

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS
AUTÓLOGO DE COELHOS COM POUcos
LEUCÓCITOS E HEMÁCIAS**

**Marina Greco Magalhães Guerra de Andrade
Médica Veterinária**

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS
AUTÓLOGO DE COELHOS COM POUcos
LEUCÓCITOS E HEMÁCIAS**

Marina Greco Magalhães Guerra de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Duvaldo Eurides

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica e Cirurgia).

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL
Agosto de 2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A553o Andrade, Marina Greco Magalhães Guerra de, 1982-
2014 Obtenção de plasma rico em plaquetas autólogo de coelhos com
poucos leucócitos e hemácias / Marina Greco Magalhães Guerra de
Andrade. - 2014.
47 f. : il.

Orientador: Duvaldo Eurides.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Coelho - Teses. 3. Sangue - Teses. 4.
Materiais biomédicos - Teses. I. Eurides, Duvaldo. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

EPÍGRAFE

"AS INDAGAÇÕES

A resposta certa, não importa nada: o
essencial é que as perguntas estejam certas".

Mário Quintana

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, meu melhor amigo e mestre. À minha mãe e ao meu marido Eduardo, companheiros e sempre atenciosos. À minha filha Laura, que ainda tão pequenininha, ainda sem saber de nada, me acompanhou por toda esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Certa de que o mérito não é só meu, agradeço à amizade despretensiosa de cada um que esteve junto de mim e que foram fundamentais para que chegássemos até aqui. Certamente, a conquista e o resultado final deste trabalho se devem à dedicação de cada membro desta equipe.

Em especial, ao Gustavo Moya e à Fernanda Gatti sempre cuidadosos com os animais, tratando-os sobretudo, com muito respeito. À vocês devo a minha gratidão e tenho a consciência de que sem a sua participação e dedicação, não seria possível prosseguir neste caminho.

Ao amigo Daniel Lima. Simplesmente apareceu para ajudar!!!! Esteve junto em todas as atividades e não mediu esforços para estar presente. Sou grata e assim como pude contar com você, sempre estarei pronta para estender-lhe a mão.

Lucas Perroni e Laura Melgaço, profissionais experientes e habilidosos participaram de momentos importantes e sem dúvida foram essenciais. Obrigada!

Ao Prof. Duvaldo, mestre experiente e sábio. Obrigada pelos seus ensinamentos sobretudo na conclusão deste trabalho.

À todos do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário/UFU, onde parte das amostras foram processadas. Em especial ao Prof. Mundim, Tiãozinho, Rafael, Felipe e Lara.

Ao Prof. Beletti, mesmo com tantos compromissos sempre se fez presente e me recebeu para conversas e orientações. Obrigado por abrir as portas do Laboratório de Histologia/ICBIM-UFU. Aos técnicos, especialmente à Ester e Fabrício.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UFU e ao Prof. Francisco Dantas sempre disposto à contribuir.

Ao Prof. João, que foi também um grande amigo!

Aos animais que respeitosamente foram utilizados em prol da ciência.

Com grande carinho, não posso deixar de agradecer e reconhecer a importância dos amigos da pensão da D. Odete!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVEATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DE LITERATURA	02
II.a. Plaquetas e fatores de crescimento plaquetário	02
II.b. Plasma rico em plaquetas: definição, obtenção e utilização.....	04
II.c. Obtenção do plasma rico em plaquetas	05
II.d. Composição do plasma rico em plaquetas	06
III. MATERIAL E MÉTODOS	08
III.a. Obtenção do plasma rico em plaquetas líquido	09
III.b. Obtenção do plasma rico em plaquetas gel	11
III.c. Microscopia eletrônica de transmissão	12
III.d. Estatística	14
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
V. CONCLUSÕES.....	28
VI. REFERÊNCIAS	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Punção cardíaca em coelho (A) e colheita de sangue com tubo de hemossedimentação (B).....	09
Figura 2. Três tubos sangue de cada animal e o local da remoção de uma alíquota de sangue (A - seta) para hemograma. Observar, após a primeira centrifugação, a formação de uma coluna alta de sedimentação de células formada pelo plasma sobrenadante, anel leucocitário (B - seta) e hemácias sedimentadas e conteúdo plaquetário depois da segunda centrifugação (C - seta)	11
Figura 3. Tubos eppendorf a solução de tromboplastina com cloreto de cálcio adicionado ao plasma rico em plaquetas e mantidos em banho maria a 37°C (A). Obtenção do PRP em gel (B - seta)	12
Figura 4. Tubo convencional para colheita de sangue com citrato de sódio (1 - A), tubo de hemossedimentação (2 - A) e agulha para colheita de sangue (3 - A). Notar após a primeira centrifugação a formação da coluna alta de sedimentação evidenciando as camadas de hemácias sedimentadas, anel leucocitário (B - setas) e plasma sobrenadante antes de pipetado (B - *). Hemácias sedimentadas no fundo do tubo e o anel leucocitário (C- seta) após pipetado o plasma sobrenadante.....	17
Figura 5. Formação de coágulo após a adição de tromboplastina e cloreto de cálcio ao plasma rico em plaquetas autólogo de apresentação líquida (A). Notar o coágulo e o plasma armazenados em tubo eppendorf (B).....	22
Figura 6. Morfologia plaquetária observada em microscopia eletrônica de transmissão após obtenção do plasma rico em plaquetas autólogo com poucos leucócitos e hemácias (G1). Notar as plaquetas ativadas com formato arredondado e irregular, com pseudópodes e grânulos localizados centralmente no citoplasma (A, B, E e F – setas, 12.000x), formato alongado e globoso (C - 12.000x) e alongado não ativadas (D - 30.000x)	24
Figura 7. Morfologia plaquetária em microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando a degranulação de plaquetas no PRP de apresentação líquida (G1). Notar plaquetas em formato globoso, α-grânulos com localização periférica (A, B, C e D - setas) ausência de pseudópodes e indefinição dos limites de membrana celular (Δ) (A - 12.000x, B - 20.000x, C - 30.000x e D - 20.000x)	25
Figura 8. Plasma rico em plaquetas autólogo após ativação com tromboplastina e cloreto de cálcio (G2). Notar grânulos dispersos após	

a lise plaquetária (A, B, C e D – setas), agregação plaquetária e trama de fibrina em G2. Plaqueta íntegra, de formato circular, com grânulos e organelas na periferia do citoplasma (A e B - Δ, 12.000x), plaqueta degranulada com ausência de grânulos citoplasmáticos e limites de membrana celular indefinido (B - *, 20.000x) e agregados de plaquetas com degranulação e malha de fibrina, (C e D, 12.000x)

26

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores médios, mediana e desvio padrão para os valores de plaquetas/ μ L, leucócitos/ μ L e hemácias/ μ L antes do processo de centrifugação e após a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).....	19
Tabela 2. Alterações morfológicas, número e percentual de plaquetas no PRP líquido (G1) observada em microscopia eletrônica de transmissão.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Citrato-ácido-dextrose
ACD	Citrato-ácido-dextrose
AD	Teste de Anderson-Darling
AD	Teste de Anderson-Darling
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína óssea morfogenética
EGF	Fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
FCP	Fatores de crescimento plaquetário
FCR	Força centrífuga relativa
FT	Fator tecidual
HGF	Fator de crescimento hepatócito (<i>hepatocyte growth factor</i>)
IGF-1	Fator insulino-dependente I (<i>insulin-likegrowth factor-1</i>)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
PBS	Tampão salina fosfato
PDGF	Fator de crescimento plaquetário (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RPM	Rotações por minuto
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta (<i>transforming growth factor</i>)
VEGF-A	Fator de crescimento endotélio vascular (<i>vascular endothelium growth factor</i>)

OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO DE COELHOS COM POUcos LEUCÓCITOS E HEMÁCIAS

RESUMO - Objetivou-se elaborar um método de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo com poucos leucócitos e hemácias a partir do sangue total de coelhos submetido a duas centrifugações. Foram colhidos 10,5mL sangue por via intracardíaca e distribuído em três tubos de hemossedimentação contendo citrato de sódio. Os tubos contendo as amostras foram submetidos a uma centrifugação à 2.000 RPM (670,8G) por 20 minutos e da coluna de sedimentação foram aspirados de cada tubo 1.000 μ L de plasma para a redução do volume sobrenadante. Aspirou-se o plasma acima do anel de leucócitos e transferiu-se para outro tubo para centrifugação a 2.000 RPM por 10 minutos. O conteúdo plaquetário no fundo do tubo foi ressuspensionado e homogeneizado à 1.000 μ L do plasma sobrenadante para formar o PRP líquido (Grupo G1). A capacidade de ativação das plaquetas foi verificada a partir da formação do PRP gel (Grupo G2), quando foram adicionados 100 μ L de tromboplastina com cloreto de cálcio 0,0125mol/l e cloreto de sódio 0,1mol/l, à 100 μ L de PRP líquido. A contagem do número total de plaquetas, hemácias e leucócitos antes e após as centrifugações foi realizada em analisador hematológico automático. Notou-se no G1, acréscimo de 61,58% de plaquetas em relação à média do hemograma ao obter a concentração de 370.484 plaquetas/ μ L no PRP e foram eliminados do processo 71% de leucócitos e 89% de hemácias. A avaliação por microscopia eletrônica de transmissão identificou no grupo G1 que as plaquetas se apresentavam com integridade morfológica preservada e se mostravam individualizadas, com membrana celular íntegra, emissão de pseudópodes e centralização dos grânulos e organelas. No G2, as plaquetas se encontravam agrupadas, de difícil identificação das estruturas intracitoplasmáticas, lise de membrana celular, derramamento de grânulos citoplasmáticos no meio extracelular e presença de fibrina. O método de obtenção de plasma rico em plaqueta autólogo de coelhos é simples, reduz o número de leucócitos e hemácias e preserva a integridade morfológica e funcional das plaquetas.

Palavras-chave: biomateriais, microscopia eletrônica, *Oryctolagus cuniculus*, sangue

OBTAINING OF AUTOLOGOUS PLATELET-RICH PLASMA OF RABBITS WITH FEW LEUKOCYTES AND ERYTHROCYTES

ABSTRACT - The objective was to develop a method to obtain an autologous rich plasma in platelets with few leukocytes and blood cells using the whole blood of rabbits submitted to two centrifugations. Blood was collected by intracardiac route 10.5mL and distributed into three tubes of blood sedimentation containing sodium citrate. The tubes with blood was submitted to centrifugation at 2,000 rpm (670,8G) for 20 minutes and the sedimentation columns were aspirated from each tube 1.000µL of plasma to reduce the volume of supernatant. It was aspirated the plasma above the ring of leukocytes and transferred it to another tube to centrifugate again at 2000 rpm (670.8 L) for 10 minutes. The platelet content in the bottom of the tube was resuspended and homogenized 1.000µL the supernatant plasma to form the PRP liquid (Group G1). The capacity of platelet activation was observed from the formation of a clot called PRP gel (group G2) when it was added 100mL of rabbit thromboplastin, calcium chloride 0.0125 mol / l and sodium chloride 0.1 mol / l of PRP 100mL liquid. The counting of the platelets, erythrocytes and leukocytes total number was done before and after centrifugations and they were performed in a veterinary automatic hematology analyzer. It was noted in G1, an increase of 61.58% in relation to platelet blood count to get the average concentration of 370 484 platelets / uL in PRP and were eliminated from the process 71% to 89% of leukocytes and erythrocytes. The evaluation by transmission electron microscopy identified in G1 that platelets showed morphological integrity preserved and individualized, with intact cell membrane, emission of pseudopods and centralization of granules and organelles. In G2, the platelets were grouped, with difficult to identify the intracytoplasmic structures of cell, membrane lysis, shedding of cytoplasmic granules into the extracellular place and the presence of fibrin. The method for obtaining an autologous plasma rich of platelets in rabbits is simple and reduce the number of leukocytes and blood cells and the platelets continue with a morphological and functional integrity.

