

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE SETE PROTOCOLOS DE
OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS
(PRP)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**AVALIAÇÃO DE SETE PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DE PLASMA
RICO EM PLAQUETAS (PRP)**

por

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Flávio Desessards De La Côte

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE SETE PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DE PLASMA
RICO EM PLAQUETAS**

elaborada por
Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Flávio Desessards De La Côte, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Jarbas F. da Costa Castro Júnior, Dr. (Méd. Veterinário Autônomo)

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 28 de Fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por guiar meus caminhos;

Ao meu pai Elbio “*in memoriam*” pela amizade, educação, sabedoria, pelas cobranças sinceras que contribuíram de forma significativa na minha formação pessoal e acadêmica, e pelos momentos felizes pelos quais passamos juntos;

A minha mãe Neyt por me proporcionar uma vida digna, pelo apoio em minhas decisões, pela amizade, companheirismo e amor em todos os momentos;

Aos meus tios, Nelci, Elmerita e Marieta pelo incentivo e pela presença em todos os momentos da minha vida;

Ao meu namorado Gustavo, pelo amor, carinho e companheirismo proporcionado a cada dia nesses anos que estamos juntos;

Ao meu orientador Prof. PhD Flávio Desessards De La Côte pela confiança, amizade e ensinamentos transmitidos por todos esses anos;

A minha co-orientadora Prof. Dra. Karin Erica Brass pelo apoio, incentivo e ajuda na elaboração do nosso projeto;

Aos colegas e amigos Marcos Azevedo, Gabriele Biavaschi, Diego Rafael P. da Silva, Endrigo Pompermayer, Miguel Gallio, Liomara Amaral pela colaboração na realização do trabalho, pelo companheirismo e amizade.

Ao EMBRIOLAB em especial a Prof. Dra. Mara Rubin por estar sempre pronta para ajudar, pela confiança e pelo livre acesso ao seu laboratório;

À médica veterinária Laeticia Trindade uma pessoa muito querida que colaborou muito no início do experimento dividindo seu conhecimento sobre o assunto;

Aos estagiários da Clínica de Equinos da UFSM, em especial Gian Zacarias e Camila Cantarelli pelo auxílio na realização do experimento;

Aos médicos veterinários Luana Farias e Felipe Libardoni pela disponibilidade e ajuda nos momentos finais do experimento;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE SETE PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Autor: Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

Orientador: Flávio Desessards De La Côte

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de Fevereiro de 2012.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido a partir do sangue total, através de uma ou duas centrifugações, resultando em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas contendo fatores de crescimento. O objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes protocolos para obtenção de PRP através do método manual quanto à capacidade de concentração das plaquetas, contaminação com leucócitos e hemácias, e correlacionar a concentração plaquetária com os níveis do fator de crescimento TGF- β_1 nas amostras de PRP. Dez equinos, sadios, com idade média de 7 anos ($\pm 2,39$), pesando em média 500kg ($\pm 67,1$) foram usados para avaliar sete protocolos de obtenção de PRP. Os protocolos testados variaram quanto à velocidade e tempo nas duas centrifugações. As variáveis analisadas nas amostras de PRP foram: concentração de plaquetas, presença de leucócitos e hemácias, e níveis de TGF- β_1 quantificados pelo teste ELISA. Os resultados deste estudo não demonstraram diferenças significativas entre os protocolos testados quanto à capacidade de concentração plaquetária e quanto aos níveis de TGF- β_1 . Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre o protocolo I aos demais protocolos devido a este apresentar maior número de hemácias e leucócitos nas amostras de PRP, sendo por isto considerado inadequado para o volume de sangue utilizado. Os demais protocolos podem ser utilizados para obtenção de PRP de sangue equino. Apesar do PRP ser uma opção de terapia na medicina equina, muitas lacunas relativas ao seu respeito ainda devem ser preenchidas.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas, centrifugações, concentração de plaquetas, TGF- β_1 , equinos.

ABSTRACT

Dissertation of master
Postgraduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF SEVEN PROTOCOLS FOR PLATELET- RICH PLASMA (PRP) PROCESSING

Author: Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

Advisor: Flávio Desessards De La Côte

Date and location of defense: Santa Maria, February 28th, 2012.

Platelet-rich plasma (PRP) is an autogenous product obtained from whole blood, through one or two centrifugations process. The resulting small volume of plasma contains a high platelets numbers and their growth factors. The aim of this study was to evaluate different protocols to obtain PRP using the manual method according to their capacity to concentrate platelets, leukocytes and erythrocytes contamination and the correlation between platelet count and growth factor TGF- β_1 levels in the PRP samples. Ten healthy horses with mean age of 7 years (± 2.39), weighing on average 500 kg (± 67.1) were used to evaluate seven protocols to obtain PRP. The protocols tested varied according to speed and time used on both centrifugations. The variables analyzed on the PRP samples were: platelet concentration, leukocytes and erythrocytes, TGF- β_1 levels quantified by ELISA. No significant differences between protocols were observed regarding the ability to concentrate platelet and the levels of TGF- β_1 . However, protocol PI showed significantly more erythrocyte and leukocyte contamination in PRP samples than the other protocols, being considered an inadequate protocol for the volume of blood used in this experiment. The remaining protocols are suitable for extracting PRP. Although the PRP is an option of therapy in equine medicine, many gaps regarding their compliance must still be met.

Key words: Platelet-rich plasma, centrifugations, pletelet concentration, TGF- β_1 , horse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema mostrando a ativação plaquetária e liberação dos fatores de crescimento após estímulo por agonista	15
--	----

CAPÍTULO 1

Figura 1- a) Concentrações de plaquetas ([plaquetas]) nos sete protocolos testados para obtenção de PRP. b) Número de leucócitos nas amostras de PRP nos sete protocolos testados. c) Número de hemácias nas amostras de PRP. d) Concentração do fator de crescimento TGF- β_1 nas amostras de PRP nos sete protocolos.....	42
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fonte e função dos fatores de crescimento contidos nos alfa grânulos plaquetários.....	16
Tabela 2. Protocolos de obtenção de PRP utilizados nas diferentes espécies.....	22

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Força (g) e tempo (min) de centrifugação dos diferentes protocolos testados para obtenção do PRP	41
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Constituição das plaquetas	11
2.2. Plasma rico em plaquetas (PRP)	12
2.3. Métodos de obtenção do PRP	13
2.4. Ativação plaquetária e fatores de crescimento	14
2.5. Trombocitopenia.....	17
2.5.1. Produção diminuída de plaqueta	17
2.5.2. Destruição de plaquetas	18
2.5.3. Aumento no consumo de plaquetas	19
2.5.4. Sequestro de plaquetas	19
2.5.5. Perda de plaquetas	19
2.6. Aplicação do PRP na medicina humana.....	20
2.7. Aplicação do PRP na medicina equina.....	20
2.8. Protocolos de obtenção do PRP.....	22
3. CAPÍTULO 1.....	24
4. CONCLUSÃO.....	43
5. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena de plaquetas e seus fatores de crescimento que auxiliam na cicatrização. O PRP é obtido pela concentração das plaquetas por um gradiente de densidade por meio da centrifugação. Este produto tem sido muito utilizado na medicina humana e veterinária por ser rico em determinados fatores de crescimento que atuam nos processos cicatriciais de diversos tecidos (WHITMAN et al., 1997). Os principais fatores de crescimento encontrados no PRP são: o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (ZIMMERMAN et al., 2000; EPPLEY et al., 2004; MARX, 2004).

O gel de PRP surgiu como uma alternativa viável para substituir a cola de fibrina. Ele vem sendo apontado como a mais recente das colas teciduais utilizadas em feridas cirúrgicas e apresenta a vantagem da presença de fatores de crescimento e citocinas que lhe conferem um grande benefício na cicatrização (MARX, 2004). Desde meados da década de 90, o gel de plaquetas, constituído essencialmente por plasma rico em plaquetas (PRP), tem sido usado na odontologia em cirurgias reconstrutivas orais, bucomaxilo-faciais e procedimentos de reconstrução para implantodontia, visando acelerar o reparo da ferida cirúrgica e a regeneração óssea (DUSSE, 2008).

Os protocolos utilizados para obtenção do PRP na espécie equina vem sendo adaptados das técnicas utilizadas na espécie humana, onde o PRP é obtido após uma ou duas centrifugações do sangue total colhido em tubos ou bolsas de sangue contendo o anticoagulante citrato de sódio associado ou não a outros constituintes, e posterior ativação das plaquetas (CARTER et al., 2003; SUTTER et al., 2004; CARMONA, 2006; CARMONA et al., 2007; SCHNABEL et al., 2007; ARGUELES, 2008). Na realidade, o uso do PRP na medicina veterinária é bem mais recente, sendo necessária a realização de mais estudos nas diferentes espécies para validação e melhor aproveitamento da técnica (MAIA & SOUZA, 2009).

Na literatura são descritos diversos protocolos manuais ou em aparelhos automatizados, para obtenção do PRP, com o objetivo de obter um maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma (WEIBRICH et al., 2002; MARX, 2004; VENDRAMIN et al., 2006). Em virtude disso buscamos informações sobre a real importância de uma alta concentração de plaquetas e fatores de crescimento e sua implicação na qualidade do PRP. Não menos importante são as questões relacionadas com a quantidade de plaquetas necessária para se obter o efeito terapêutico, a frequência de aplicações do PRP, o momento de usar e as lesões que respondem mais prontamente a esta modalidade terapêutica.

O objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes protocolos para obtenção de PRP através do método manual quanto à capacidade de concentração das plaquetas, contaminação com leucócitos e hemácias e correlacionar a capacidade de concentração e contagem de plaquetas com os níveis do fator de crescimento TGF- β_1 nas amostras de PRP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Constituição das plaquetas

Os megacariócitos (MKs) são os precursores das plaquetas (PLTS) que estão localizados na medula óssea. Estas células se desenvolvem a partir de células mielóides progenitoras multipotentes CD34 + que residem no tecido hematopoiético e na corrente sanguínea. As PLTS são produzidas pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, sendo liberadas diretamente na corrente sanguínea, ao redor do espaço hematopoiético medular. A gênese das PLTS é estimulada e regulada por citocinas como: as interleucinas 1, 3, 6 e 11 e pelo hormônio trombopoietina (LEVEN, 2000; HARTWIG, 2003). A trombopoietina é o hormônio que regula o desenvolvimento dos megacariócitos e está envolvida na liberação das plaquetas. A fonte de trombopoietina é incerta, mas ela parece ser oriunda do endotélio vascular, fígado ou fibroblastos (REBAR et al., 2003).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, que se encontram na corrente sanguínea com a forma discóide, nos equinos, medindo de 5- 7 μm . Embora em algumas condições PLTS grandes ($> 20\mu\text{m}$) podem ser encontradas na corrente sanguínea dos equinos (LEVEN, 2000).

A membrana das PLTS possui três camadas que são: glicocalix, camada fosfolipídica e submembranosa. O glicocalix é a camada externa que contém receptores glicoproteicos importantes na ativação e adesão plaquetária. A camada fosfolipídica é a camada central constituída de uma bicamada lipídica assimétrica com propriedade anticoagulante; as estruturas desta camada são idênticas às de outras células com proteínas transmembranosas e periféricas atuando como receptores de membrana. A camada submembranosa é a camada mais interna que compõe o citoesqueleto e se liga a glicoproteínas da camada externa (TABLIN et al., 2000).

O citoplasma das PLTS é constituído pelas mesmas proteínas citoplasmáticas dos megacariócitos (LEVEN, 2000; HARTWIG, 2003). Dois tipos de actina estão presentes no citoplasma das plaquetas, globular e filamentosa, elas constituem a rede citoplasmática.

Filamentos de actina atuam como suporte estrutural para diferentes grânulos plaquetários e mitocôndrias. A atividade contrátil plaquetária é mediada por polimerização de actina e miosina e a forma discóide é mantida por microtúbulos citoplasmáticos (TABLIN et al., 2000; GENTRY, 2000; HARTWIG, 2003).

As plaquetas dos mamíferos possuem três tipos de grânulos: lisossomais, densos e alfa (GENTRY, 2000; ANITUA et al., 2004). Os grânulos lisossomais contêm ácido hidrolases, guanina, fosfolipases e cinases, que são enzimas com ação hidrolíticas e proteolíticas (TABLIN et al., 2000). Grânulos densos armazenam ATP, ADP, cálcio, fósforo e serotonina. O ADP induz migração plaquetária e em combinação com serotonina produz contração de artérias lesionadas. Alfa grânulos contêm várias moléculas como citocinas, fatores de crescimento, entre outros. Existem moléculas que estão contidos nos alfa grânulos plaquetários porém não são específicas das plaquetas como: albumina, fibrinogênio, fibronectina, fator V, fator Va e fator von Willebrand (HARTWIG, 2003; ANITUA, 2004). Estas proteínas são importantes para todas funções das plaquetas, incluindo a formação de trombos, modulação da inflamação e síntese da matriz extracelular durante a cicatrização de feridas (GENTRY, 2000).

Oitenta por cento das plaquetas se encontram na circulação e 20% estão armazenadas no baço. Elas podem se mover livremente entre estes dois compartimentos. As plaquetas apresentam uma vida média fisiológica de aproximadamente dez dias e quando se tornam senis, são retiradas da circulação pelo sistema fagocitário mononuclear principalmente do baço (ZAGO et al, 2001).

2.2. Plasma rico em plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto obtido através da centrifugação do sangue autógeno, resultando em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e fatores de crescimento (VENDRAMIN et al., 2006). Este componente pode ser obtido mediante uma (MACEDO, 2004; MESSORA et al., 2009) ou duas centrifugações (VENDRAMIN et al., 2006; CARMONA, 2006; BARBOSA et al., 2008).

Na primeira (1^a) centrifugação ocorre a separação do sangue em três camadas. A camada inferior é constituída por hemácias, que, por terem peso específico maior, se depositam na parte inferior do tubo. Na região central encontramos uma camada intermediária

fina e esbranquiçada denominada de zona de névoa, constituída por leucócitos e algumas plaquetas maiores e, logo acima, a camada superior que é constituída pelas plaquetas e plasma. Em protocolos de centrifugação dupla, após o descarte das hemácias, é realizada a centrifugação do plasma obtido na 1ª centrifugação resultando na deposição das plaquetas no fundo do tubo (VENDRAMIN, et al., 2006).

O processo de centrifugação deve ser executado com muita precisão para separar as plaquetas das células vermelhas e obter um plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras (MARX, 2004), pois a fragmentação e liberação precoce dos fatores de crescimento reduzem a eficácia terapêutica do PRP.

Para ser considerado PRP, Marx et al., (1998) e Lemos et al., (2002) consideram ser necessária uma concentração superior a 1.000.000 de plaquetas/ μ l. Já Whitlow et al., (2008) consideram que a concentração plaquetária no PRP deverá ser três a cinco vezes superior à presente no sangue total.

Na literatura encontramos outros termos utilizados para o PRP como: concentrado de plaquetas (CP), plasma enriquecido em plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, ou ainda gel de plaquetas (WHITMAN et al., 1997; ANITUA, 1999; MARX, 1999).

O gel de plaquetas é um subproduto obtido a partir do PRP quando da adição de trombina e cálcio resultando na ativação das plaquetas e início do processo de coagulação (VENDRAMIN et al., 2009). O gel de plaquetas apresenta propriedades adesivas, hemostáticas e cicatrizantes, e tem sido também muito utilizado na medicina humana em cirurgias ortopédicas, plásticas e neurocirurgias (MARX et al., 1998; LANDESBURG et al., 2000).

2.3. Métodos de obtenção do PRP

Whitman et al., (1997) introduziram o uso de CP em cirurgias maxilofaciais na área da odontologia. Esses autores passaram a chamar o gel de plaquetas autólogo de CP substituindo a cola de fibrina autóloga. No passado, a cola de fibrina foi amplamente utilizada para fixar enxertos ósseos e melhorar a hemostasia no local das cirurgias (MATRAS, 1982). Entre as desvantagens do uso da cola de fibrina que, conseqüentemente, resultaram na queda da sua utilização em cirurgias estão o tempo longo de preparação (3 dias), o alto custo, a ocorrência de reações alérgicas e doenças infecciosas em pacientes humanos (WHITMAN, et al., 1997).

São descritos três métodos para obtenção do PRP: método automático, semi-automático e manual (CARMONA, 2006).

O método automático é realizado por aferése, necessita de equipamento específico e experiência pessoal. Esta técnica não é usada em pequenas clínicas e necessita de grande volume de sangue (> 450 ml) em comparação com outras técnicas descritas (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998; WEIBRICH et al., 2002). A maior vantagem desta técnica é o baixo risco de contaminação bacteriana durante a preparação. O PRP obtido pela técnica de aferése tem eficiência em concentração plaquetária e de fatores de crescimento (WEIBRICH et al., 2002). Apesar das vantagens apresentadas esta técnica não é a mais utilizada na medicina equina, sendo limitada pela tecnologia empregada ficando restrita a institutos de transfusão de sangue e ambiente hospitalar na medicina humana (SUTTER et al., 2004).

O método semi-automático é uma técnica que pode ser utilizada em clínicas pequenas. A maior vantagem em relação as outras técnicas descritas é que ela resulta em maior concentração de plaquetas e fatores de crescimento (CARMONA, 2006). O risco de contaminação bacteriana é maior que no sistema automático e menor que no método manual (WEIBRICH et al., 2005). As desvantagens desta técnica são: a alta concentração de leucócitos no PRP e o maior investimento necessário (ZIMMERMANN et al., 2003; WEIBRICH et al., 2003; EPPLEY et al., 2004).

O método manual é a técnica mais simples e com menor custo para preparação do PRP sendo, portanto, a técnica usada preferencialmente nas clínicas de equinos. Ela exige uma rigorosa assepsia para evitar a contaminação bacteriana (WEIBRICH et al., 2005). A desvantagem desta técnica em relação as outras técnicas descritas é a menor concentração de plaquetas e fatores de crescimento. As vantagens são: a possibilidade de ser realizada em ambiente laboratorial e a baixa concentração de leucócitos no PRP quando comparada com os métodos automático e semi-automático (WEIBRICH et al., 2005).

