolos

simplificados de obtenção do PRP descritos por Anitua (1999) e Sonnleitner et al. (2000), foram pioneiros ao diminuir os custos do uso desta biotécnica, como também ao utilizar pequenos volumes de sangue. A técnica descrita por Vendramin et al. (2006), também realizada em humanos, já foi testada em equinos (DeROSSI et al., 2009), com bons resultados.

Objetivou-se comparar a capacidade de três protocolos para obtenção do PRP em humanos, de única (ANITUA et al., 1999) e de dupla centrifugação (SONNLEITNER et al., 2000; VENDRAMIN et al., 2006), em concentrar as plaquetas do sangue de cães.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Local de realização da pesquisa

As atividades experimentais foram conduzidas nas instalações do Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), UNESP, Campus de Araçatuba.

2.2 Animais

Foram utilizados 20 cães com idade acima de um ano, independente do sexo e da raça, com peso variando de 10 a 30 kg. A higidez foi confirmada com base no exame físico, hemograma, contagem de plaquetas e sorologia para leishmaniose.

2.3 Colheita e acondicionamento das amostras

A colheita do sangue periférico de cada animal foi realizada com cautela, priorizando as amostras colhidas em uma única punção, evitando repetidos traumas ao endotélio vascular, assim como a escolha de agulhas hipodérmicas de grosso calibre, a fim de minimizar a ativação plaquetária. Optou-se pela utilização do anticoagulante CPDA-1¹ por ser rico em substratos para a manutenção da viabilidade plaquetária.

Para a colheita, foram utilizadas agulhas hipodérmicas (18G) e seringas contendo CPDA-1. As amostras foram aliquotadas e acondicionadas em quatro tubos: um microtubo siliconizado sem ativador (500 µL de sangue) para contagem inicial de plaquetas e três tubos siliconizados sem ativador (5 mL), para a obtenção do PRP por três diferentes protocolos, sendo

¹ CPDA-1 – citrato de sódio, fosfato monobásico de sódio, dextrose anidra e ácido cítrico anidro. JP INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS, SP.

processadas imediatamente, em centrífuga refrigerada a 25°C (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Protocolo (I) segundo Anitua (1999): as amostras foram submetidas a uma única centrifugação, a 160 G por seis minutos. Um volume de aproximadamente 0,5 mL da parte superior do sobrenadante foi pipetada e denominada plasma pobre em plaquetas (PPP). A zona intermediária do plasma foi pipetada e descartada. O restante do plasma até o limite de 2 mm acima da camada de eritrócitos denominado PRP.

Protocolo (II) segundo Sonnleitner et al. (2000): o sangue foi centrifugado por 20 minutos a 160 G. Todo o sobrenadante até 2mm da camada de eritrócitos foi pipetado e acondicionado em outro tubo. Posteriormente foi submetido a uma centrifugação por 15 minutos a 400G. Aproximadamente 0,5 mL da porção superior do plasma foi pipetada, obtendo-se o PPP. A porção intermediária foi descartada, selecionando-se a porção inferior (0,5 mL) para obtenção do PRP.

Protocolo (III) segundo Vendramin et al. (2006): as amostras de sangue foram submetidas a duas centrifugações, sendo a primeira a 300 G por 10 minutos. Todo o plasma foi pipetado, como também a porção superior dos eritrócitos (até 2 mm) e a amostra acondicionada em um novo tubo. Após a segunda centrifugação, a 640 G durante 10 minutos, o sobrenadante (aproximadamente 0,5 mL) foi pipetado e acondicionado, resultando no PPP. A porção intermediária do plasma foi descartada e a porção final mais os eritrócitos formaram o PRP (0,5 mL).

2.5 Plaquetometria

A contagem de plaquetas das amostras do sangue inicial, do PRP e do PPP foi realizada segundo método de contagem descrito por Hendrix (2002), utilizando como diluente o Líquido de Brecher (oxalato de amônio 1%). As contagens foram efetuadas nos cinco quadrados centrais em ambos os lados da câmara de Neubauer espelhada em microscopia óptica (400x). As contagens foram executadas por um profissional especializado, que desconhecia os protocolos testados.