Key words: electron microscopy, biomaterials, blood, *Oryctolagus cuniculus*

I. INTRODUÇÃO

A experimentação por variáveis que acelerem o processo de cicatrização, tem resultado na utilização de biomateriais e na ampliação dos conhecimentos sobre o processo de reparação tecidual. (ANDRADE et al., 2007; SÁNCHEZ et al., 2009). A procura por novas alternativas de implantes autógenos é de grande valor, porém, na medicina veterinária, pode ser limitada uma vez que seu emprego é dispendioso (WILSON et al., 2006). Sendo assim, técnicas de fácil manipulação que busquem a estimulação da cicatrização de diferentes tipos de tecidos a baixo custo são cada vez mais estudadas (ANDRADE et al., 2007). A terapia com plasma rico em plaquetas (PRP) é considerada a biotecnologia capaz de estimular e acelerar o processo de regeneração e cicatrização dos tecidos (SÁNCHEZ et al., 2009).

O PRP é o produto derivado de sangue cuja preparação visa obter alta concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma. As plaquetas contêm fatores de crescimento que atuam na fase inicial da cicatrização. Entretanto, apesar do seu potencial para aumentar a concentração de fatores de crescimento plaquetário (FCP) e citocinas diretamente sobre o foco da lesão, a resposta à estimulação celular nos diferentes tipos de tecidos depende da composição celular do PRP, do local, do tecido e da forma como é inoculado (LENZA et al., 2013).

Objetivou-se elaborar um método de obtenção de plasma rico em plaquetas autólogo com reduzido número de leucócitos e hemácias e avaliar por microscopia eletrônica de transmissão a preservação da integridade morfológica e funcional plaquetária após submetido à duas centrifugações.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.a. Plaquetas e fatores de crescimento plaquetário

As plaquetas ou trombócitos apresentam forma discoide de aproximadamente 3,0 μ m de diâmetro, e se originam a partir da diferenciação de células tronco hematopoéticas da medula óssea em megacariócitos. Os megacariócitos migram em direção aos vasos sanguíneos e se dividem para formar as plaquetas que são fragmentos citoplasmáticos anucleados que permanecem em circulação por sete a dez dias (EVERTS et al., 2006a; EVERTS et al., 2006b; BOSWELL et al., 2012; MALHOTRA et al., 2013). Estruturalmente são formadas por mitocôndrias, retículo endoplasmático, microtúbulos, microfilamentos de actina e miosina, glicogênio, lisossomo e por dois tipos de grânulos. Os grânulos densos possuem adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP), serotoninas e cálcio. Os α -grânulos possuem os fatores de coagulação e fatores de crescimento plaquetário (FCP) além de outras proteínas (MATTHEWS, MARTIN, 1974; EVERTS et al., 2006a; EVERTS et al., 2006b).

As plaquetas atuam ativamente no processo de reparação tecidual como mediadores pró-inflamatórios responsáveis pelos processos de coagulação e hemostasia e são as primeiras células a chegarem no sítio da lesão imediatamente após o trauma (EVERTS et al., 2006a; EVERTS et al., 2006b; BOSWELL et al., 2012, WASTERLAIN et al., 2012). Normalmente encontram-se em estado inativo, e a sua ativação constitui um rápido processo que é iniciado pela exposição ao colágeno subendotelial e à expressão do fator tecidual (FT) após um trauma e pela liberação dos fatores de Von Wilebrand que subsequentemente promovem a agregação das plaquetas na parede dos vasos sanguíneos (EVERTS et al., 2006a). Posteriormente, moléculas inflamatórias endógenas como a trombina, colágeno, serotoninas, epinefrina, cálcio, magnésio, tromboxano A₂ e adenosina difosfato são liberadas no local da lesão. Após ativadas, os microtúbulos alteram o formato das plaquetas de discoide para esférico e permitem a emissão de pseudopodes, em um fenômeno chamado

agregação plaquetária (EVERTS et al., 2006a; EVERTS et al., 2006b). Após o recrutamento celular, inicia-se a formação do trombo a partir da agregação plaquetária e formação de fibrina responsável não só pelo reparo vascular, mas também pelo recrutamento e ativação de outras células envolvidas no processo (EVERTS et al., 2006a). Depois de formados os trombos, as plaquetas liberam através do sistema de canalículos, o conteúdo dos seus grânulos e estes promovem o recrutamento de células mieloides, linfocitárias, leucócitos, novas plaquetas, ativam a cascata inflamatória a partir do tromboxano A₂ e aumentam a concentração de plaquetas no local do trauma. (MATTHEWS, MARTIN, 1974; EVERTS et al., 2006a; FLAD, BRANDT, 2010; BOSWELL et al., 2012). A atividade das citocinas plaquetárias é complexa e sugere a existência de um sistema de mediadores trombocíticos (FLAD, BRANDT, 2010) que ainda não foi completamente elucidado (SÁNCHEZ et al., 2009).

Citocinas plaquetárias assim como outras proteínas, incluído os FCP, estão localizados dentro dos α-grânulos (EVERTS et al., 2006a; EVERTS et al., 2006b; WASTERLAIN et al., 2012). Os α-grânulos possuem fatores de crescimento responsáveis pela regulação do metabolismo celular que ocorre pelas vias de sinalização intracelular através da interação com um organizado complexo de receptores de superfície. Este mecanismo, resultará no aumento da transcrição dos FCP e produção de proteínas que desencadeiam a proliferação e diferenciação celular, além do aumento da produção de tecido conjuntivo e estímulo à angiogênese (EVERTS et al., 2006a; BOSCH et al., 2010).

Uma vez formado o coágulo e após a degranulação plaquetária, são liberados fatores de crescimentos de relevância no processo de reparação tecidual como o fator de crescimento plaquetário (*platelet-derived growth factor*– PDGF), de crescimento transformador beta (*transforming growth factor beta* – TGF -β1; -β2 e -β3), insulino-dependente I (*insulin-likegrowth factor-1* – IGF-1), epidérmico (*epidermal growth fator* – EGF), endotélio vascular (*vascular endothelium growth fator* – VEGF-A) e o hepatócito (*hepatocyte growth fator* - HGF). Além de outros fatores como a proteína óssea morfogenética (BMP) e fibroblasto. Os fatores de crescimento possuem atividades específicas durante o processo de reparação

tecidual e de uma forma geral, os provenientes dos α -grânulos são responsáveis por promover quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e formação de tecido conjuntivo (EVERTS et al., 2006a; EVERTS et al., 2006b; MALHOTRA et al., 2013).

O PDGF e o TGF- β são os mais importantes FCP por iniciarem a formação do tecido conjuntivo e do calo ósseo a partir da quimiotaxia de células tronco mesenquimais. São responsáveis principalmente por promover a quimiotaxia e mitose de células de tecido conectivo, como fibroblastos e condrócitos (EVERTS et al., 2006a; SÁNCHEZ et al., 2009). O PDGF e o TGF- β estão diretamente envolvidos no processo de angiogênese por promoverem a proliferação das células endoteliais e quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos. (EVERTS et al., 2006a; EVERTS et al., 2006b; MALHOTRA et al., 2013).

O VEGF apresenta grande potencial quimiotático e mitogênico para células endoteliais e são responsáveis pelo processo de neovascularização e angiogênese juntamente com o HGF, cujo papel ainda não está completamente esclarecido. Receptores de VEGF são encontrados em células endoteliais e também em condrócitos. O VEGF está relacionado ao processo de consolidação óssea e ao crescimento endocondral enquanto o TGF- β está relacionado à síntese de colágeno, secreção da colagenase e estímulo à angiogênese. O IGF-I é essencial para crescimento e metabolismo celular e sinaliza a migração de células epiteliais e mesenquimais para que haja aumento na síntese de colágeno e matriz celular (SÁNCHEZ et al., 2009; MALHOTRA et al., 2013).

II.b. Plasma rico em plaquetas: definição, obtenção e utilização

O plasma rico em plaquetas é um biomaterial, rico em plaquetas e consequentemente em fatores de crescimento que quando aplicado diretamente sobre a lesão, além de acelerar a cicatrização, atua para orientação e adesão de células tronco mesenquimais responsáveis pelo processo de reparação tecidual. O PRP possui também efeito quimiotáxico, mitogênico, angiogênico, analgésico e anti-inflamatório (MAIA et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2009; CARMONA et al., 2007; YAMADA et al., 2012). O principal objetivo em se utilizar o PRP está em

fornecer maior concentração de FCP autólogos diretamente sobre a lesão, afim de que sejam provocadas alterações sobre as funções biológicas das células responsáveis pelo processo de cicatrização e promover a organização tecidual em menor tempo (SÁNCHEZ et al., 2009).

Marx et al. (1998) definiu o PRP como sendo um volume de plasma autólogo com concentração de plaquetas cinco vezes superior aos níveis fisiológicos, ou seja, deve ser igual ou maior a 1.000.000 de plaquetas/ μL , para que seja considerado o seu benefício terapêutico. Entretanto, resultados controversos foram observados para a reparação óssea quando o PRP é utilizado com o objetivo de acelerar a cicatrização. Estes estudos indicam que, quando são utilizadas sem um suporte de osteoindução, altas concentrações de plaquetas não demonstram melhora no processo de cicatrização (MALHOTRA et al., 2013).

II.c. Obtenção do plasma rico em plaquetas

Inúmeros métodos foram descritos para promover a concentração das plaquetas e obter o biomaterial chamado plasma rico em plaquetas. Para a preparação do PRP podem ser utilizados equipamentos que promovem a aférese ou centrífugas convencionais (MALHOTRA et al., 2013). O sangue deve ser colhido por venopunção e pode ser conservado em anticoagulante EDTA (WEIBRICH et al., 2004), citrato de sódio (ANITUAL et al., 2005; ANITUA et al., 2007; MESSORA et al., 2009a; MONTEIRO et al., 2010; ALEIXO et al., 2011; NAGATA et al., 2011; VANAT et al., 2012; YAMADA et al., 2012) ou citrato-ácido-dextrose (ACD) (MARX et al., 1998; CARTER et al., 2003; BATISTA, 2010; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010b; SILVA, CARMONA e REZENDE, 2012).