2.4. Ativação plaquetária e fatores de crescimento

As plaquetas na corrente sanguínea se encontram no estado inativo (EVERTS et al., 2006). Substâncias como: gluconato de cálcio (CARMONA, 2006), cloreto de cálcio (MAIA, 2008), trombina bovina (SANCHEZ et al., 2003) e trombina autóloga (VENDRAMIN et al., 2009) utilizadas para ativação de plaquetas são chamadas de agonistas. Acredita-se que esses agonistas desencadeiam seus efeitos por meio da interação com receptores localizados na

membrana plasmática das plaquetas (BLOCKMANS et al., 1995). Após a ativação as plaquetas mudam sua forma e passam a apresentar projeções membranas a partir da sua superfície conhecidas como pseudópodos (HOFFBRAND et al., 2004). Estes por sua vez, são responsáveis pela agregação plaquetária. Após a estimulação por substâncias ativadoras, as plaquetas liberam proteínas chamadas de fatores de crescimento por exocitose dos grânulos alfa (HARRISON & CRAMER, 1993) (Figura 1).

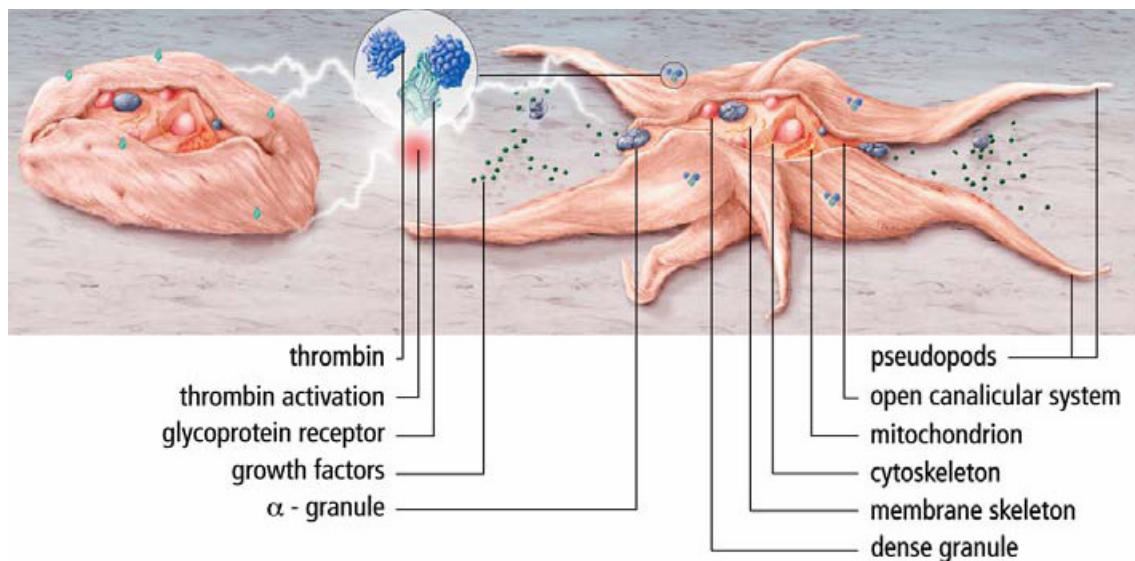


Figura 1- Esquema mostrando a ativação plaquetária e liberação dos fatores de crescimento após estímulo por agonista (EVERTS et al., 2006).

Os fatores de crescimento (FC) são peptídeos sinalizadores, derivados dos grânulos plaquetários alfa que produzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição de matriz extracelular (EVERTS et al., 2006). A sinalização realizada pelos FC é mediada por receptores de tirosina-quinase localizados na superfície das membranas das células teciduais onde atuam, determinando especificidade de ação frente a cada situação e promovendo proliferação ou inibição (LENHARO & COSSO, 2001; SCHLIEPHAKE, 2002).

Os principais FC liberados pelos grânulos plaquetários alfa são: FC de transformação beta (TGF- β), FC derivado de plaqueta (PDGF), FC semelhante à insulina I (IGF-I), FC

fibroblástico (FGF), FC epidermal (EGF), FC vascular endotelial (VEGF), FC do tecido conjuntivo (CTGF) (CARMONA, 2006; MAIA, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Fonte e função dos fatores de crescimento contidos grânulos plaquetários alfa.

FC	Fonte	Função	Referência
TGF- β	Plaquetas, matriz óssea e cartilaginosa, linfócitos T (Th1) ativados, macrófagos, monócitos e neutrófilos.	Pertence a uma superfamília que inclui: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Estimula a proliferação de céls. mesenquimais indiferenciadas; estimula quimiotaxia endotelial e angiogênese; regula o efeito mitogênico de outros FC. O TGF- β 1 é o mais importante sendo responsável pela maturação celular, migração fibroblástica e síntese de matriz extracelular. Existe um leve antagonismo entre o TGF- β e o PDGF.	PIERCE et al., (1991); BAMES et al. (1999); MARSOLAIS & FRENETTE (2005); VILELLA, (2007).
PDGF	Plaquetas, osteoblastos, céls. endoteliais, macrófagos, monócitos e céls. musculares lisas.	Mitogênico para céls. mesenquimais, osteoblastos, céls. do tecido conjuntivo e fibroblastos, estimula a quimiotaxia de fibroblastos, macrófagos e neutrófilos, regula síntese de colágeno.	FRIESEL & MACIAG, (1995); PIERCE et al., (1991); PONTUAL & MAGINI, (2003)
IGF-I	Plaquetas	Mitogênico para céls. da linhagem osteoblástica, acelera a osteogênese quando combinado com o TGF- β ou PDGF.	GIANNOBILE, (1999).
FGF	Plaquetas, céls. mesenquimais, macrófagos, condrócitos e osteoblastos.	Promove o crescimento e diferenciação dos condrócitos e osteoblastos; é mitogênico para céls. mesenquimais, condrócitos e osteoblastos.	ROSIER et al., (1998).
EGF	Plaquetas, macrófagos e monócitos.	Estimula a quimiotaxia e angiogênese endotelial; estimula a mitogênese epitelial; regula síntese de colagenase.	CANALIS et al., (1989); STEENFOS, (1994).

VEGF	Plaquetas e céls. endoteliais.	Aumenta a angiogênese e permeabilidade vascular; estimula a mitogênese de céls. endoteliais.	MARTIN et al., (1992); MARSOLAIS & FRENETTE (2005);
CTGF	Endocitose por plaqueta na medula óssea	Promove angiogênese; regeneração da cartilagem; fibrose e adesão plaquetária.	HOM & MAISEL, (1992); KUBOTA et al., (2004).

Fonte: Modificado a partir de Everts et al., (2006).

É recomendado que as plaquetas sejam ativadas próximo ao momento da aplicação terapêutica, de forma a assegurar uma concentração adequada de FC no local da lesão (MAIA, 2008). Marx (2001) relata que em dez minutos e na primeira hora, 70% e 100% dos FC já foram liberados, respectivamente. Saldalamacchia (2004) relata que a liberação dos FC inicia aproximadamente dez minutos após a ativação plaquetária, destes 95% já estão pré-sintetizados e em uma hora todos já foram liberados, porém as plaquetas continuam a sintetizar e a secretar proteínas adicionais até a sua morte (5 a 10 dias).

2.5. Trombocitopenia

A trombocitopenia é a diminuição no número de plaquetas abaixo do valor de referência para a espécie. Em equinos a trombocitopenia é incomum e normalmente ocorre secundária a outras patologias (SELLON, 1996). Os cinco mecanismos que podem levar a trombocitopenia são: a produção diminuída de plaquetas na medula óssea, destruição de plaquetas, aumento no consumo de plaquetas durante o processo de coagulação, sequestro e perda de plaquetas (LOPES et al., 2007).

2.5.1. Produção diminuída de plaquetas

A produção diminuída de plaquetas está relacionada com qualquer distúrbio que prejudique a medula óssea em produzir megacariócitos e geralmente cursa com pancitopenia

(LOPES et al., 2007). Dentre as causas mais comuns, estão: mieloptise, doenças mieloproliferativas, pancitopenia idiopática e drogas mielosupressoras (SELLON & WISE, 2010).

A mieloptise é o processo patológico que resulta na inabilidade da medula óssea em produzir células hematopoiéticas normais. Nas desordens mieloproliferativas ocorre proliferação neoplásica de uma única linha celular hematológica. Esta é a causa mais comum de mieloptise (SELLON, 1998). Outras causas de diminuição da produção de plaquetas nos equinos é a aplasia idiopática da medula óssea, em que os animais acometidos apresentam a medula óssea difusamente hipocelular sem evidência de neoplasia ou fibrose. Drogas mielosupressoras como a fenilbutazona e o cloranfenicol também podem causar trombocitopenia (SELLON & WISE, 2010).

2.5.2. Destruição das plaquetas

A destruição de plaquetas fica caracterizada quando elas excedem a capacidade da medula óssea em repor a perda de plaquetas, ocorrendo a redução no seu número na circulação por causas externas à medula óssea (SELLON, 1998). As plaquetas são removidas da circulação pelo sistema mononuclear fagocitário, especialmente macrófagos do baço e células de Kupffer (SELLON & WISE, 2010). Dentre as causas mais comuns de destruição das plaquetas estão: as trombocitopenias imunomediadas primária e secundária, trombocitopenia aloimune e causas não imunomediadas (SELLON, 1998).