2.6 Reprodutibilidade

Após determinar o melhor protocolo, novos testes foram realizados com amostras de sangue de 10 cães, com mesmo padrão de peso e idade, para avaliar o seu índice de reprodutibilidade. As plaquetas foram avaliadas quanto a sua morfologia tanto em câmara de Neubauer, como nos esfregaços do PRP, verificando a existência ou não de uma ativação precoce.

2.7 Análise estatística

Após a análise das distribuições das variáveis quanto à normalidade, foi realizada análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas e pós-teste de Tukey para comparações múltiplas, em programa estatístico GraphPad InStat v. 3.0, considerando os resultados significativos quando $p < 0,05$. Também foi realizada análise de discrepância (Bland-Altman) entre os métodos, de acordo com Jensen et al. (2006).

3. RESULTADOS

Em relação à contagem inicial, todas as técnicas concentraram de forma significativa ($p < 0,001$) o número de plaquetas. O protocolo de Vendramin et al. (2006) (III) obteve valores superiores aos protocolos de Anitua (1999) (I) ($p < 0,001$) e Sonnleitner et al. (2000) (II) ($p < 0,01$), sendo considerado o melhor para a obtenção do PRP em cães. Os protocolos I e II também diferiram estatisticamente ($p < 0,001$). A diferença relativa média entre os valores iniciais de plaquetas nos protocolos I, II e III foi de 247, 351 e 439%, respectivamente (Figura 1).

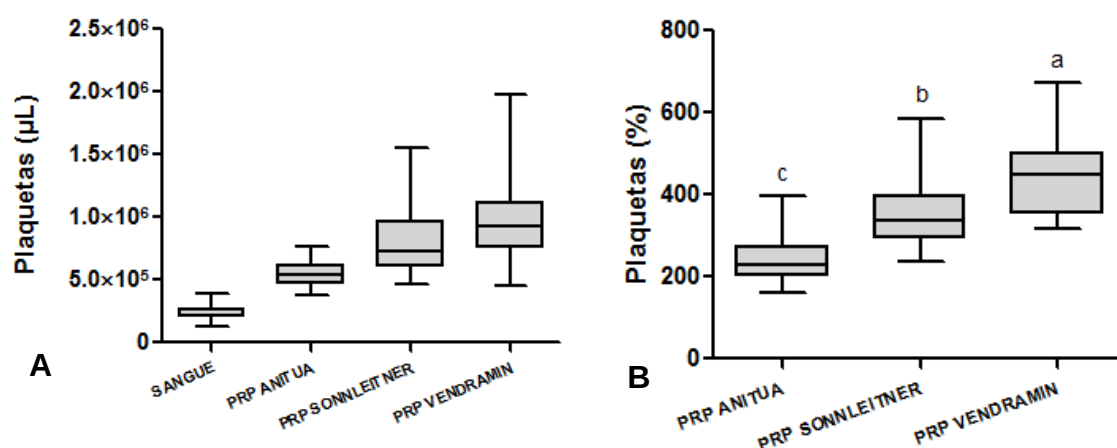


FIGURA 1 - (A) Boxplot dos valores de plaquetas/ μL do sangue e PRP obtidas pelos protocolos segundo Anitua, 1999 (I), Sonnleitner, 2000 (II) e Vendramin, 2006 (III) (B) Boxplot das diferenças relativas entre os valores iniciais e finais de plaquetas. Letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) segundo pós-teste de Tukey.

Em todos os protocolos houve amostras que não alcançaram a concentração mínima de 338%. Nas amostras processadas pela técnica de Anitua (1999), 17 animais não alcançaram a concentração plaquetária mínima, seguido da técnica de Sonnleitner et al. (2000), com 10 animais, e Vendramin et al. (2006), com 3 animais.

Ao avaliarmos a discrepância entre os protocolos, dois a dois, considerando o protocolo segundo Sonnleitner, 2000 (II) padrão-ouro, foi verificado raro erro aleatório e sistemático evidente, diretamente proporcional à concentração de plaquetas (Figura 2).