São descritos métodos de preparação do PRP que utilizam centrifugações únicas (SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010b; SILVA, CARMONA e REZENDE, 2012) ou dupla (VENDRAMIN et al., 2006; MONTEIRO et al., 2010; NAGATA et al., 2011; VANAT et al., 2012), e que resultam em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e seus fatores de crescimento (PEREIRA, 2012). A literatura é conflitante quanto a unidade

utilizada para determinar a força de centrifugação. Alguns autores utilizam a unidade de força G, enquanto outros descrevem o processo utilizando rotações por minuto (RPM). Altas rotações por longo período de tempo podem ativar precocemente as plaquetas e diminuir a concentração de fatores de crescimento sobre o sítio da lesão (MALHOTRA et al., 2013).

A primeira centrifugação, de maior rotação, tem por objetivo separar as células vermelhas (7,0 μ m de diâmetro) e os leucócitos (7,0-15 μ m de diâmetro) das plaquetas (2,0 μ m de diâmetro) e fatores de crescimento, devido à diferença de densidade entre estas células. É formado um anel leucocitário brancacento, que divide o sangue total em três frações distintas. A camada translúcida no topo é nomeada plasma pobre em plaquetas (PPP), a intermediária contendo leucócitos e plaquetas é denominada de anel leucocitário, e a última camada, na porção mais baixa do tubo estão as hemácias sedimentadas. A segunda centrifugação, de menor rotação, promove a concentração das plaquetas no fundo tubo e o plasma pobre em plaquetas que corresponde à porção sobrenadante (WASTERLAIN et al., 2012; MALHOTRA et al., 2013).

II.d. Composição do plasma rico em plaquetas

A nomenclatura utilizada para se referir ao PRP tem causado certa confusão apesar de as concentrações de plaquetas serem consideradas como o principal componente de qualquer produto de PRP (MALHOTRA et al., 2013). As preparações podem apresentar maior ou menor concentração de plaquetas e também concentrações de leucócitos, hemácias e fatores de crescimento variáveis que devem ser alteradas conforme o tipo de tecido lesionado e resposta tecidual desejada. Podem ser obtidas preparações de plasma rico em plaquetas, plasma com poucas plaquetas, plasmas rico em plaquetas e leucócitos e plasma rico em plaquetas e com poucos leucócitos (WASTERLAIN et al., 2012). Os leucócitos, fibrina, FCP e as concentrações de fibrinogênio assim como os métodos de ativação utilizados, devem ser relatados uma vez que são responsáveis por variações nas respostas celulares e nos resultados obtidos em reparos teciduais *in vivo*. Sendo assim, torna-se importante identificar os

componentes do concentrado e o estado de ativação plaquetária (BOSWELL et al., 2012; WASTERLAIN et al., 2012; MALHOTRA et al., 2013).

Após o processo de centrifugação, devido à diferença de tamanho entre as células e a velocidade de sedimentação, grande parte das plaquetas são observadas muito próximas ao anel leucocitário. Possivelmente, devido à dificuldade em se separar as plaquetas dos leucócitos, os trabalhos que utilizam o PRP obtido a partir da colheita do anel leucocitário, apresentam além de alta concentração de plaquetas, também alta concentração de leucócitos (WASTERLAIN et al., 2012; MALHOTRA et al., 2013).

III. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, em análise final nº 004/13, registro CEUA/UFU nº 77/12 para utilização de 54 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) adultos, machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia branca, com peso entre 3,0 e 4,5 kg.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam 100 a 150g por dia de ração comercial¹ peletizada para coelhos e água a vontade. Receberam dose única de ivermectina² (0,7mg/Kg, SC) e passaram por um período de sete dias de ambientação antes da realização do experimento. Ao exame clínico, não apresentaram sintomas de infecção ou afecções.

Para a preparação do PRP, os animais foram submetidos à associação anestésica de cloridrato de cetamina³ (35mg/kg, IM) e xilazina⁴ (10mg/kg, IM) e posicionados em decúbito lateral direito para tricotomia e antisepsia da região torácica esquerda com álcool 70%. Foi realizada a punção intracardíaca entre o 5º e 6º espaço intercostal esquerdo para a colheita de 10,5mL de sangue de cada animal. Utilizou-se uma agulha 21G (0,8 x 25 mm)⁵ e três tubos para hemossedimentação de polipropileno (130 x 8,0mm)⁶ contendo 0,7mL de citrato de sódio 0,106 molar (Figura 1). O volume total de sangue (10,5mL) foi distribuído em igual volume entre os três tubos de hemossedimentação com capacidade de 3,5mL.

Os tubos com as amostras de sangue em temperatura ambiente foram imediatamente encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas para a preparação do plasma rico em plaquetas autólogo com poucos leucócitos e hemácias.

¹Ração Guabi do Sítio. Mogiana Alimentos. Campinas, São Paulo, Brasil.

²Ivomec injetável, Merial. Campinas, São Paulo. Brasil.

³Quetamina, Vetnil. Louvreira, São Paulo. Brasil.

⁴Calmiun, Agener União. Guaçuí, São Paulo. Brasil.

⁵Agulha S-Monovette. Sarstedt Brasil. Santana do Paranaíba, São Paulo. Brasil.

⁶Tubo ESR S-SedivetteSarstedt Brasil. Santana do Paranaíba, São Paulo. Brasil.

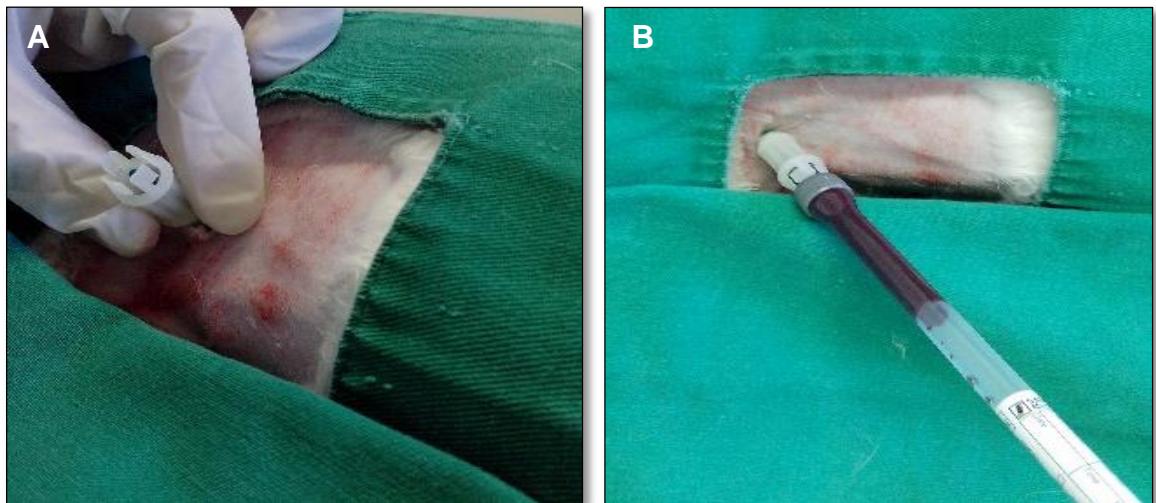


Figura 1. Punção cardíaca em coelho (A) e colheita de sangue com tubo de hemossedimentação (B).

Após a preparação do PRP, as amostras foram aleatoriamente separadas em dois grupos para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão (MET). O grupo G1 ($n = 44$) foi constituído por amostras de plasma rico em plaquetas de apresentação líquida e o grupo G2 ($n = 10$) de plasma rico em plaquetas de apresentação gel.

III.a. Obtenção do plasma rico em plaquetas de apresentação líquida

Para cada animal, uma alíquota do sangue foi utilizada para a realização de hemograma completo em analisador hematológico veterinário automático⁷ pelo método de impedância volumétrica.

Os tubos foram submetidos à primeira centrifugação⁸ à 2.000 RPM (670,8G) por 20 minutos para formar uma coluna alta de sedimentação. Após o

⁷Aparelho automático de hematologia veterinária PocH-100 iVDiff®, Roche. São Paulo, SP, Brasil.

⁸ Centrifuga Excelsa Baby modelo 208N, raio (r) = 15cm. FANEM, Guarulhos, São Paulo, Brasil.

processo de centrifugação observou-se a formação de três camadas de celulas bem individualizadas, formadas por hemárias ao fundo do tubo, seguida de um anel de leucócitos e o plasma. Foram aspirados de cada tubo 1.000 μ L da camada de plasma para a redução do volume sobrenadante. Após, foram aspirados de cada tubo com pipeta de Pasteur, todo o plasma acima do anel de leucócitos formado e transferido para um tubo simples de polipropileno sem anticoagulante. Em seguida, realizou-se outra centrifugação a 2.000 RPM (670,8G) por 10 minutos e, o sobrenadante de plasma formado após a centrifugação foi aspirado e reduzido até uma marca de 1.000 μ L no tubo de centrifugação. O conteúdo plaquetário formado no fundo do tubo, foi ressuspensido e homogeneizado ao plasma para formar o PRP de apresentação líquida, contendo poucos leucócitos e hemárias (Grupo G1; Figura 2). Depois de transferido para um tubo eppendorf, efetuou-se em analisador hematológico veterinário automático a contagem do número total de plaquetas, leucócitos e hemárias no PRP obtido.

A fim de padronizar a unidade de força e compara-la com outros trabalhos na literatura, foi utilizada a unidade de força G, e para isto, realizado a transformação de número de rotações por minutos (RMP) em força centrífuga relativa ou força G ($FCR = G$) a partir da seguinte fórmula: $FCR = 0,00001118 \times r \times (N)^2$ onde, $FCR = G$; $r =$ raio da centrífuga, $N =$ RPM (MIALE, 1985).

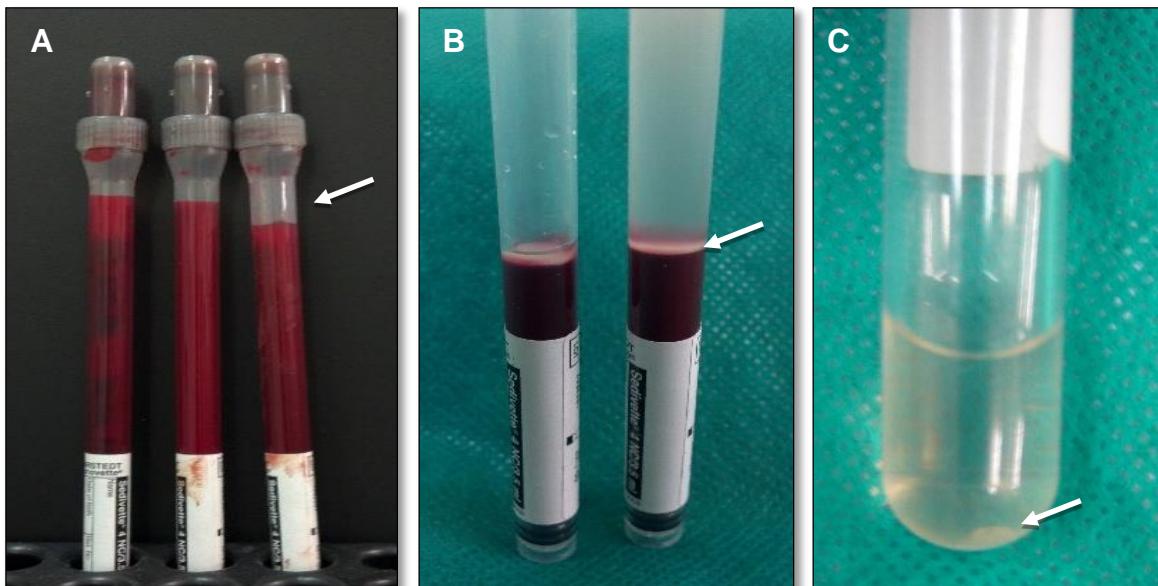


Figura 2. Três tubos com amostras de sangue de coelho da raça Nova Zelândia e o local da remoção de uma alíquota de sangue (A - seta) para hemograma. Observar, após a primeira centrifugação a 2.000RPM durante 20 minutos, a formação de uma coluna alta de sedimentação de células formada pelo plasma sobrenadante, anel leucocitário (B - seta) e hemácias sedimentadas. Conteúdo plaquetário depois da segunda centrifugação a 2.000RPM durante 10 minutos (C - seta).