A trombocitopenia imunomediada é resultante do aumento de imunoglobulinas e/ou complemento na superfície da membrana das plaquetas (MYERS et al., 1982; NEL et al., 1983; COURT et al., 1987). Ela pode ser classificada em primária ou secundária. A trombocitopenia imunomediada primária é resultante de anticorpos produzidos contra a superfície de plaquetas normais (SELLON, 1998). A secundária é resultante da produção de anticorpos contra complexos imunes ou corpos estranhos (como fármacos ou agentes infecciosos) aderidos à membrana plasmática das plaquetas. Os equinos acometidos podem apresentar infecções bacterianas como a erlichiose granulocítica equina, neoplasias como o linfossarcoma (REEF et al., 1984), ou infecções virais como a anemia infecciosa equina (CLABOUGH et al., 1991). A trombocitopenia aloimune ocorre em potros neonatos como consequência da absorção passiva de anticorpos anti-plaquetas no colostro. As causas não imunomediadas incluem: picada de cobra, fármacos e toxinas (SELLON & WISE, 2010).

Trombocitopenia por destruição de plaquetas também tem sido descrita em seres humanos e em equinos tratados com heparina (DUNCAN et al., 1983).

2.5.3. Aumento no consumo de plaquetas

O aumento do consumo de plaquetas ocorre na coagulação intravascular disseminada (CID) é uma doença complexa que resulta da ativação generalizada e sistêmica dos mecanismos da coagulação. Esta não é uma condição primária e ocorre secundariamente a várias doenças inflamatórias ou do sistema gastrointestinal dos equinos (SELLON, 1996).

2.5.4. Sequestro de plaquetas

O principal local de seqüestro de plaquetas é o baço. Este órgão pode armazenar cerca de 75% das plaquetas circulantes, em condições de esplenomegalia, causando trombocitopenia transitória, assim como em casos de stress. A endotoxemia também pode causar acúmulo de plaquetas no baço (FERREIRA NETO et al., 1981).

2.5.5. Perda de plaquetas

A retirada de plaquetas da corrente sanguínea pode ocorrer em casos de traumas e hemorragias externas, ou inapropriada, quando da ativação sistêmica ou local de mecanismos homeostáticos (SELLON & WISE, 2010). A trombocitopenia causada por hemorragia ou trauma geralmente varia de leve a moderada e é reversível. Nessa situação o número de plaquetas normalmente retorna ao valor normal em pouco tempo em resposta ao aumento na demanda (SELLON, 1998).

A utilização de sangue de animais trombocitopênicos para obtenção do PRP, compromete a qualidade final do produto, pois Barbosa et al. (2008) observaram que o resultado final do número de plaquetas no PRP era dependente da contagem inicial no sangue total do animal. Estes mesmos autores afirmam que a presença de trombocitopenia ou um número menor de plaquetas são fatores limitantes para obtenção do PRP.

2.6. Aplicações do PRP na medicina humana

Marx et al. (1998) relatam o uso clínico do PRP como fonte autóloga de fatores de crescimento associado a enxerto ósseo autólogo para reconstrução de defeitos ósseos na mandíbula. No referido experimento foram utilizados 88 pacientes divididos em dois grupos, em um foi utilizado apenas enxerto ósseo para preenchimento dos defeitos ósseos e no outro foi utilizado enxerto ósseo associado ao PRP. Os autores observaram que o grupo tratado com PRP apresentou aumento na formação e na densidade óssea avaliados através de radiologia e ultrassonografia durante o período de seis meses.

Utilizando o método manual de obtenção de PRP, Anitua (1999) tratou 20 pacientes submetidos à extração dentária em futuros sítios para colocação de implantes. Após a aplicação de PRP observou regeneração óssea e dos tecidos moles mais rápido, e ausência de efeitos negativos, como o risco de infecção e/ou transmissão de doenças, por ser um produto autógeno.

Anitua et al., (2007) trataram com PRP pacientes humanos com ruptura do tendão de Aquiles. Neste estudo os atletas tratados com cirurgia e PRP foram comparados com um grupo controle tratados apenas com cirurgia. Os autores observaram que os pacientes tratados com cirurgia e PRP recuperaram a amplitude de movimento e voltaram mais rapidamente para suas atividades atléticas do que o grupo tratado apenas com cirurgia. Ao exame ultrassonográfico foi observada redução da área transversal dos tendões tratados com PRP.

Rossi Júnior et al., (2008) utilizaram PRP associado enxerto ósseo autógeno do ílio para preenchimento de uma extensa cavidade na mandíbula resultante da exérese de um cisto mandibular. Após seis meses do procedimento cirúrgico ao exame radiológico revelou reparação óssea de toda cavidade cística.

Sanchez et al., (2012) utilizaram três aplicações intra-articulares de PRP a intervalos de uma a duas semanas em 40 pacientes humanos com histórico de osteoartrite na articulação coxofemoral. Durante o período de acompanhamento de seis meses, foi observada redução na intensidade da dor em 30% dos pacientes.

2.7. Aplicações do PRP na medicina equina

Carter et al., (2003) avaliaram a cicatrização de feridas na parte distal de membros em um equino tratando um membro com um gel de PRP e outro com solução salina. A cicatrização no grupo tratado com o gel de PRP foi superior apresentando melhor diferenciação epitelial e organização de colágeno. Já De Rossi et al., (2009) avaliaram a cicatrização de feridas cirúrgicas experimentais no pescoço em seis cavalos de sela tratados com PRP gel. As feridas tratadas com PRP também apresentaram melhor diferenciação epitelial e aceleração na organização de colágeno da derme comparado com o grupo controle. No entanto, é importante considerar que, havendo diferença na diferenciação celular e migração de fibroblastos entre os tecidos do pescoço ou região do tronco e as células da parte distal dos membros, seria importante comparar a cicatrização destes quando tratados com PRP.

Argueles et al., (2005) observaram diminuição na intensidade da claudicação e melhora na imagem ultrassonográfica após aplicação intralesional de PRP em tendinites e desmites em sete cavalos de diferentes sexos, idades e raças. Maia (2008) utilizando PRP no tratamento da tendinite induzida no tendão do músculo flexor digital superficial em seis equinos hípidos observou menor intensidade de edema e dor, além de maior redução da área da lesão e melhor organização tecidual em comparação com o grupo controle

Carmona et al. (2007) ao utilizarem três aplicações de PRP intra-articular, com intervalo de duas semanas, no tratamento de osteoartrite em sete equinos adultos observaram uma diminuição significativa no grau de claudicação e redução no volume de líquido sinovial das articulações tratadas dois meses após a última aplicação.

Carmona & López (2011) trataram um cavalo com fratura na tuberosidade supraglenóide da escápula e no tubérculo menor do úmero com concentrado autólogo de plaquetas. Após três aplicações deste componente na articulação escápulo-umeral, os autores observaram recuperação total do membro afetado em 10 meses. Este resultado sugere que a aplicação deste componente autólogo pode resultar um benefício terapêutico também no tratamento de fraturas ósseas, pois fraturas como as descritas levam no mínimo 18 a 24 meses para que ocorra a reparação.

Yamada et al., (2011) avaliaram a eficácia do tratamento com células tronco mesenquimais (CTM) e PRP, em lesões condrais experimentalmente induzidas. Nos grupos tratados com PRP e CTM observaram preenchimento completo da lesão condral por uma quantidade satisfatória de tecido cicatricial de aspecto fibroso que se apresentava bem aderido

às bordas da lesão. O grupo controle apresentou falhas no preenchimento, tecido cicatricial friável e pouco aderido, erosões da cartilagem articular ao redor da lesão.

2.8. Protocolos de obtenção do PRP

Diversos protocolos para obtenção de PRP tem sido propostos com o objetivo de concentrar um maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma. A possibilidade de se obter PRP com custos menores, utilizando uma centrífuga convencional, fez surgir protocolos que, embora sejam mais trabalhosos e necessitem de aprendizagem por parte de quem irá realizar o procedimento, permitem a preparação do PRP com menor custo e em ambientes mais simples (VENDRAMIN et al., 2006) (Tabela 2).