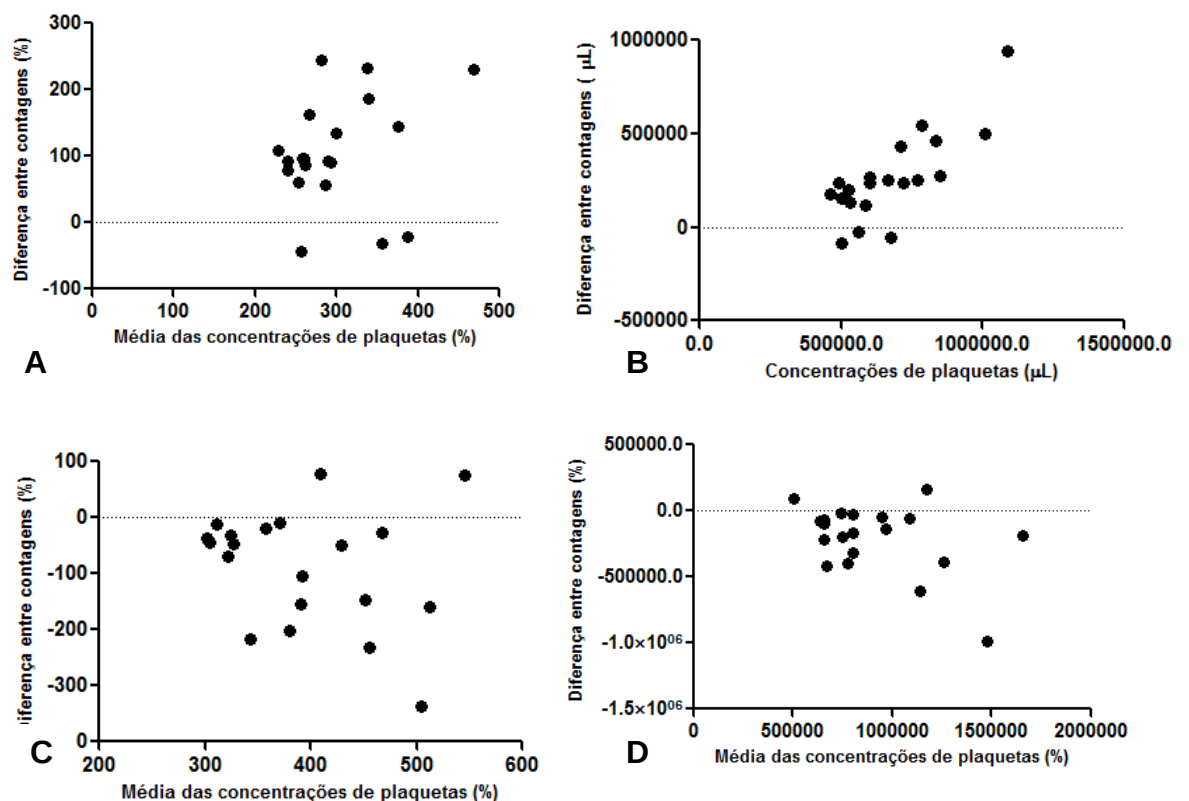


FIGURA 2 - (A) Discrepâncias entre o protocolo-ouro de Sonnleitner et al. (2000) para obtenção de PRP em cães e o protocolo de Anitua (1999) (A e B) e de Vendramin et al. (2006) (C e D).

As técnicas apresentaram diferentes tempos para a obtenção do PRP. O protocolo de Anitua (1999) foi finalizado em aproximadamente 10 minutos, seguido do protocolo de Vendramin et al. (2006) (aproximadamente 25 minutos) e Sonnleitner et al. (2000) (aproximadamente 40 minutos).