III.b. Obtenção do plasma rico em plaquetas em gel

Amostras de 100 μ L de PRP líquido foram obtidas aleatoriamente de 10 coelhos da raça Nova Zelândia e utilizadas para a obtenção do PRP gel. Para isto, foram adicionados 100 μ L de tromboplastina derivada do cérebro de coelho⁹, cloreto de cálcio 0,0125mol/l e cloreto de sódio 0,1mol/l. O material obtido foi acondicionado em tubos eppendorf, identificados e deixado em banho maria a 37°C até a formação de um coágulo (Figura 3A). A capacidade de ativação plaquetária do PRP de apresentação líquida foi verificada a partir da formação de um coágulo, denominado plasma rico em plaquetas gel (PRP Gel), grupo G2, (Figura 3B).

⁹Soluplastin, Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosário, Argentina.

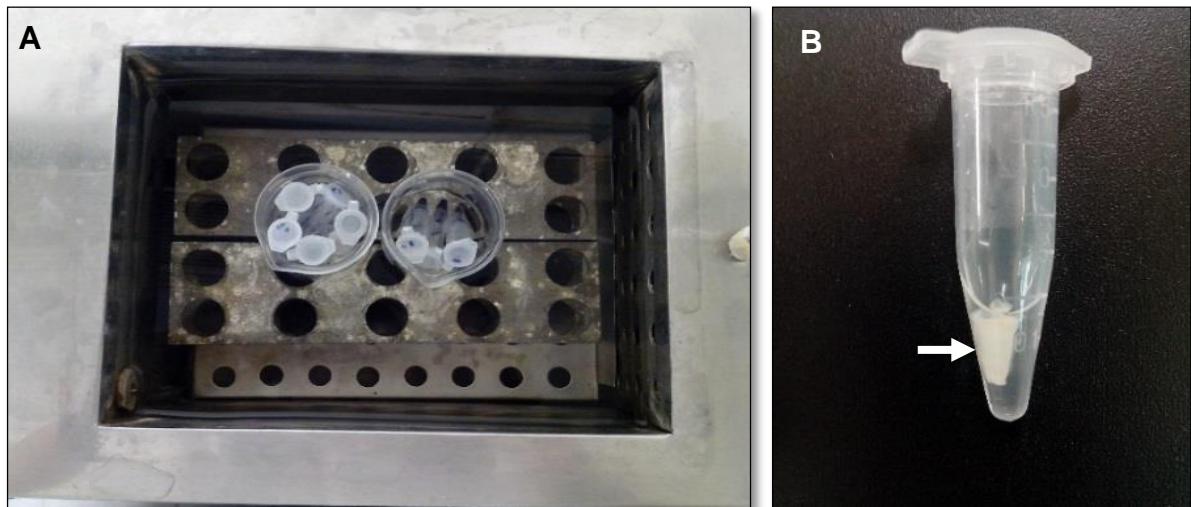


Figura 3. Tubos eppendorf e solução de tromboplastina com cloreto de cálcio adicionado ao plasma rico em plaquetas e mantidos em banho maria a 37ºC até a formação de um coágulo (A). Obtenção do PRP em gel (B - seta).

III.c. Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras armazenadas em eppendorf foram centrifugadas¹⁰, por um período de cinco minutos a 2.000 RPM (670,8 G). O plasma sobrenadante foi descartado, restando ao fundo, um conteúdo plaquetário que foi ressuspensiondo em 500µl de glutaraldeído 2,5%¹¹ e permaneceu durante três horas em geladeira à 4ºC. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas e lavadas com solução tampão salina fosfato (PBS) a 2,5% e pH de 7,2 com intervalo de 15 minutos entre cada lavagem. Ao término da terceira lavagem, submeteu-se as amostras a outra centrifugação durante cinco minutos à 2.000 RPM (670,8 G), e foram ressuspensiondidas em solução de tetróxido de ósmio¹² em diluição de 1:1 com PBS, e deixadas em repouso por uma hora.

Depois de fixadas em tetróxido de ósmio, as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado, incluídas em ágar ágar 5%¹³ e cortadas em pequenas amostras de um 1,0mm. As amostras em ágar, foram

¹⁰FANEM Microhemato centrifuge Modelo 2410. Guarulhos. São Paulo, Brasil.

¹¹Glutaraldeído EM, Koch Instrumentos Científicos. São Paulo, SP. Brasil.

¹²Cristal tetróxido de ósmio 1,0g, Koch Instrumentos Científicos. São Paulo, SP. Brasil.

¹³Ágar ágar, type I, Himedia Laboratories RT. Mumbai, Índia.

transferidas para outros frascos limpos para desidratação em acetona¹⁴. Cada amostra permaneceu por cinco minutos nas concentrações de 50%, 70%, 80%, 90% e 95%, e deixadas por três vezes durante dez minutos em óxido de propileno¹⁵. Ao término da desidratação adicionou-se às amostras solução de óxido de propileno e resina¹⁶ na proporção de 2:1 e mantidos tampados em temperatura ambiente por 12 horas.

A solução de resina e óxido de propileno foi descartada e as amostras incluídas em outra solução de óxido de propileno e resina na proporção de 1:1. Os frascos foram mantidos tampados em estufa à 37°C por 12 horas e após, destampados e mantidos na mesma estufa por mais 12 horas. Posteriormente, descartou-se o excesso de resina, adicionou-se resina pura e foram mantidas em estufa à 37°C. Retirou-se as amostras da resina e estas foram transferidas para formas de borracha específicas para inclusão em resina pura e mantidas em estufa à 60°C por 72 horas. Os blocos de resina foram desbastados, cortados em ultramicrótomo¹⁷, montados em telas de cobre¹⁸, contrastadas com citrato de chumbo¹⁹ e acetato de uranila²⁰ e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão. Os cortes foram analisados e documentados fotograficamente com aumento de 7.000x, 12.000x, 20.000x e 30.000x em microscópio eletrônico Zeiss EM-109 acoplado ao sistema de captura de imagens Megaview G2/Olympus Soft Imaging Solutions.

Foram documentadas as seguintes alterações plaquetárias: presença ou ausência de pseudópodes, localização central ou marginal dos grânulos plaquetários, formato circular ou alongado das plaquetas, membranas íntegras ou não íntegras, presença de grânulos citoplasmáticos em quantidade inferior ou superior a três.

¹⁴Acetona PA, ACS F. Maia Indústria e Comércio. Cotia, São Paulo. Brasil.

¹⁵Óxido de propileno, Sigma Aldrich Chemistry. Sant Louis, Estados Unidos.

¹⁶Resina Koch, Koch Instrumentos Científicos São Paulo, SP. Brasil.

¹⁷Reichert-Jung Ultracut, Leica Microsystems. Wetzlar, Alemanha.

¹⁸Rede cobre 200 Malha Quadrada, Koch Instrumentos Científicos. São Paulo, SP. Brasil.

¹⁹Lead citrato 25g, Koch Instrumentos Científicos. São Paulo, SP. Brasil.

²⁰Acetato de uranila25g, Koch Instrumentos Científicos. São Paulo, SP. Brasil.

III.d. Estatística

Testou-se a normalidade de cada variável com a finalidade de definir o tipo de teste a ser aplicado, ou seja, teste t pareado quando ocorrer normalidade ou teste de Wilcoxon pareado quando não for observada a distribuição normal. O teste de normalidade aplicado foi o teste de Anderson-Darling (AD) com significância de 5%, ou seja, AD com valor $p > 0,05$ tem distribuição normal, caso contrário a distribuição é não normal (TRIOLA, 1999; AYRES et al., 2007). Para as alterações morfológicas plaquetárias observadas na microscopia eletrônica de transmissão, foi aplicado o teste da binomial para duas proporções. Todos os procedimentos de análise foram realizados na ferramenta Action (2013) que utiliza o programa R (R Development Core Team, 2013) e foi adotado a significância de 5%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais foram submetidos à associação de cetamina (35mg/kg, IM) e xilazina (10mg/kg, IM). A técnica anestésica utilizada foi adequada à contenção química dos animais e possibilitou a colheita de sangue por via intracardíaca, como realizado por Messora et al. (2009a) e Messora et al. (2009b). A colheita permitiu a obtenção de 10,5mL de sangue de cada animal, sem que ocorresse hemólise ou formação de pequenos trombos e agregados plaquetários.

A contagem total de hemácias, leucócitos e plaquetas foi realizada anteriormente e após a obtenção do plasma rico em plaquetas em analisador hematológico veterinário automático, assim como descrito por Silva et al. (2010a); Silva et al. (2010b). Segundo Schweigert, et al. (2010), existe alta correlação entre a contagem de plaquetas de cão em analisador hematológico veterinário automático e as técnicas de contagem em câmara de Neubauer. Entretanto, Marx (2000) alegou que o método automático de contagem de células pode identificar agregados de plaquetas como sendo uma única só célula e subestimar a contagem plaquetária. Neste trabalho, a utilização do analisador

hematológico automática garantiu agilidade no processo e facilidade de realização, uma vez que a técnica manual de contagem de plaquetas exige experiência e treinamento para execução.

No hemograma dos animais realizado anterior ao processamento do PRP foram observadas concentrações médias de 228.162,80 (\pm 81.601,2168) plaquetas/ μ L; 6.083,95 (\pm 2.092,2705) leucócitos/ μ L e $4,76 \times 10^3$ (\pm 0,514) hemácias/ μ L. Os valores de plaquetas, leucócitos e hemácias encontrados foram inferiores aos de referência para a espécie (THRALL, 2006; GARCIA-NAVARRO, 2005; SCHALM et al., 2010 e TEIXEIRA, 2012).