Tabela 2: Protocolos de obtenção de PRP utilizado nas diferentes espécies

Referência	Protocolo	Volume de sangue	Espécie
FERES JUNIOR et al., (2004)	Centrifugação única 1400 rpm por 10 minutos (min)	20 ml	Humana
EFGU et al., (2004)	Centrifugação dupla 1ª: 300 g por 10 minutos 2ª: 5000 g por 5 minutos	9 ml	Coelho
CARMONA, (2006)	Centrifugação dupla 1ª: 120 g por 5 minutos 2ª: 240 g por 5 minutos	25 ml	Equina
FERRAZ et al., (2007)	Centrifugação dupla 1º: 800 rpm por 10 minutos 2ª: 1600 rpm por 10 minutos	40 ml	Canina
BARBOSA et al., (2008)	Centrifugação dupla 1ª: 1300 rpm por 8 minutos 2ª: 1300 rpm por 8 minutos	18 ml	Canina
MAIA, (2008)	Centrifugação dupla 1º: 120 g por 5 min 2ª: 473 g por 5 min	81 ml	Equina

VEDRAMIN et al., (2006)	Centrifugação dupla 1ª: 300 g por 10 minutos 2ª: 640 g por 10 minutos	10 ml	Humana
DE ROSSI et al., (2009)	Centrifugação dupla 1ª: 300 g por 10 minutos 2ª: 640 g por 10 minutos	10 ml	Equina
VENDRAMIN et al., (2009)	Centrifugação dupla 1ª: 400g por 10 minutos 2ª: 800g por 10 minutos	10 ml	Humana
MESSORA et al., (2009)	Centrifugação dupla 1ª: 160 g por 20 minutos 2ª: 400g por 15 minutos	10 ml	Coelho

CAPÍTULO 1

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

AVALIAÇÃO DE SETE PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, Gian Vitor Freitas Zacarias, Camila Cantarelli, Marcos Matoso, Gabriele Biavaschi da Silva, Karin Erica Brass, Flávio Desessards De La Côte, Anna Laeticia da Trindade Barbosa

CIÊNCIA RURAL, 2012

Avaliação de sete protocolos para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) na espécie equina

Evaluation of seven platelet- rich plasma (PRP) processing protocols in the equine species

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira^I Gian Vitor Freitas Zacarias^{II} Camila Cantarelli^{II} Marcos Matoso^I Karin Erica Brass^{III} Flávio Desessards De La Corte^{III*} Anna Laeticia da Trindade Barbosa^I

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar sete diferentes protocolos para obtenção de PRP através do método manual quanto à capacidade de concentração das plaquetas, contaminação com leucócitos e hemácias e correlacionar a capacidade de concentração plaquetária com os níveis do fator de crescimento TGF- β_1 nas amostras de PRP. Dez equinos, saudáveis, com idade média de 7 anos ($\pm 2,39$), pesando em média 500kg ($\pm 67,1$) foram usados para avaliar sete protocolos de obtenção de PRP. Os protocolos testados variaram quanto à velocidade e tempo nas duas centrifugações. As variáveis analisadas nas amostras de PRP foram: concentração de plaquetas, presença de leucócitos e hemácias, e níveis de TGF- β_1 quantificados pelo teste ELISA. Os resultados deste estudo não demonstraram diferenças significativas entre os protocolos testados quanto à capacidade de concentração de plaquetas e quanto aos níveis de TGF- β_1 . Entretanto, houve diferença significativa entre o protocolo I e os

^I Aluno programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

^{II} Aluno da graduação em Medicina Veterinária, UFSM.

^{III} Professor associado ao Departamento de Grandes Animais (DGA), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM. Av. Roraima, 1000, Hospital Veterinário, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8036. E-mail: delacorte2005@yahoo.com.br *Autor para correspondência.

demais protocolos por este apresentar maior número de hemácias e leucócitos nas amostras de PRP, sendo considerado um protocolo inadequado para o volume de sangue utilizado. Os demais protocolos podem ser utilizados para se obter PRP de sangue equino.

Palavras- chave: PRP, equino, centrifugação, TGF- β_1 .

ABSTRACT

PRP is a small volume of plasma that contains a high numbers of platelets and their growth factors. The aim of this study was to evaluate seven different protocols to obtain PRP using the manual method according to their capacity to concentrate platelets, leukocyte and erythrocyte contamination and correlation between platelet count and growth factor TGF- β_1 levels in PRP samples. Ten healthy horses with a mean age of 7 years (± 2.39), weighing on average 500 kg (± 67.1) were used to obtain PRP. The protocols tested varied according to the speed and time used on both centrifugations. The variables analyzed on the PRP samples were: platelet concentration, leukocyte and erythrocyte contamination, and levels of TGF- β_1 quantified by ELISA. No significant differences between protocols were observed regarding the ability to concentrate platelets and TGF- β_1 levels. However, protocol I showed significant more erythrocyte and leukocyte contamination in PRP samples than the other protocols, being considered an inadequate protocol for the volume of blood used in this experiment. The remaining protocols are suitable for extracting PRP.

Key words: PRP, horse, centrifugation, TGF- β_1 .

INTRODUÇÃO

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos, anucleados, de forma discóide encontrados na corrente sanguínea que se originam a partir dos megacariócitos na medula óssea (HANDIN et al., 1995). Esses fragmentos além de participarem do processo de hemostasia também atuam na cicatrização de feridas e formação de um novo epitélio. A concentração de plaquetas no sangue total dos equinos pode variar entre 100.000 e 350.000 plaquetas μL^{-1} que permanecem viáveis por aproximadamente 10 dias na circulação sanguínea (SCHALM et al., 1975).

Em meados da década de 90, Whitman et al., (1987) instituiu o uso de gel de plaquetas na odontologia visando acelerar o reparo da ferida cirúrgica e a regeneração óssea. O gel de plaquetas surgiu, então, como uma alternativa viável para minimizar as complicações decorrentes do uso da cola de fibrina.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido a partir, de uma ou duas centrifugações do sangue total (VENDRAMIN et al., 2006; CARMONA, 2006; MESSORA et al., 2009) onde o produto final é um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e, conseqüentemente, fatores de crescimento (VENDRAMIN et al., 2006). Como o PRP é preparado a partir de uma pequena quantidade de sangue autógeno (LIEBERMAN et al., 2002; KEVY & JACOBSON, 2004) ele é um produto de fácil aquisição e baixo custo, o que o torna uma opção muito viável no tratamento de várias patologias (MAIA & SOUZA, 2009).

Os fatores de crescimento (FC) provenientes dos α -grânulos plaquetários estimulam a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, síntese de colágeno, neovascularização e deposição de matriz extracelular (EVERTS et al., 2006). Na literatura são descritos pelo menos sete FC derivados dos α -grânulos plaquetários: FC de transformação beta (TGF- β), FC derivado de plaqueta (PDGF), FC semelhante à insulina I (IGF-I), FC fibroblástico (FGF), FC epidermal (EGF), FC vascular endotelial (VEGF), FC do tecido conjuntivo (CTGF)

(CARMONA, 2006; MAIA, 2008; BARBOSA et al., 2008). Devido a estas propriedades, o PRP se tornou um produto com grande potencial na integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de gordura, bem como estimulante na cicatrização de feridas (VENDRAMIN et al., 2009).

O PRP tem sido bastante estudado na odontologia humana, sendo aplicado, principalmente, em pequenos enxertos ósseos realizados na região alveolar de implantes dentários e em cirurgias periodontais e maxilofaciais (WHITMAN et al., 1987; MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; MARX, 2004) . Na medicina humana, o uso do PRP tem apresentado efeitos positivos em cirurgias plásticas (VEDRAMIN et al., 2006), ortopédicas (MISHRA & PAVELKO, 2006), e também no tratamento de osteoartrite (SANCHEZ et al., 2012). Entretanto, na medicina veterinária equina, o uso do PRP é mais recente com sua utilização tendo sido descrita no tratamento de feridas (CARTER et al., 2003), tendinites e desmites (MAIA, 2008; SUTTER et al., 2008), osteoartrite (CARMONA et al., 2007), e na cicatrização de fraturas (CARMONA & LOPEZ, 2011).

Diversos protocolos de obtenção de PRP tem sido propostos com o objetivo de concentrar um maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma (MARX, 2004; VENDRAMIN et al, 2006; CARMONA, 2006; MAIA, 2008; VENDRAMIN et al 2009). Porém, muitos aspectos sobre estes protocolos ainda necessitam ser elucidados tais como a concentração de plaquetas e fatores de crescimento necessários para exercer um efeito terapêutico, a influência da presença de hemácias e leucócitos no PRP, a relação entre a concentração de plaquetas e os fatores de crescimento após o processamento das amostras de sangue.

O objetivo do presente estudo foi avaliar sete protocolos de obtenção de PRP quanto à capacidade de concentração plaquetária, nível de contaminação com hemácias e leucócitos, e

correlação entre a concentração plaquetária e a de fator de crescimento TGF- β nas amostras de PRP obtidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais

Dez cavalos adultos (cinco machos e cinco fêmeas), com idade média de 7 anos ($\pm 2,39$), pesando em média 500kg ($\pm 67,1$), clinicamente sadios, cujos parâmetros hematológicos e bioquímicos se encontravam dentro dos valores de referência foram utilizados neste estudo. Só foram incluídos animais que apresentaram um número de plaquetas no sangue total superior a $100.000 \mu\text{L}^{-1}$. Durante o experimento os animais foram mantidos em baias individuais, com alimentação à base de alfafa, ração comercial e água *ad libitum*.

Coleta de sangue

O sangue foi colhido por meio de punção da veia jugular com agulha 16G e armazenado em duas bolsas de sangue de 450 ml (CDPA-1) contendo citrato/fosfato/dextrose/adenina como anticoagulante.

Processamento das amostras

Para a avaliação de cada protocolo a ser testado, foram utilizados neste experimento 100 ml de sangue acondicionados assepticamente em três tubos Falcon (com capacidade para 50 ml), sendo que em um tubo foram depositados 30 ml e em dois 35 ml de sangue. Os tubos Falcon contendo o sangue foram centrifugados uma primeira vez para separar o plasma da zona de névoa (camada flogística que contém os leucócitos) e hemácias. O plasma sobrenadante contendo as plaquetas foi transferido para um segundo tubo Falcon e novamente centrifugado, conforme cada protocolo testado. Após esta segunda centrifugação o plasma sobrenadante foi descartado sendo conservados apenas 10 ml de PRP, equivalentes a 10% do

volume do sangue total utilizado inicialmente no seu preparo. As amostras de PRP foram acondicionadas em tubos eppendorfs.