Quanto às plaquetas que não sedimentaram e permaneceram no PPP, o protocolo de Anitua (1999) obteve valores superiores quando comparado ao

demais, sendo considerada uma mistura de PRP e PPP. Avaliando os protocolos de Sonnleitner et al. (2000) e Vendramin et al. (2006), não houve diferença quanto à sedimentação das plaquetas, produzindo PPPs com baixa contagem plaquetária. O volume do plasma foi variável devido à força G empregada, resultando em maiores volumes quanto maior a força de centrifugação. A diferença relativa média entre os valores iniciais de plaquetas e os protocolos I, II e III foi de 64, 13 e 11%, respectivamente (Figura 3).

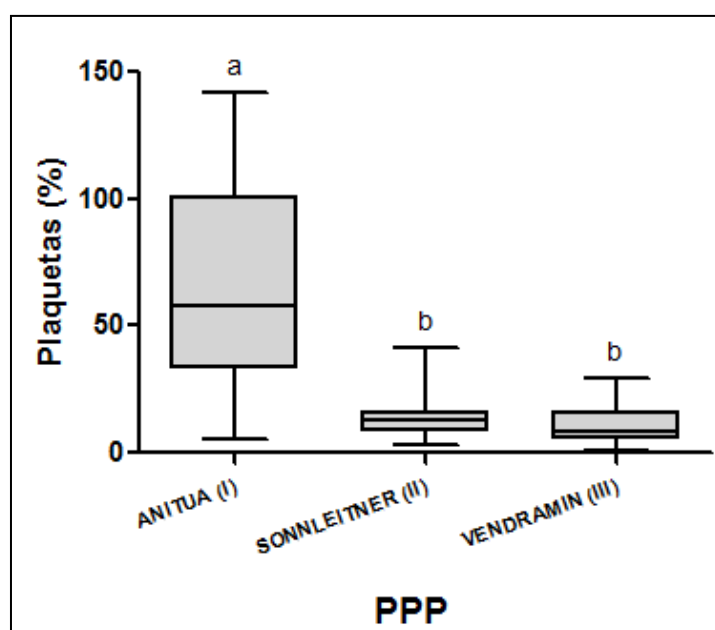


FIGURA 3 - Boxplot da diferença relativa média entre os valores iniciais e finais de plaquetas, em relação à quantidade no PPP de três protocolos (Anitua, Sonnleitner e Vendramin). Letras coincidentes não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) segundo pós-teste de Tukey.

Em relação à reprodutibilidade do protocolo descrito por Vendramin et al. (2006), a técnica é reprodutível, com um coeficiente de variação de 18 a 23, demonstrando a consistência dos resultados.

4. DISCUSSÃO

Diversos protocolos têm sido utilizados e recomendados no processamento do PRP, não existindo uma padronização para sua obtenção, ficando à escolha do pesquisador o protocolo que alcançará seu objetivo. Ao buscar um protocolo que fosse mais eficaz para a produção do PRP na espécie canina, testamos métodos existentes na literatura que inicialmente foram padronizados para a espécie humana.

As contagens iniciais de plaquetas realizadas nas amostras de sangue dos cães apresentaram-se dentro dos valores de referência para a espécie (JAIN, 1993), com média de $229.625 \pm 59.826/\mu\text{L}$. O protocolo descrito por Vendramin et al. (2006) foi superior às demais quanto à capacidade de concentrar as plaquetas (média 439%). Em humanos, a média de contagem de plaquetas do sangue periférico é de $200.000 \pm 75.000/\mu\text{L}$, sendo que valores acima de 1 milhão/ μL para o PRP considerados “terapêutico” (MARX et al., 2004). O PRP obtido pelo protocolo descrito por Vendramin et al. (2006) pode, portanto ser considerado “terapêutico”, pois concentrou as plaquetas quase cinco vezes em relação a contagem inicial.

A menor quantidade de plaquetas obtida pelo protocolo de Anitua (1999) pode ser explicada pela única centrifugação em que as amostras foram submetidas. A dupla centrifugação promoveu maior concentração plaquetária, sendo que a primeira fase é denominada de *hard spin*, que separa os eritrócitos do plasma, que contém os leucócitos, plaquetas e fatores de coagulação. A segunda centrifugação consiste no *soft spin*, que separa as plaquetas, leucócitos e poucos eritrócitos. Dessa forma, um protocolo com apenas uma centrifugação não produziria um verdadeiro PRP, e sim uma mistura de PRP e PPP, com reduzida concentração plaquetária (MARX et al., 2001).