A técnica utilizada para a obtenção do PRP foi considerada de baixo custo uma vez que não foram necessários a utilização de equipamentos específicos, apenas uma centrifuga de laboratório. A partir de 10,5mL de sangue obtidos de cada animal por via intracardíaca foram obtidos 1,0mL de PRP. Oliveira Filho et al. (2008), a partir de 10,0mL de sangue de coelho obtiveram igualmente 1,0mL de plasma rico em plaquetas.

Para a obtenção do PRP, foram realizadas duas centrifugações, uma por 20 minutos a 2.000 RPM (670,8 G) e outra por 10 minutos a 2.000 RPM (670,8 G). São relatados na literatura, diferentes protocolos de obtenção de concentrados plaquetários com variações relacionadas tanto ao número de centrifugações quanto às concentrações de plaquetas obtidas (BATISTA, 2010; ALEIXO et al., 2011; NAGATA et al., 2011; YAMADA et al., 2012; SILVA, CARMONA e REZENDE, 2012; VANAT et al., 2012). Segundo Messora et al. (2009a) e Lenza et al. (2013), quando são utilizadas altas forças de rotação pode-se garantir maior concentração de plaquetas. Entretanto, forças mecânicas de centrifugação demasiadamente elevadas podem também ativar precocemente as plaquetas e ocasionar a liberação dos fatores de crescimento com consequente perda destes no plasma sobrenadante, o que compromete a eficiência do PRP. Segundo Vendruscolo et al. (2012), protocolos com menor força de centrifugação também são capazes de atingir alta concentração plaquetária e não observaram influência do tempo de centrifugação sobre o número de plaquetas concentradas. Afirmações contrárias foram feitas por Klein et al. (2011), ao relatarem que maior será a concentração de plaquetas no PRP,

quanto maior for o tempo de centrifugação. Quanto ao número de centrifugações, Aleixo et al. (2011) compararam a concentração de plaquetas no PRP obtido por dois protocolos diferentes de centrifugação e observaram que no método de dupla centrifugação houve maior concentração plaquetária quando comparado ao protocolo de única centrifugação a 1.200 RPM por 10 minutos. Messora et al. (2009a) não conseguiram pelo método de única centrifugação obter elevada concentração de plaquetas. Apesar das variações entre as técnicas descritas para a preparação do PRP, é necessário lembrar que o importante não é concentrar altos números, mas sim obter plaquetas integras e funcionalmente viáveis (SILVA et al., 2010a). Resultados conflitantes entre os métodos descritos para a preparação de plasma rico em plaquetas autólogo devem-se ao fato da não padronização dos processos de centrifugação havendo divergências não só quanto ao tempo e número de centrifugações, mas também quanto à velocidade e força de centrifugação.

Foi utilizada centrifuga de raio de 15cm e força de centrifugação de 2.000 RPM (670,8 G). São descritas forças de centrifugação em número de rotações por minuto (RPM) (ARREGUY SILVA et al., 2009; BATISTA, 2010; ALEIXO et al., 2011; VANAT et al., 2012) e força G (VENDRAMIN et al, 2006; NAGATA et al., 2011; SILVA, CARMONA e REZENDE, 2012). Variações entre as unidades de força descritas, dificultam a comparação entre as técnicas, uma vez que existem modelos de centrifugas com tamanhos diferentes de raios de rotação, o que interfere diretamente sobre a força de centrifugação utilizada. Neste trabalho, foram evitadas forças excessivas de centrifugação de modo a não danificar as plaquetas.

Foram utilizados tubos para hemossedimentação contendo citrato de sódio por preservar a integridade da membrana das plaquetas, sendo o anticoagulante mais adequado ao preparo do PRP (Marx, 2000). Os tubos de hemossedimentação utilizados possuem maior comprimento e menor diâmetro (130 x 8,0mm) em relação aos de colheita de sangue usuais de 3,5mL (75 x 13mm) que contém citrato de sódio. A utilização dos tubos de hemossedimentação possibilitou após a centrifugação, a formação de uma coluna alta de sedimentação adequada à individualização das camadas de

células formadas. Foram verificadas hemácias sedimentadas no fundo do tubo, seguido do anel leucocitário, plaquetas e plasma sobrenadante. A formação da coluna alta de sedimentação possibilitou a visualização e aspiração do plasma contendo plaquetas acima do anel leucocitário formado, e permitiu a exclusão dos leucócitos do processo de obtenção do PRP (Figura 4).

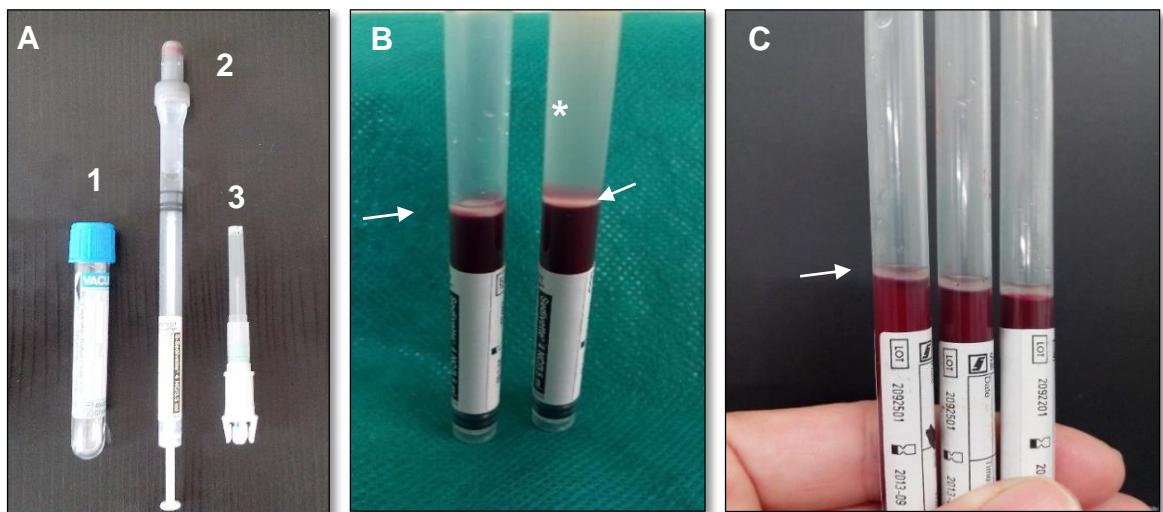


Figura 4. Tubo convencional para colheita de sangue com citrato de sódio (1-A), tubo de hemossedimentação (2-A) e agulha para colheita de sangue (3-A). Notar após a primeira centrifugação a formação da coluna alta de sedimentação evidenciando a camada de hemácias de coelho sedimentadas, anel leucocitário (B- setas) e plasma sobrenadante antes de pipetado (B - *). Hemácias sedimentadas no fundo do tubo e o anel leucocitário (C - seta) após pipetado o plasma sobrenadante.

A técnica permitiu que os leucócitos fossem eliminados do processo de obtenção do PRP, e foi capaz de recuperar média de 370.483,9 (\pm 154.894,9) plaquetas/ μ L no PRP. Referente à diferença entre a contagem inicial de plaquetas e a contagem de plaquetas no PRP, o resultado indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p = 0,0000$) (Tabela 1). Portanto, existiu associação significativa entre a contagem inicial de plaquetas e a contagem de plaquetas do PRP. Wilson, Barbieri e Mazzer (2006) utilizaram sangue de coelhos em um protocolo de única centrifugação e obtiveram média de 1.239.000 plaquetas/ μ L ao pipetarem uma camada de 13,0mm que abrangeu

além do sobrenadante, também leucócitos e hemácias. Entretanto, não citaram a concentração média de leucócitos e hemácias obtidas. O método proposto visa a separação e individualização das camadas e a possibilidade de obter apenas os tipos celulares desejados.

Neste trabalho, durante a centrifugação, as hemácias que são as células de maior densidade e que se encontram em maior concentração no sangue, se depositaram no fundo do tubo e subsequentemente as de menor densidade como os leucócitos e plaquetas que se depositaram sobre as hemácias. As plaquetas de menor tamanho encontravam-se em suspensão no plasma sobrenadante. Foi pipetado somente a porção de plasma acima do anel leucocitário, com o intuito de obter apenas plaquetas em suspensão no plasma sobrenadante e remover os leucócitos e hemácias. A separação dos componentes do sangue pelo processo de centrifugação ocorre devido à diferença de densidade entre as células que o compõem (MARX, 1998; BOSWELL et al., 2012). Segundo Oliveira Filho et al. (2008) a concentração máxima de plaquetas se encontra entre 6,0 e 8,0mm abaixo da linha que divide as fases de plasma e hemácias sedimentadas, ou seja, maior concentração se encontra dentro da fração vermelha, englobando inclusive o anel de leucócitos. Desta forma, o tubo de hemossedimentação foi escolhido, por ser estreito e longo e permitiu a formação de uma coluna de células que se depositaram umas sobre as outras de acordo com a densidade e velocidade de sedimentação, sendo possível, identificá-las com precisão. Consequentemente, a individualização das camadas de células formadas possibilitou pipetar o plasma sobrenadante e a camada de plaquetas situadas imediatamente acima do anel de leucócitos.

Tabela 1. Valores médios, mediana e desvio padrão para os valores de plaquetas/ μ L, leucócitos/ μ L e hemácias $\times 10^6/\mu$ L de coelhos antes do processo de centrifugação e após a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).

	Média	Mediana	Desvio Padrão	P valor
Plaquetas sangue total	228.162,80	220.000,00	81.601,21 ^a	
Plaquetas PRP	370.483,90	350.000,00	154.894,99 ^b	0,000*
Leucócitos sangue total	6.083,95	6.100,00	2.092,27 ^a	
Leucócitos PRP	658,60	200,00	1.233,64 ^b	0,000*
Hemácias sangue total	4,76	4,83	0,51 ^a	
Hemácias PRP	1,40	0,00	6,75 ^b	0,000*

* Teste não paramétrico de Wilcoxon para dados pareados, p<0,05.

Letras diferentes demonstram diferenças estatísticas entre as variáveis analisadas, dentro de um mesmo grupo.

Obteve-se uma taxa de enriquecimento plaquetário de 61,58% ou seja, um aumento de 1,62 vezes a concentração total de plaquetas no PRP em relação ao sangue total. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Vendruscolo et al. (2012), que não foram capazes de alcançar altas concentrações de plaquetas e observaram aumento de 1,30 a 2,36 vezes em relação à concentração inicial de plaquetas do sangue total. A literatura entretanto, relata que a quantidade ideal para um PRP deve ser de no mínimo 1.000.000 de plaquetas/ μ L (ARREGUY SILVA et al. (2009); MARX et al. (1998), MARX (2000) e ou uma taxa de enriquecimento três a seis vezes superior à concentração de plaquetas do sangue total (MONTEIRO et al., 2010; VANAT et al., 2012). Os valores encontrados porém, foram semelhantes aos alcançados por Anitua et al. (2007) em humanos e Maia et al. (2009) e Zandim et al. (2012) em equinos, que verificaram concentração de 320.000 a 500.000 plaquetas/ μ L e Yamada et al. (2012) também em equinos, que obtiveram média de 362.350 plaquetas/ μ L e conseguiram resultados favoráveis no tratamento de lesões condrais induzidas. Resultados favoráveis na regeneração de tecidos são observados mesmo quando não são conseguidas concentrações elevadas de plaquetas e podem ser atribuídos à presença de fatores de crescimento plaquetário e à fibrina.