Protocolos utilizados

Os protocolos (P) utilizados no processamento do sangue para a obtenção de PRP variaram quanto à velocidade e tempo de centrifugação como segue: PI centrifugação a 120g e 240g, ambas por 5 min (CARMONA, 2006); PII centrifugação a 120g durante 10 minutos seguida de 240g por 10 min (CARMONA, 2006 modificado); PIII centrifugação a 300g e 640g por 10 min (VENDRAMIN et al., 2006); PIV centrifugação a 400g e 800g por 10 min (VENDRAMIN et al., 2009); PV centrifugação a 224g e 440g por 10 min; PVI centrifugação a 113g e 652g por 10 e 5 min (BARBOSA, 2012 - informe verbal), respectivamente; PVII centrifugação a 120g e 473g por 5 min (MAIA, 2008) (Tabela 1). Os protocolos PI, PIII, PIV e PVII foram adaptados dos protocolos originais (CARMONA, 2006; VENDRAMIN et al., 2006; VENDRAMIN et al., 2009; MAIA, 2008) já que foi usado um volume maior de sangue do que o utilizado pelos autores em seus respectivos experimentos.

Avaliação laboratorial das amostras

Amostras de 2 ml de sangue total e de PRP, obtidas a partir de cada protocolo foram enviadas em tubos eppendorf ao laboratório para determinação do número de plaquetas, hemácias e leucócitos. A contagem das plaquetas foi realizada pelo método manual. As amostras de sangue e PRP foram diluídas e homogeneizadas em líquido de Brecher com oxalato de amônia a 1%. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico binocular com aumento de 400x para visualização. A contagem das hemácias e leucócitos foi realizada com um contador hematológico semiautomático por impedância BCvet-2800 Mindray® (STOCKHAM et al., 2002). A concentração de plaquetas ([plaquetas]) foi determinada dividindo o número de plaquetas no PRP pelo número de plaquetas no sangue total.

Amostras obtidas a partir de cada protocolo foram estocadas em tubos eppendorf a -80°C para dosagem do fator de crescimento TGF- β_1 usando o kit para ELISA Quantikine.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados usando ANOVA e a comparação múltipla entre as médias das concentrações plaquetária foi realizada pelo teste de Turkey. A análise de correlação foi usada para testar a relação entre a contagem de plaquetas e TGF- β_1 . Todas as análises foram realizadas usando o software Graphpad 5.0 com nível de significância em $P < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

RESULTADOS

Plaquetas- Os resultados da concentração de plaquetas utilizando sete diferentes protocolos estão apresentados na Figura 1. Não foi observada diferença na capacidade de concentrar plaquetas entre os sete protocolos usados na obtenção do PRP neste estudo (Figura 1-A) ($p > 0,05$). Todos os protocolos testados permitiram obtenção de concentração plaquetária média de quatro vezes acima da concentração de plaquetas presente no sangue total. Em ordem decrescente os protocolos que resultaram na maior concentração média de plaquetas foram: PVI (5,4); PIV (4,8) = PV (4,8); PII (4,7); PIII (4,6); PVII (4,5); PI (4,1).

Leucócitos- Considerando a presença de leucócitos no PRP (Figura 1-B) o PI, seguido dos protocolos PVII, PII, PVI, PV, PIV, PIII, foi o protocolo que apresentou maior concentração destas variáveis nas amostras analisadas ($p < 0,05$).

Hemácias- Quanto à presença de hemácias (Figura 1-C) nas amostras de PRP os resultados foram semelhantes aos encontrados nos leucócitos na ordem decrescente de contaminação (PI; PVII; PII; PVI; PV; PIV = PIII), não houve contaminação com hemácias nas amostras obtidas a partir dos PIII e PIV ($p < 0,05$).

TGF- β_1 - Neste estudo não observamos diferença significativa entre os sete protocolos quanto à presença do FC TGF- β_1 nas amostras analisadas. Não houve correlação entre as concentrações plaquetárias, contagem de plaquetas e as concentrações de TGF- β_1 nos sete protocolos testados ($p < 0,05$). As médias do TGF- β_1 nos sete protocolos na ordem decrescente foram: 14053 ± 5862 pg/ml (PI), 12397 ± 1517 pg/ml (PVII), 10518 ± 2515 pg/ml (PVI), 10004 ± 2440 pg/ml (PV), 8796 ± 2294 pg/ml (PIV), 7634 ± 1218 pg/ml (PII) e 7198 ± 2996 pg/ml (PIII) ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O preparo do PRP pelo método manual exige a determinação do melhor protocolo a ser utilizado, baseado na velocidade e tempo de centrifugação, o anticoagulante e sistema de coleta de sangue, a quantidade de sangue a ser utilizado, treinamento pessoal, bem como, o método de contagem das plaquetas (EFEOGLU et al., 2004; JAMESON, 2007). Neste estudo foram usados apenas protocolos que utilizam duas centrifugações porque protocolos que incluem somente uma centrifugação não produzem PRP, mas sim uma mistura de plasma pobre em plaquetas (PPP) e PRP o que resulta em baixa concentração total de plaquetas (MARX, 2001; MACEDO, 2004).

A maior força g e maior tempo na primeira e/ou segunda centrifugação utilizada nos protocolos PIV, PV e PVI resultaram em maior concentração plaquetária com médias de 4,7, 4,7 e 5,4, respectivamente. A quantidade necessária de plaquetas para auxiliar nos processos cicatriciais é incerta (MC LELLAN & PLEVIN, 2011). A recomendação atual é que se tenha plaquetas viáveis no PRP em concentração 3 a 5 vezes superior que a presente no sangue total (MARX, 2004; SMITH et al., 2006). Fato este observado em nosso experimento em todos os protocolos testados onde as médias das concentrações plaquetas se mantiveram neste intervalo.

A média de concentração das plaquetas de 4,6 no PIII foi semelhante ao observado por Vendramin et al., (2006). Quando se compara as médias de concentração de plaquetas no PRP obtidas com o PI (4,1) com Carmona, (2006) e do PVII (4,5) com Maia, (2008) se observa que as médias obtidas neste trabalho foram superiores as descritas por estes autores em seus respectivos estudos utilizando mesmo protocolo, porém com diferentes volumes de sangue. No PIV a concentração de plaquetas no PRP foi de 4,8 apresentando resultado inferior ao observado pelo autor deste protocolo utilizando menor volume de sangue total (VENDRAMIN et al., 2009).

Através do método manual de obtenção do PRP a média do número de plaquetas nos sete protocolos foi de 618.757 ± 91.630 plaquetas/ml, foi obtido um número maior de plaquetas que o observado por Carmona (2006) (250.000 plaquetas/ml) utilizando método manual e Carter et al., (2003) (490.000 plaquetas/ml) utilizando o método automático, e contagem menor de plaquetas no PRP que Sutter et al., (2004) (855.000 plaquetas/ml) utilizando o método semi-automático de obtenção de PRP.

Considerando a contaminação das amostras de PRP com leucócitos (Figura 1-B) e hemácias (Figura 1-C), o PI, PVII e PII foram os protocolos que apresentaram maiores índices destes constituintes nos ensaios ($p < 0,05$). Isto é atribuído à menor força g e menor tempo de centrifugação destes protocolos em relação aos outros, e ao maior volume de sangue utilizado neste experimento que o utilizado pelos autores destes protocolos.

Marx & Garg (1999) relatam que a presença de leucócitos no PRP, lhe confere resistência natural a processos infecciosos e /ou alérgicos. McCarrel & Fortier (2009) não consideram a presença de leucócitos no PRP um fator positivo e sugerem uma relação entre a presença de leucócitos no PRP, aumento do catabolismo e diminuição da síntese de matriz extracelular nos tecidos. Isto pode ser importante quando se considera o uso intra-articular do PRP. Carmona (2006) recomenda minimizar o número de leucócitos no PRP quando se deseja

utilizá-lo em articulações. Mais ainda, parece haver uma correlação positiva entre as células brancas do sangue e o fator de necrose tumoral e a IL-1 (MC CARREL & FORTIER, 2009). Portanto, o método para a obtenção de PRP mais adequado é aquele que também resulta na menor contaminação com leucócitos para maximizar os benefícios das plaquetas.

Neste estudo não foram observadas diferenças significativas entre os protocolos quanto à capacidade de concentração de plaquetas e os níveis de TGF- β_1 fato este também observado por Vendrusculo et al., (2011). O PI e PVII foram os protocolos que apresentaram maior quantidade de TGF- β_1 nas amostras. Esses protocolos também foram os que apresentaram a maior presença de leucócitos. Segundo Weibrich et al., (2003) existem outras células além das plaquetas, como leucócitos, que tem a capacidade de liberar fatores de crescimento. A média de TGF- β_1 nas amostras nos sete protocolos foi de 10085 ± 2492 pg/ml sendo superior ao descrito por Carter et al., (2003) (7480 pg/ml), mas inferior as encontradas por Sutter et al., (2004) (23600 pg/ml) e Carmona (2006) (12515 pg/ml).