A disparidade entre os protocolos de Anitua (1999) e Sonleitner et al. (2000) também foi verificada em um estudo realizado em coelhos por Nagata et

al. (2010). Os autores observaram a alta concentração de plaquetas proporcionada pela técnica de Sonnleitner et al. (2000) quando comparada a de Anitua (1999), que não atingiu a concentração mínima desejável, concluindo que a dupla centrifugação foi melhor para a obtenção do PRP na espécie em questão, semelhante ao que ocorreu no presente estudo.

Assim como a dupla centrifugação, uma maior força G empregada aumenta consideravelmente o número de plaquetas (WEIBRICH et al., 2002). O protocolo de Vendramin et al. (2006) foi realizado com dupla centrifugação e uma maior força G, explicando sua maior capacidade em concentrar as plaquetas na espécie canina quando comparado ao protocolo de Sonnleitner et al. (2000) que por vezes gerou concentrações abaixo dos 338%.

Considerando o protocolo de Sonnleitner et al. (2000) como padrão-ouro, a sua discrepância em relação aos dois protocolos (Anitua e Vendramin) foi grande e erro sistemático foi predominante e diretamente proporcional ao incremento de plaquetas. Observou-se uma tendência positiva para o protocolo de Anitua (1999), ou seja, sua metodologia tende a concentrar menos plaquetas devido empregar apenas uma única centrifugação para a obtenção do PRP. No caso da técnica de Vendramin et al. (2006) ocorre o inverso, indicando tendência negativa, onde uma maior força de centrifugação empregada reflete em maiores concentrações de plaquetas no PRP.

Embora a literatura descreva protocolos testados em cães que utilizam a força de centrifugação rpm (BARBOSA et al., 2008; FERRAZ et al., 2007), sua reprodutibilidade é dificultada pela falta de especificação do modelo das centrífugas utilizadas, não sendo possível reproduzi-los com fidelidade. O incremento plaquetário obtido com o protocolo de Vendramin et al. (2006) foi superior ao protocolo de Ferraz et al. (2007) para a obtenção do PRP em cães. Quando comparado aos protocolos de Aleixo et al. (2011) e Barbosa et al. (2008), a concentração de plaquetas obtida neste estudo foi inferior, entretanto,

possui grande capacidade em concentrar as plaquetas da espécie canina, produzindo um PRP com qualidade.

O resultado que alcançamos com o protocolo de Sonnleitner et al. (2000) foi menor do que o obtido por Souza et al. (2011), que utilizaram a mesma metodologia em sua pesquisa. Isso pode ser explicado pela alta concentração plaquetária obtida no PRP de um animal (821%), elevando a média de concentração do grupo de cães tratados, assim como o baixo número de animais estudados (n=5).

Nem sempre a aplicação de uma força G superior traz vantagens (FERRAZ et al., 2007), podendo levar a uma ativação plaquetária prematura, assim como uma excessiva pipetagem (DUGRILLON et al., 2002), ou tipo de anticoagulante utilizado (EFEOGLU et al., 2004; MARX et al., 2001). Em nossa pesquisa, não foram identificadas alterações morfológicas nas plaquetas quando submetidas aos diferentes protocolos testados, sem a presença de agregados plaquetários.

O número de plaquetas obtido pelo PPP de cada protocolo confirma a capacidade em concentrar as plaquetas, pois quanto menor a contagem no PPP, maior a quantidade de plaquetas encontrada no PRP. A técnica sugerida por Vendramin et al. (2006) novamente destacou-se, proporcionando um PPP com baixa contagem plaquetária.