A fibrina atua como esqueleto e favorece a proliferação, migração e agregação de células tronco mesenquimais (KANG et al., 2011). Além disto, efeitos prejudiciais à cicatrização tecidual são também relatados quando são obtidas concentrações muito altas de plaquetas no PRP (WEIBRICH et al., 2004 citado por OLIVEIRA FILHO et al., 2008; MALHOTRA et al., 2013). Existem diferenças quanto ao número de plaquetas obtidos nos diferentes protocolos de obtenção de PRP e cada um possui características específicas quanto à capacidade de concentração de plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento e por isso, apresentam também diferenças sobre os resultados na regeneração tecidual (MESSORA et al., 2009a; BOSWELL et al., 2012; LENZA et al., 2013). Segundo Wasterlain et al. (2012) é adequado que além do número de plaquetas, seja também observado a presença ou ausência de outros componentes como o fibrinogênio, leucócitos, hemárias e fatores de crescimento. Neste trabalho, no entanto, não foram realizadas dosagens de fibrinogênio e dos fatores de crescimento no PRP, uma vez que objetivou-se desenvolver uma técnica capaz de recuperar plaquetas viáveis em concentração igual ou superior ao valor normal para a espécie, assim como obter amostras com mínima contagem de leucócitos e hemárias.

Foram encontrados valores médios de 658,60 ($\pm 1.233,64$) leucócitos/ μL e $1,40 \times 10^6$ ($\pm 6,75$) hemárias/ μL no PRP. No que se refere à contagem inicial de leucócitos e hemárias no hemograma e PRP, notou-se a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p = 0,0000$), (Tabela 1), considerados estatisticamente diferentes em relação ao número de células no hemograma inicial. A técnica foi adequada para produção de plasma rico em plaquetas com poucos leucócitos e hemárias, uma vez que foi capaz de eliminar 71% dos leucócitos e 89% de hemárias em relação à quantidade presente no sangue total. Identificar a composição do PRP é importante uma vez que outros elementos como leucócitos e proteínas plasmáticas podem interferir no processo de cicatrização tecidual (BOSWELL et al., 2012; WASTERLAIN et al., 2012). A preparação ideal de um plasma rico em plaquetas autólogo deve conter maior proporção de plaquetas em relação aos leucócitos (VENDRUSCOLO et al., 2012), pois, as plaquetas possuem ação anabólica enquanto os leucócitos

liberam citocinas pró-inflamatórias responsáveis por aumentar o catabolismo e diminuir a síntese de matriz celular (MCCARREL e FORTIER, 2009; WASTERLAIN et al., 2012). Grânulos de neutrófilos contêm collagenases, metaloproteinases, gelatinases, lisozimas, elastases e mieloperoxidase, que predispõem a degradação de tendões e ligamentos e também de células musculares durante o processo de tentativa de reparação tecidual (SÀNCHEZ et al., 2009). Portanto, o PRP ideal não deve conter polimorfonucleares, uma vez que podem aumentar a resposta inflamatória no tecido lesado por meio de receptores de adesão a outras células do sistema imunológico e secreção de quimiocinas e citocinas. Os neutrófilos expressam enzimas que degradam a matriz extracelular, como as metaloproteinases, que aumentam a oxidação tecidual (ZANDIM et al., 2012). Elevadas concentrações de leucócitos no PRP não são desejáveis à reparação de músculos, ossos e tendões (SÀNCHEZ et al., 2009), mas por outro lado, podem ser adequadas no processo inflamatório agudo, infecções pós-operatórias, ou na cicatrização de feridas extensas ou contaminadas. (BOSWELL et al., 2012; MALHOTRA et al., 2013; LI et al., 2013). Portanto, o plasma rico em plaquetas não deve ser utilizado com a mesma finalidade em todos os tipos de tecidos e condições clínicas, e deve ter a sua composição manipulada conforme a necessidade de utilização (SÀNCHEZ et al., 2009). O método proposto possibilita manipular a composição do PRP e incluir maior ou menor concentração de leucócitos conforme a necessidade de utilização em diferentes tecidos, uma vez que as camadas de células no tubo puderam ser individualizadas.

Para verificar a atividade plaquetária no PRP obtido, foram adicionados 100 μ L de tromboplastina derivada do cérebro de coelho com cloreto de cálcio 0.0125 mol/L e cloreto de sódio 0.1mol/L à 100 μ L de amostra de PRP de apresentação líquida, na proporção de 1:1. Observou-se a formação de um coágulo de fibrina (G2) indicativo de degranulação plaquetária e polimerização do fibrinogênio em fibrina (Figura 5). Yamada et al. (2012) utilizaram trombina bovina e o cloreto de cálcio para formar o gel de fibrina. Observaram que o cloreto de cálcio não foi um bom ativador plaquetário, pois a sua principal função

foi antagonizar o anticoagulante, permitindo a formação do gel. A trombina promoveu a polimerização do fibrinogênio em fibrina, sendo um potente ativador, uma vez que foi responsável pela degranulação das plaquetas. O processo de ativação plaquetária pode ser iniciado pela adição de cloreto de cálcio, gluconato de cálcio, trombina, tromboplastina ou ocorre *in vivo*, quando as plaquetas entram em contato direto com o colágeno tecidual (WASTERLAIN et al., 2012).

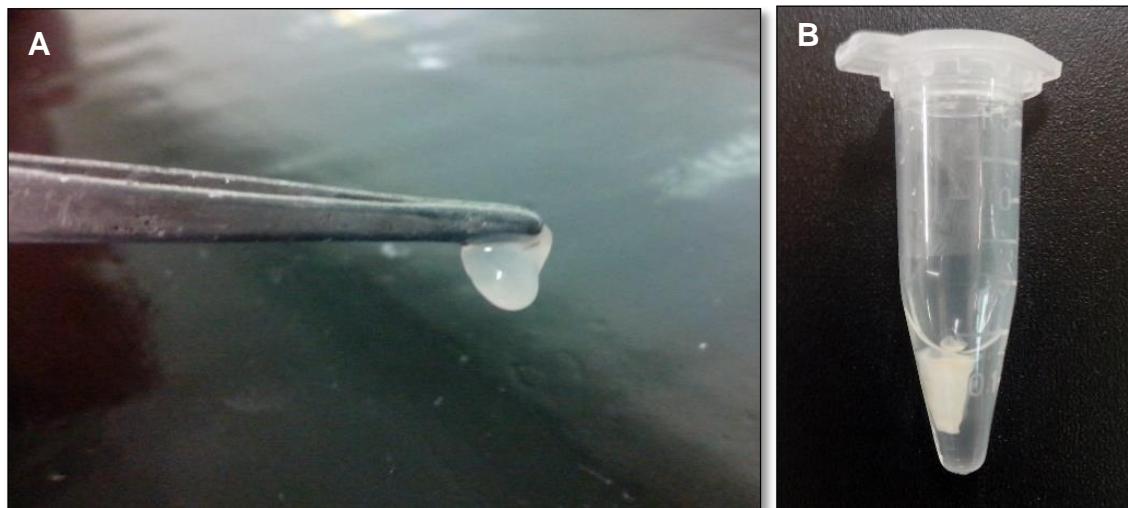


Figura 5. Formação de coágulo após a adição de tromboplastina e cloreto de cálcio ao plasma rico em plaquetas autólogo de apresentação líquida (A). Notar o coágulo e o plasma armazenados em tubo eppendorf (B).

A morfologia das plaquetas do PRP líquido (G1) foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Em 962 plaquetas identificou-se 622 (65%) com pseudópodes e 928 (96%) com grânulos de localização citoplasmática central. Foram observadas 582 (60%) plaquetas com formato circular, 390 (41%) células com formato alongado e 892 (93%) apresentaram membrana celular íntegra (Figura 6; Tabela 2). O método utilizado para produção do PRP líquido (G1) ocasionou a ativação plaquetária que foi demonstrada pela MET a partir da observação da emissão de pseudópodes e organização central dos grânulos. A MET possibilita a observação de ultraestruturas celulares como mitocôndrias, centríolos, microtúbulos, algumas vesículas do complexo de Golgi e grânulos plaquetários específicos no citoplasma das plaquetas, denominados de α -grânulos, que possuem no seu interior uma substância granulosa

(MATTHWES; MARTIN, 1974). Ao serem ativadas por mecanismos fisiológicos, quando ocorre exposição ao colágeno, ou por agentes farmacológicos, as plaquetas perdem o formato discoide e tornam-se esféricas e irregulares devido a emissão de múltiplos pseudópodes e centralizam as organelas e grânulos citoplasmáticos. Durante o processo de agregação plaquetária, os microtúbulos são as estruturas responsáveis pela alteração do seu formato e também pelo retorno da forma discoide inicial (WHITE; RAO, 1998). As plaquetas se aglutinam entre si e na MET pode ser observada a ruptura dos α-grânulos plaquetários e também da membrana citoplasmática (MATTHWES; MARTIN, 1974). Neste experimento, por meio da avaliação pela MET, não foi notado destruição das plaquetas em G1. O PRP na forma líquida manteve a preservação dos α-grânulos plaquetários e consequentemente dos FCP durante o processo de centrifugação. O que possibilita serem ativados quando em contato com o colágeno do local da lesão tecidual.

Tabela 2. Alterações morfológicas, número e percentual de plaquetas no PRP líquido (G1) observada em microscopia eletrônica de transmissão.

Alteração plaquetária PRP líquido (G1)	Número de Plaquetas	%	P valor
Pseudópodes			
Presente	622	65 ^a	
Ausente	340	35 ^b	0,00*
Grânulos plaquetários			
Central	928	96 ^a	
Marginal	34	4 ^b	0,00*
Formato			
Circular	582	60 ^a	
Alongado	390	41 ^b	0,00*
Membranas			
Não íntegras	70	7 ^a	
Íntegras	892	93 ^b	0,00*
Número de grânulos citoplasmático			
< 3	348	36 ^a	
> 3	614	64 ^b	0,00*
Total de células avaliadas	962		

* Teste binomial para duas proporções. Letras diferentes demonstram diferenças estatísticas nas variáveis analisadas dentro de um mesmo grupo.