Embora o PRP seja uma alternativa terapêutica promissora na medicina equina, ainda existem muitas lacunas relativas ao seu uso que devem ser preenchidas. Para o uso seguro e eficaz do PRP em cavalos é necessário determinar: a frequência ideal de administração, bem como o volume a ser utilizado, a necessidade de ativação das plaquetas em algumas ou em todas as terapias, e o momento em que o uso desta terapia é mais eficiente.

CONCLUSÃO

Apesar de não observarmos diferenças significativas entre os protocolos testados, os protocolos mais adequados para obtenção de PRP foram: PIV, PV e PVI. Estes apresentaram as maiores concentrações plaquetárias, níveis favoráveis de TGF-B1 e menor índice de contaminação com hemácias e leucócitos.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) com o número do parecer 045/2011.

INFORME VERBAL

Protocolo da tese em desenvolvimento “Células-tronco mononucleares associadas ao plasma rico em plaquetas na consolidação da falha óssea no cão” da autoria de Anna Laeticia da Trindade Barbosa na Universidade Federal de Santa Maria.

REFERÊNCIAS

- ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparations of future sites for implants. **International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.14, p.529-535, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453668>. Doi: 10453668
- BARBOSA, A.L.T. et al. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n5/a21v38n5.pdf>. Doi:10.1590/S0103-84782008000500021
- CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse**. 2006. 91f. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária. Universidade Autònoma de Barcelona. Disponível em: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5732/jucr1de1.pdf?sequence=1>
- CARMONA, J.U. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, Fort Collins, v. 27, n. 4, p. 167-170, 2007. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080607000846>.

Doi:

10.1016/j.jevs.2007.02.007

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 9, p. 1-5, 2011.

Disponível em: [http://www.j-evs.com/article/S0737-0806\(11\)00100-6/abstract](http://www.j-evs.com/article/S0737-0806(11)00100-6/abstract).

Doi:10.1016/j.jevs.2011.03.008

CARTER, C.A. et al. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 244-255, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014480003000170>.

Doi:10.1016/S0014-4800(03)00017-0

EFEOGLU, C. et al. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407; 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15510363>. Doi: **10.1016/j.joms.2004.06.047**

EVERTS, P.A.M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of Extracorporeal Technology**, Bloomsburg, v. 38, n. 2 p. 174-187, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921694>. Doi:16921694

HANDIN, R.I., et al. Blood: principles, practice of hematology. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1995.

JAMESON, C. A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. **LabMedicine**, v. 38, n. 1, p. 39-42, 2007. Disponível em: <http://labmed.ascpjournals.org/content/38/1/39.full.pdf+html>. Doi: **0.1309/**

3UA5HWYVKNCE01AR

KEVY, S.V; JACOBSON, M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **Journal of ExtraCorporeal Technology**, v. 36, n. 1, p. 28-35, 2004.

LIEBERMAN, J.R. et al. The role of growth factors in the repair bone. **Journal of Bone Joint Surgery**, v. 84, n. 6, p. 1032-1042, 2002.

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

MAIA L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000300009&script=sci_arttext.

Doi:10.1590/S0100-736X2009000300009

MAIA, L.; SOUZA, M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1267-1274, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000400050&script=sci_abstract&tlng=pt. Doi:10.1590/S0103-

84782009005000040

MARX, R.E., et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210498900294>. Doi: 10.1016/S1079-2104(98)90029-4

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

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

<http://www.dierenartshoegaerts.be/nl/therapie/injecties/documents/prpwhatisprpandwhatisnot.pdf>

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, n. 62, p.489-496, 2004. Disponível em: <http://www.joms.org/article/S0278-2391%2803%2901272-2/abstract>. Doi:10.1016/j.joms.2003.12.003

MC CARREL, T.; FORTIER, L.A. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, thehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **Journal Orthopaedic Research**, v. 27, p. 1033-1042, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.20853/abstract>. Doi: 10.1002/jor.20853

MC LELLAN, J.; PLEVIN, S. Evidence- based clinical question. Does it matter which platelet-rich plasma we use? **Equine Veterinary Education**, v. 23, n. 2, p. 101-104, 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3292.2010.00185.x/pdf> Doi: 10.1111/j.2042-3292.2010.00185.x

MESSORA, M.E., et al. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009. Disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=153013734004>.

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. **American Journal Sports of Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1-5, 2006. Disponível em: <http://ajs.sagepub.com/content/34/11/1774.full.pdf+html>. Doi: 10.1177/0363546506288850

SÁNCHEZ, M. et al. Ultrasound-guided platelet –rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. **Rheumatology**, v.51, n.1, p.144-150, 2012. Disponível em:

<http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/51/1/144.full.pdf+html>.

Doi:10.1093/rheumatology/ker303

SCHALM, O.W et al. Normal values in blood morphology with comments of species characteristics in response to disease. In: _____. **Veterinary Hematology**. 3^a ed., Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 3, p. 82-218, 1975.

SMITH, J.J. et al. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** v. 19, p. 43-47, 2006. Disponível em: <http://www.vetcell.com/assets/Research-papers/Anabolic-effects.pdf>

SUTTER, W.W. et al. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 65, n. 7, p. 924-930. 2004. Disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2004.65.924>

Doi: 10.2460/ajvr.2004.65.924

SUTTER, W.W. et al. Intralesional injection of platelet-rich plasma for mid-body suspensory ligament desmitis in Standardbred race horses. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 10, p. 1515-1520, 2008. Disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.232.10.1515>

Doi: 10.2460/javma.232.10.1515

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M, A. **Fundamental of Veterinary Clinical Pathology**. Editora Iowa State, 2002. Cap. 2., p. 31 - 58.

VENDRAMIN, F.S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.

33, n. 1, p. 24-28, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-69912006000100007&script=sci_arttext. Doi:10.1590/S0100-69912006000100007

VENDRAMIN, F.S. et. al. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n. 2, p. 212-218, 2009. Disponível em: http://www.rbc.org.br/detalhe_artigo.asp?id=471

VENDRUSCULO, C.P. et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. In: XII Conferência anual da ABRAVEQ, 2011, Campinas, São Paulo. **Anais...** Abraveq- Associação Brasileira dos Médicos Veterinários de Equídeos, 2011, v. 35, p. 239, p. 189.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. **Clinical Oral Implants Research**, p. 357-362, 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0501.2003.00810.x/abstract>
Doi: 10.1034/j.1600-0501.2003.00810.x

WHITMAN, D. H. et al. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 55: p.1294-1299, 1997. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239197901877>
Doi: 9371122

Tabela 1: Força e tempo de centrifugação dos protocolos usados para obtenção de PRP.

Protocolos	Primeira centrifugação		Segunda centrifugação	
	Força (g)	Tempo (min)	Força (g)	Tempo (min)
I	120	5	240	5
II	120	10	240	10
III	300	10	640	10
IV	400	10	800	10
V	224	10	440	10
VI	113	10	652	5
VII	120	5	473	5

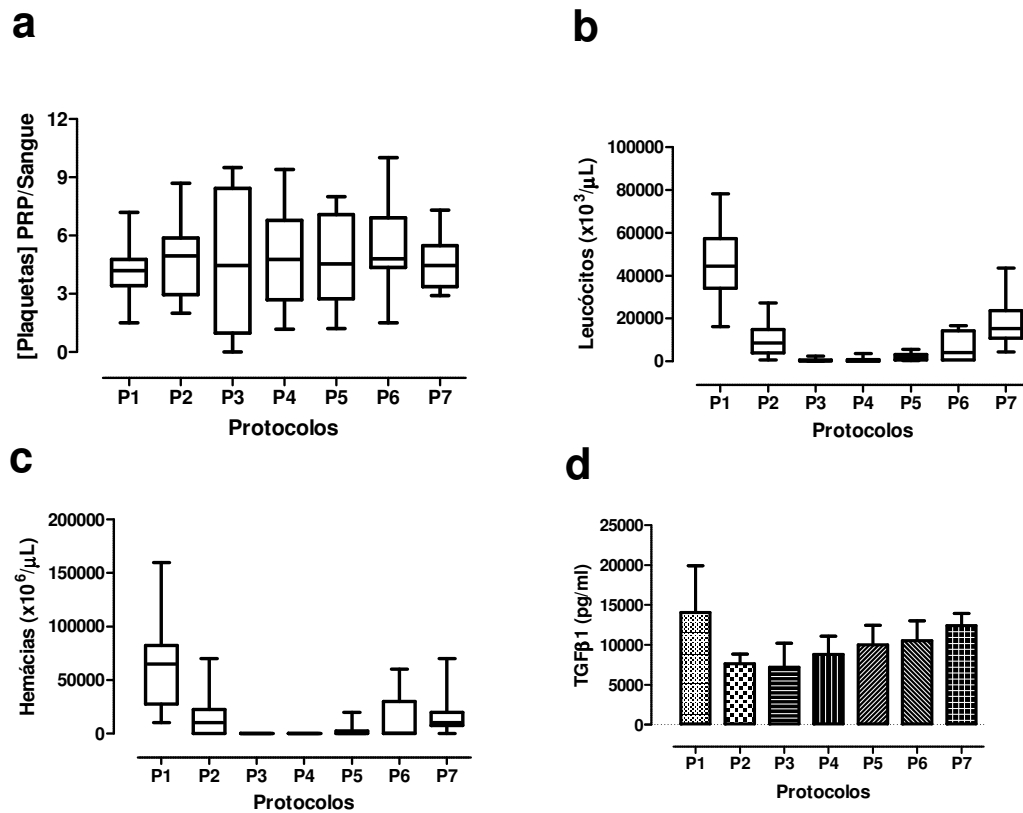


Figura 1- a) Concentração de plaquetas ([plaquetas]) nos sete protocolos testados para obtenção de PRP. b) Número de leucócitos nas amostras de PRP dos sete protocolos testados. c) Número de hemácias nas amostras de PRP. d) Concentração do fator de crescimento TGF- β ₁ nas amostras de PRP nos sete protocolos.