5. CONCLUSÃO

O protocolo proposto por Vendramin et al. (2006), utilizado em humanos, é eficaz para a obtenção do plasma rico em plaquetas na espécie canina.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, G. A. S.; COELHO, M. C. O. C.; TEIXEIRA, M. N. et al. Comparação entre dois métodos para obtenção do plasma rico em plaquetas, em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 3, p. 567-573, 2011.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 14, n. 4, p. 529-535, 1999.

BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C. et al. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciênc. Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, ago, 2008.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Rep. Reg.**, v. 16, p. 585-601, 2008.

CHEN, F.-M.; ZHANG, M.; WU, Z.-F. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 24, p. 6279-6308, 2010.

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

DeROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cir. Bras.**, v. 24, n. 4, p. 276-281, 2009.

DUGRILLON, A.; EICHLER, H. KERN, S. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **Int Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31, n. 6, p. 615-619, 2002.

EFEUGLU, C.; YASEMIN, D. A.; SELDA, E. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, n.11, p. 1403-1407, 2004.

EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **J. Am. Soc. Extra-Corporeal Technol.**, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006.

FERRAZ, V. C. M.; FERRIGNO, C. R. A.; SHMAEDECKE, A. Platelet concentration of plateletrich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.

HENDRIX, C. M. Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários. 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 2002. 556p.

JAIN, N. C. The platelets. In: _____, **Essentials of veterinary hematology**. 1. ed. Malvern, Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. p 105-132.

JENSEN, A. L.; KJELGAARD-HANSEN, M. Method comparison in the clinical laboratory. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 35, n. 3, p. 276-286, 2006.

KECELI, H. G.; SENGUN, D.; BERBEROGLU, A. et al. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: a randomized-controlled trial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 3, p. 255-262, 2008.

LENHARO, A.; COSSO, F.; MAGALHÃES, D. et al. Plasma rico em Plaquetas – PRP. . In: 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., 2004. p. 165-185.

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

LUCARELLI, E.; FINI, M.; BECCHERONI, A. et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. **Clin. Ortop. Relat. Res.**, n. 435, p.62-68, 2005.

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

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

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MISHRA, A.; WOODALL, J., VIEIRA, A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. **Clin. Sports Med.**, v. 28, n. 1, p. 113-125, 2009.

MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O. M.; THEORET, C. L. effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **Am. J. Vet. Res.**, v. 70, n. 2, p. 277-282, 2009.

NAGATA, M. J. H.; MESSORA, M. R.; FURLANETO, F. A. C. et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. **Eur. J. Dent.**, v. 4, n. 4, p.395-402, 2010.

PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. **Burns**, v. 36, n. 1, p. 4-8, 2010.

RIEDEL, K.; RIEDEL, F.; GOESSLER, U. R. et al. Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair (review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 17, n. 2, p. 183-193, 2006.

RINDERMAN, G.; CISLAKOVA, M.; ARNDT, G. et al. Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. **J. Vet. Sci.**, v. 11, n. 2, p. 173-175, 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. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, p. 879-882, 2000.

SOUZA, T. F. B.; FERREIRA, G. T. N. M.; SAKAMOTO, S. S.; ALBUQUERQUE, V. B.; BOMFIM, S. R. M.; ANDRADE, A. L. Aspectos radiográficos e densitométricos de fraturas experimentais do rádio de cães tratadas com plasma rico em plaquetas. **ARS Vet.**, v. 27, n.1, p.01-06, 2011.

STIEF, M.; GOTTSCHALK, J.; IONITA, J. –C. et al. Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v. 24, n. 2, p. 122-125, 2011.

TEXTOR, J. A., NORRIS, J. W.; TABLIN, F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. **Am. J. Vet. Res.**, v. 72, n. 2, p. 271-278, 2011.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; FILARDO, G. et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. **Int. Orthop.**, v. 35, n. 10, p. 1569-1576, 2011.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 31, n. 1, p. 24-28, 2006.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. G. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system: Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 13, n. 4, p. 437-443, 2002.

YARDUMIAN, D. A.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, n. 7, p. 701-712, 1986.

YOU, T.- M.; BYUNG-HO, C.; JINGXU, L. et al. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 103, n. 4, p. e8-e12, 2007.