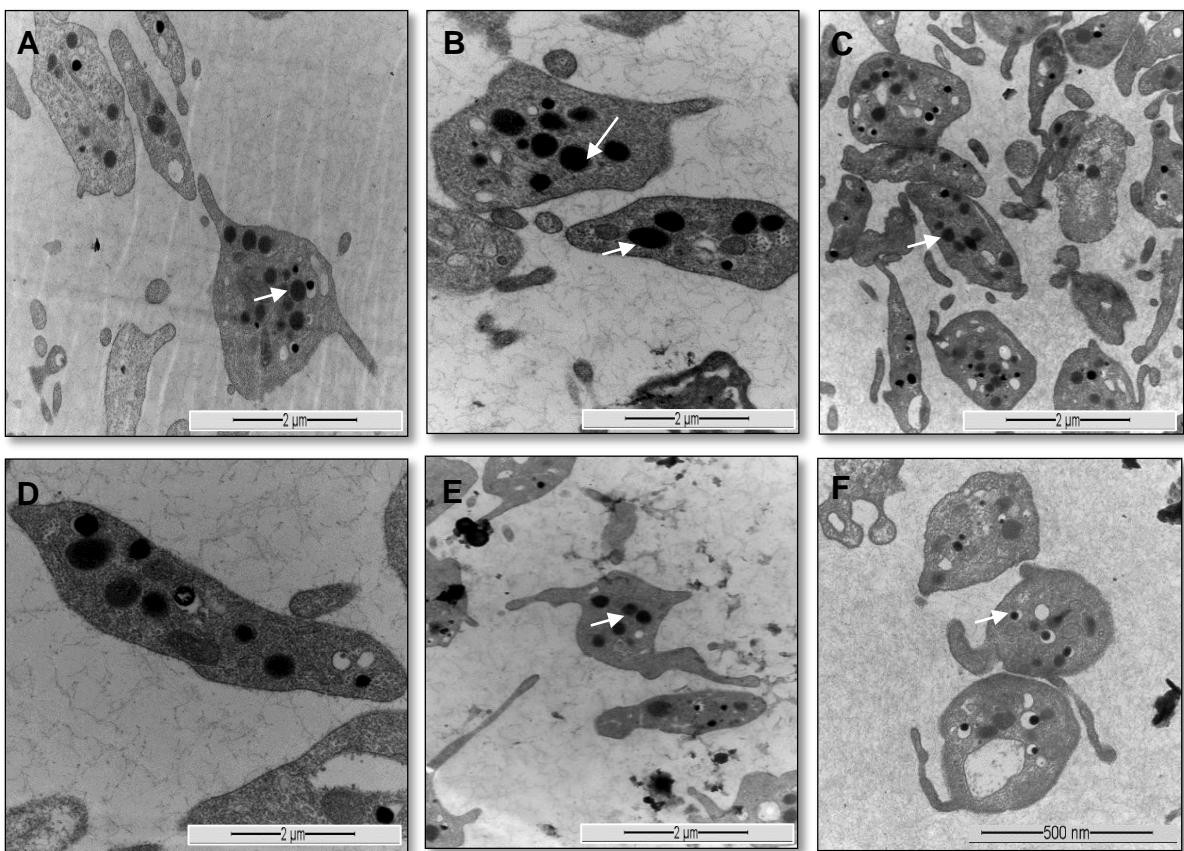


Figura 6. Morfologia das plaquetas de coelho observada em microscopia eletrônica de transmissão após obtenção do plasma rico em plaquetas autólogo com poucos leucócitos e hemácias (G1). Notar as plaquetas ativadas com formato arredondado e irregular, com pseudópodes e grânulos localizados centralmente no citoplasma (A, B, C, E e F – setas, 12.000x), formato alongado e globoso (C - 12.000x) e alongado não ativadas (D - 30.000x).

O processamento não ocasionou a degranulação precoce dos grânulos e não houve lise de membrana celular e indicou portanto, a preservação dos fatores de crescimento plaquetário. Foram identificadas apenas 70 (7%) plaquetas com ruptura de membrana no G1 (Tabela 2), que apresentavam-se com formato circular, sem a emissão de pseudópodes, com grânulos e organelas localizadas na periferia do citoplasma e indefinição dos limites de membrana (Figura 7). Recomenda-se a utilização de PRP de apresentação líquida em reparos teciduais uma vez que, além de apresentarem adequado porcentual de

plaquetas íntegras, estas ainda não passaram pelo processo de degranulação e preservam a integridade dos grânulos plaquetários (ZANDIM et al., 2012). A MET identificou em G1 plaquetas em repouso e com α-grânulos preservados no citoplasma, indicativo de preservação da capacidade de ativação plaquetária.

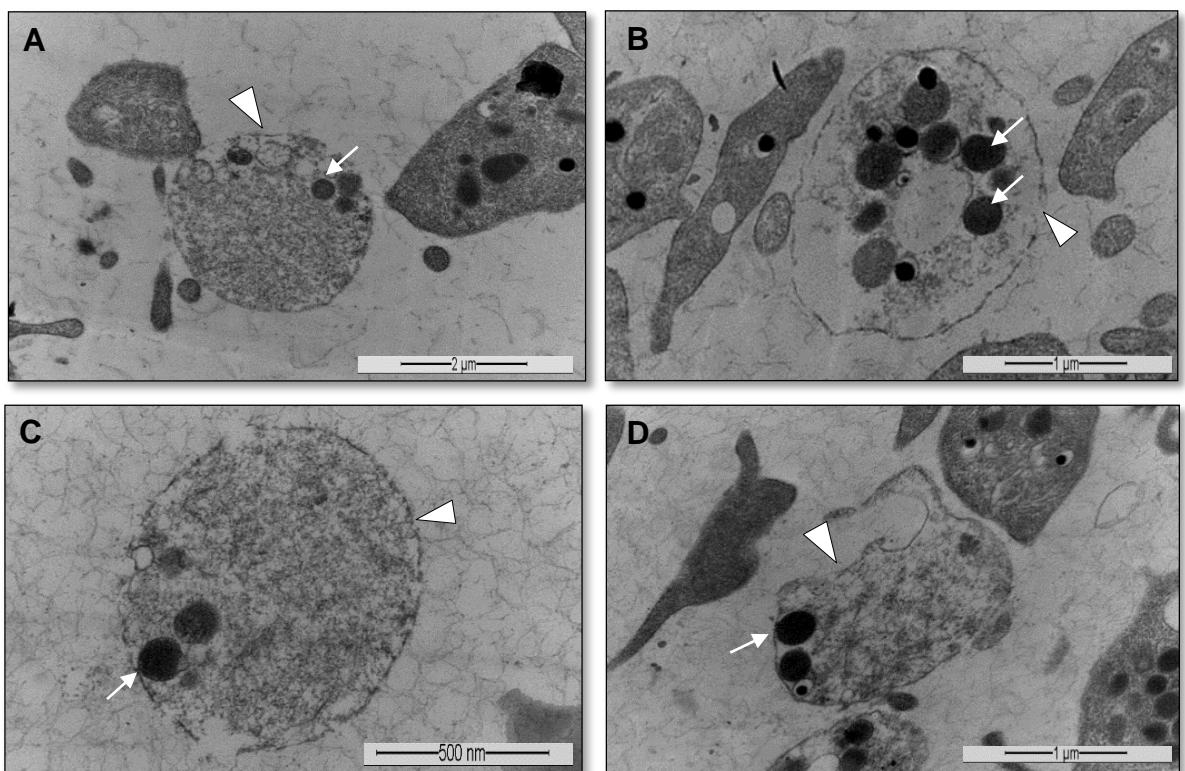


Figura 7. Morfologia plaquetária em microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando a degranulação de plaquetas no PRP de apresentação líquida (G1). Notar plaquetas em formato globoso, α-grânulos com localização periférica (A, B, C e D - setas) ausência de pseudópodes e indefinição dos limites de membrana celular (Δ) (A - 12.000x, B - 20.000x, C - 30.000x e D - 20.000x).

Não foi possível realizar a contagem do número total de plaquetas no G2 devido à indefinição entre uma e outra célula e de suas estruturas intracitoplasmáticas e por se encontrarem agrupadas e com membrana celular descontínua. Foram observados inúmeros debris celulares e campos repletos de fibras formadas por fibrina. Nas amostras do G2, alguns grânulos que sofreram exocitose puderam ser observados no espaço extracelular. Após ativadas

liberaram o conteúdo dos α -grânulos que apresentaram-se com formato globoso, porém com ausência de pseudópodes, membrana celular descontínua e com limites imprecisos (Figura 8). A capacidade de ativação das plaquetas no PRP líquido após a adição de cloreto de cálcio 10% e trombina foi investigada por Zandim et al. (2012) e Pretorius et al. (2007) e observaram a agregação plaquetária, indefinição dos seus componentes intracitoplasmáticos e ruptura dos α -grânulos. Ao serem expostas a um agente ativador farmacológico, as observações realizadas por MET nas amostras de G2 confirmaram que as plaquetas que foram submetidas ao método proposto apresentaram-se viáveis e aptas ao processo de ativação e degranulação.

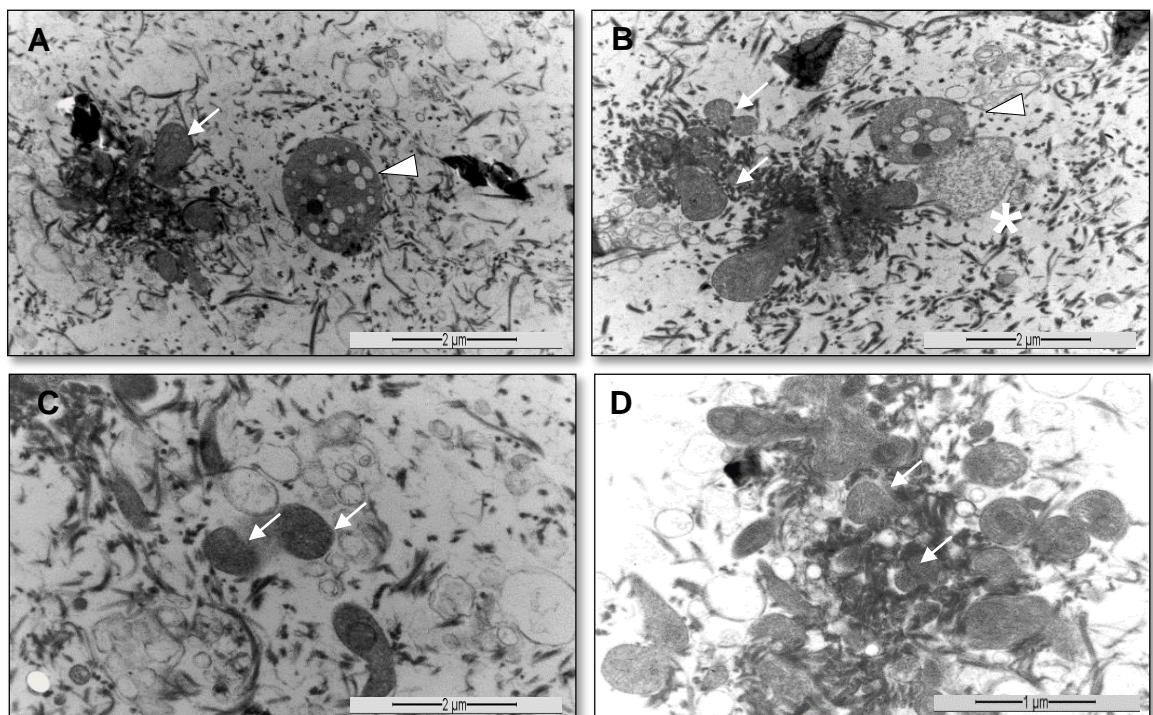


Figura 8. Plasma rico em plaquetas autólogo após ativação com tromboplastina e cloreto de cálcio (G2). Notar grânulos dispersos após a lise plaquetária (A, B, C e D – setas), agregação plaquetária e trama de fibrina em G2. Plaqueta íntegra, de formato circular, com grânulos e organelas na periferia do citoplasma (A e B - Δ , 12.000x), plaqueta degranulada com ausência de grânulos citoplasmáticos e limites de membrana celular indefinidos (B - *, 20.000x) e agregados de plaquetas degranuladas e malha de fibrina (C e D, 12.000x).