4. CONCLUSÃO

- O PRP é uma terapia promissora surgindo cada vez mais interesse pela utilização deste produto na clínica médica e cirúrgica de equinos.

- A obtenção do PRP pelo método manual é uma técnica simples e com custo baixo, porém exige experiência pessoal para execução.

- Apesar de não observarmos diferenças significativas quanto a capacidade de concentração plaquetária e os níveis dos fatores de crescimento entre os sete protocolos utilizados neste experimento, sugerimos para obtenção do PRP os protocolos PIV, PV e PVI devido à menor contaminação com hemácias e leucócitos, as maiores médias de concentração de plaquetas e níveis consideráveis de TGF- β_1 nas amostras analisadas.

- A maximização do uso do PRP pode ser realizada através de estudos futuros onde se consiga o congelamento ou da liofilização do PRP através da sua obtenção pelo método manual.

5. REFERÊNCIAS

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

ANITUA, E. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, p.4-15, 2004.

ANITUA, E. et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. **Rheumatology**, v.46, p.1769-1772, 2007.

ARGUELLES, D. et al. Clinical experiences with platelet-rich plasma as a treatment of tendon and ligament injuries in the horse. In: **Annual Scientific Meeting**, 16th, 2005, Ireland.

ARGUELLES, D. Autologous platelet concentrates as treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, v. 162, n.7, p.208-211, 2008.

BAMES, G.L. et al. Growth factor regulation of fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, Durhan, v.14, n.11, p.1805-1815, 1999.

BARBOSA, A.L.T. et al. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p. 1335- 1340, 2008.

BLOCKMANS, D. et al. Platelet activation. **Blood Reviews**, Cambridge, v.9, n.3, p.143-156, 1995.

CANALIS, E. et al. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v.140, n.3 p.530-537, 1989.

CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse**. 2006. 91f. Tese de doutorado em Medicina e Sanidade Animal, Universidade Autônoma de Barcelona.

CARMONA, J.U. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, Fort Collins, v.27, n.4, p.167-170, 2007.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 9, p. 1-5, 2011.

CARTER, C.A. et al. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 244-255, 2003.

CLABOUGH, D.L. et al. Immunemediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anaemia virus. **Journal of Virology**, v.65, p.6242-6251, 1991.

COURT, W.S. et al. Platelet surface-bound IgG in patients with immune and nonimmune thrombocytopenia. **Blood.**, v. 69, p. 278-283, 1987.

DE ROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.4, p.276-281, 2009.

DUNCAN, S.G. et al. Reduction of the red blood cell mass of horses: Toxic effect of heparin anticoagulant therapy. *American Journal Veterinary Research*, v. 44, p.2271- 2276, 1983.

DUSSE, L.M.S. et al. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.3, p. 193-197, 2008.

EFEOGLU, C. et al. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, n.11, p. 1403-1407, 2004.

EPPLEY, B.L. et al., Platelet quantification and growth factor analysis from platelet rich plasma: Implications for wound healing. **Plastic Reconstructive Surgery**, v.114, p. 1502-1508, 2004.

EVERTS, P.A.M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of Extracorporeal Technology**, Bloomsburg, v.38, n.2 p.174-187, 2006

FERRAZ, V.C.M. et al. Platelet concentration of platelet rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.6, p.435-440, 2007..

HARRISON, P.; CRAMER, E. M.. Platelet alpha-granules. **Blood Review**, Cambridge, v.7, n.1, p.52-62, 1993.

FERES JUNIOR, F. et al. Análise comparativa do índice de sucesso dos implantes osteointegrados com e sem a utilização de PRP no protocolo de fixação. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.25, p. 9-21, 2004.

FERREIRA NETO, J.M. et al. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte, Rabelo, 1981.

FRIESEL, R.E.: MACIAG, T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v.9, n.10, p.919-925, 1995.

GENTRY, P.A. Platelet biology. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, et al (eds). **Schulman's veterinary hematology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p. 459-466.

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

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

HOFFBRAND, A.V. et al. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: _____. **Fundamentos em Hematologia**. Artmed, 2004. Cap.18., p.244-257.

HOM, D. B.; MAISEL, R.H. Angiogenic growth factors: Their effects and potential in soft tissue wound healing. **Annals of Otolaryngology Rhinology Laryngology**, Iowa, v.101, n.4, p.349-354, 1992.

LANDESBURG, R. et al. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.58, n.3, p. 297-300, 2000.

LEMOS, J.J. et al. **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado**. 2002. Capturado em 01 de fevereiro de 2012. Online. Disponível na Internet: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225&idesp=6&ler=s>

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

LOPES, S.T.A. et al. **Manual de patologia clínica veterinária**. Universidade Federal de Santa Maria, p.117, 3ª edição, 2007.

KUBOTA, S. et al. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. **Journal of Biochemistry**, Bethesda, v.136, n.3, p.279-282, 2004.

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

MAIA L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica ultrasonográfica e histopatológica.** 2008. 78f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.

MAIA, L.; SOUZA, M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p. 1267-1274, 2009.

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics** 85: p.638–646, 1998.

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

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

MARTIN, P. et al. Growth factors and cutaneous wound repair. **Progress in Growth Factor Research**, New York, v.4, n.1, p.25-44, 1992.

MATRAS, H. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. **Journal oral Maxillofacial Surgery**, n. 40, p. 617, 1982.

MESSORA, M.E. et al. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v.6, n.2, p. 135-141, 2009.

MYERS, T.J. et al. Platelet-associated complement C3 in immune thrombocytopenia purpura. **Blood.**, v. 59, p. 1023-1028, 1982.

NEL, J.D. et al. Platelet-bound IgM in autoimmune thrombocytopenia. **Blood.** v.61, p.119-124, 1983.

PIERCE, G.F. et al. Role of platelets-derived growth factoring wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v.45, n.4, p.319-326, 1991.

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

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

REEF, V.B. et al. Lymphosarcoma and associated immune-mediated hemolytic anaemia and thrombocytopenia in horses. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 164, p.313-317, 1984.

ROSIER, R.N. et al. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. **Clinical Orthopaedics Related Research**, Philadelphia, supl.355, p.294-300, 1998.

ROSSI JUNIOR, R. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 20, n.3, p.265-300, 2008.

SALDALAMACCHIA, G. et al. 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.

SANCHEZ, A.R et al. Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **International Journal Oral and Maxillofacial Implants**, v.1, n.18, p. 93-103, 2003.

SÁNCHEZ, M. et al. Ultrasound-guided platelet –rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. **Rheumatology**, v.51, n.1, p.144-150, 2012.

SCHNABEL, V.L et al. Platelet Rich Plasma (PRP) enhanced anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficiales tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v.25, n.2, p.230-240, 2007

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

SELLON, D.C. et al. Thrombocytopenia in horses: 35 cases (1989-1994). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10, p. 127-132, 1996.

SELLON, D.C. et al. Trombocytopenia in horses. **Equine Veterinary Education**, v.10, n.3, p.133-139, 1998.

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

SELLON, D.C.; WISE, L. N. Disorders of the Hematopoietic System. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Equine Internal Medicine**. Saunders Elsevier, 2010. Cap. 14., p. 1587-1704.

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

TABLIN F. Platelet structure and function. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, et al (eds). **Schulman's veterinary hematology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p. 448-452.

VENDRAMIN, F.S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.

VENDRAMIN, F.S. et. al. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.24, n.2, p. 212-218, 2009.

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

YAMADA, A.L.M. et al. Avaliação clínica e artroscópica do tratamento de lesões condrais, experimentalmente induzidas em equinos, com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas. In: XII Conferência anual da ABRAVEQ, 2011, Campinas, São Paulo. **Anais... Abraveq- Associação Brasileira dos Médicos Veterinários de Equídeos**, 2011, v.35, p.239, p. 77-78.

WEIBRICH, G. et al. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. **Growth factors**, v. 20, p.93-97, 2002.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. **Clinical Oral Implants Research**, p.357-362, 2003.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma rich in growth factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. **Internal Journal Oral Maxillofacial Implants**, v. 29, p. 118-123, 2005.

WHITLOW, J. et al. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v.23, p. 283-289, 2008.

WHITMAN, D.H. et al. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**. 55: 1294-1299, 1997.

ZAGO, M.A. et al. **Hematologia: Fundamentos e Prática.** 1ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 1081p.

ZIMMERMANN, R. et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 85, p. 283-289, 2003.