No G2, foi observada uma trama de fibrina organizada ao redor das plaquetas, como descrito por Pretorius et al. (2007) e Pretorius et al. (2009) ao utilizar a trombina para a formação do gel de plaquetas. A lise plaquetária liberou o fator III da coagulação que por sua vez estimulou a formação de tromboplastina que origina a trombina necessária à conversão do fibrinogênio em fibrina (MATTHWES; MARTIN, 1974; PRETORIUS et al., 2007). A fibrina induz a angiogênese e fornece um arcabouço para formação da matriz, migração e fixação de células progenitoras, além de possuir atividade quimiotática (MALHOTRA et al., 2013). A formação de fibrina indicou que as plaquetas foram capazes de liberar os fatores de coagulação e mantiveram-se funcionais após o processamento do PRP.

A precocidade no processo de cicatrização observada nos animais tratados com PRP não advém unicamente da presença de plaquetas e seus FCP. As células endoteliais e a fibrina que possuem atividade adesiva e de homeostasia, oferecem suporte aos fibroblastos e células tronco mesenquimais e aceleram o processo natural de organização estrutural de tecidos lesionados (SÁNCHEZ et al., 2009; VENDRAMIN et al, 2010; WASTERLAIN et al., 2012). Entretanto, as alterações plaquetárias observadas no G2 depois da adição de tromboplastina e cloreto de cálcio contra indicam a utilização do PRP gel *in vivo* por ter sido verificado na MET excessiva perda de grânulos plaquetários e possivelmente de fatores de crescimento. Além das alterações da morfologia plaquetária posterior ao processo de ativação e degranulação, a presença da malha de fibrina sobre as células dificultou ainda mais a observação das suas estruturas.

Não foram encontrados, leucócitos e hemácias nas imagens efetuadas pela microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto, Zandim et al. (2012) observaram pela mesma técnica, a existência de hemácias e plaquetas no PRP. Neste experimento, a ausência destas células, reforça que a contagem realizada pela técnica hematológica automática foi adequada, além de certificar que a técnica proposta é adequada para a obtenção de PRP com poucos leucócitos e hemácias.

V. CONCLUSÕES

O método de obtenção de plasma rico em plaqueta autólogo de coelhos é simples e de baixo custo, reduz o número de leucócitos e hemácias e as plaquetas se mantêm com integridade morfológica e funcional.

VI. REFERÊNCIAS

ACTION. Disponível em <<http://www.portalaction.com.br>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

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

ANDRADE, D. G. S.; DANTAS, D. B.; SADIGURSKY, M. Efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 6, n. 2, p. 204-213, 2007.

ANITUA, E.; ANDÍA, I.; SANCHEZ, M.; AZOFRA, J.; ZALDUENDO, M. D. M.; DE LA FUENTE, M.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 23, p. 281–286, 2005.

ANITUA, E.; ANDÍA, I.; SANCHEZ, M.; AZOFRA, J.; ZALDUENDO, M. D. M.; DE LA FUENTE, M.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by

human tendon cells in culture. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 6, n. 2, p. 204-213, 2007.

ARREGUY SILVA, P.S.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTÉRIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 1, P. 129-134, 2009.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2007, 364 p.

BATISTA, M. A. **Estudo experimental comparativo entre o plasma rico em plaquetas e o centrifugado de medula óssea na consolidação de falha em tíbia de coelho**: avaliação radiográfica, tomográfica e histomorfométrica. São Paulo. 65p. 2010. Dissertação (Doutorado Ortopedia e Traumatologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BOSWELL, S. G.; COLE, B. J.; SUNDMAN, E. A.; KARAS, V.; FORTIER, L. Current concepts with video illustrations platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. **Arthroscopy: the journal of arthroscopic and related surgery**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 429-439, 2012.

BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T. M.; GROOT, M. W.; CADBY, J. A.; VAN DE LEST, C. H. A.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 28, n.2, p. 211–217, 2010.

CARMONA, J. U.; ARGÜELLES D.; CLIMENT F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study J.U. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, Calif., v. 27, n. 4, p. 167 – 170, 2007.

- CARTER, C. A.; JOLLY, D. G.; WORDEN SR, C. E.; HENDREN, D. G.; CYNTHIA J.M. KANE. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v.74, n. 3, p. 244–255, 2003.
- EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G.; SCHONBERGER, J. P. A. M.; HOFFMANN, J.; PVERDEVEST, E. P.; BOX, H. A. M.; VAN ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of the American Society of Extra-Corporeal Technology**, Portland, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006a.
- EVERTS, P. A. M.; MAHONEY, C. B.; HOFFMANN, J. J. M. L.; SCHONBERGER, J. P.; BOX, H. A. M.; VAN ZUNDERT, A.; KNAPE, J. T. A. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. **Growth Factors**, Winona, v. 24, n. 3, p. 165-171, 2006b.
- FLAD, H. D.; BRANDT, E. Platelet-derived chemokines: pathophysiology and therapeutic aspects. **Cellular and Molecular Life Science**. Basel, v. 67, n. 14, p. 2363–2386, 2010.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de hematologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 205p.
- LI, G. Y.; YIN, J. M., DING, H.; JIA, W. T.; ZHANG, C. Q. Efficacy of leukocyte- and platelet-rich plasma gel (I-PRP gel) in treating osteomyelitis in a rabbit model. **Journal Of Orthopaedic Research**, New York, v. 31, n. 6, p. 949 - 956, 2013.
- KANG, Y.; JEON, S. H.; PARK, J. Y.; CHUNG, J. H.; CHOUNG, Y. H.; CHOUNG, H. W.; KIM, E. S.; CHOUNG, P. H. Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. **Tissue Engineering**: part A, New York, v. 17, n. 3, p. 394-359, 2011.
- KLEIN, C. P., WAGNER, S. C.; SILVA, J. B. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de

plaquetas através da comparação entre protocolos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 509-513, 2011.

LENZA, M.; FERRAZ, S. B.; VIOLA, D. C. M.; SANTOS, O. F. P.; CENDOROGLO NETO, M.; FERRETTI, M. Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. **Einstein**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 122-127, 2013.

MAIA, L.; SOUZA, M. V.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; OLIVEIRA, A. C.; ALVES, G. E. S.; BENJAMIN, L. A.; SILVA, Y. F. R. S.; ZANDIM, B. M.; MOREIRA, J. C. L. Platelet-Rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 29, n.8, p. 618-126, 2009.

MALHOTRA, A.; PELLETIER, M. H.; YU, Y; WALSH, W. R... Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, New York, v. 133, n. 2, p.153-165, 2013.

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

MARX, R. E. Quantification of growth factor levels using simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 58, n. 3, p. 300-301, 2000.

MATTHEWS, J. L.; MARTIN, J. H. **Atlas de histología y ultra estructura humanas**. Barcelona: Salvat, 1974.

MCCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 27, n. 8, p.1033-1042, 2009.

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

MESSORA, M. R.; NAGATA, M. J. H.; MELO, L. G. N.; FURLANETO, F. A. C.; DELIBERADOR, T. M.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo experimental em coelhos RSBO. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, Joinville, v. 6, n.3, p. 291-296, 2009b.

MIALE, J. **Hematologia**: medicina de laboratório. Barcelona: Reverte, 1985.1168p.

MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, R. J.; NETO, N. M. A. L.; BONFÁ, P.; VILORIA, M. V.; NEVES, C. D.; CARVALHO, P. H.; BRITO, A. F. S. Platelet-rich plasma contribute to the process of bone repair of critical defects created in the calvaria of mice. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.7, p.1590-1596, 2010.

NAGATA, M. J. H.; MESSORA, M. R.; CAMPOS, N.; POLA, N. M.; SALZEDAS, L. M. P.; BOMFIM, S. R. M.; FALEIROS, P. L.; SANTINONI, C. S.; BOSCO, A. F.; GARCIA, V. G. A proporção plasma rico em plaquetas/enxerto ósseo autógeno pode influenciar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico: um estudo radiográfico em calvária de ratos. **Revista de Odontologia UNESP**, Araraquara, v. 40, n. 6, p. 325-331, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, M. A., ALMEIDA, L. E.; PEREIRA, J. A.; NASSIF, P. A. N.; CZECZKO, N. G.; KUME, M. H.; SILVA, M. B. G. Plasma rico em plaquetas de coelhos: introdução a um modelo animal experimental. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 175-179, 2008.

PEREIRA, R. C. F. **Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP)**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

PRETORIUS, E.; BRIEDENHANN, S.; MARX, J.; SMIT, E.; DER MERWE, C. V.; PIETERS, M. C. F. Ultrastructural comparison of the morphology of three different platelet and fibrin fiber preparations. **The Anatomical Record**, New York, v. 290, n. 2, p. 188–198, 2007.

PRETORIUS, E.; VIEIRA, W. A.; OBERHOLZER, H. M. & AUER, R. E. J. Comparative scanning electron microscopy of platelets and fibrin networks of human and different animals. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 1, n. 27, p. 69-76, 2009.

R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.lsw.uni-heidelberg.de/users/christlieb/teaching/UKStaSS10/R-refman.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2013.

SÁNCHEZ, M.; ANITUA, E.; ORIVE, G.; MUJIKA, I.; ANDIA, I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. **Sports Medicine**, Auckland, v.39, n. 5, p. 345-354, 2009.

SCHALM, O. W.; WEISS, D. J.; WARDROP, K. J.; **Veterinary Hematology**. 6. ed. Ames: Willey-Blackwell, 2010, 1206p.

SCHWEIRGERT, A.; REZENDE, F. H.; FANTONI, D. T.; MOROZ, L. R. Avaliação da contagem plaquetária pelo contador automático QBC Vet Autoread comparado com estimativa em esfregaço sanguíneo e contagem em hemocitômetro. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 1001-1008, 2010.

SICCHIERI, L. G. **Engenharia de tecido ósseo**: avaliações in vitro e in vivo do biomaterial híbrido ácido poli-láctico-coglicólico/fosfato de cálcio e células osteoblásticas derivadas de células tronco. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; PAES LEME, F.; REZENDE, C. M. F. Avaliação hematológica do método do tubo para concentrar plaquetas em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA E JORNAL BRASILEIRO DE CIÊNCIA ANIMAL, 2010, Búzios. **Anais...** Búzios: JBCA, 2010a. p. 8.

SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; PAES LEME, F.; REZENDE, C. M. F. Avaliação hematológica do método do tubo para concentrar plaquetas no gato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA E JORNAL BRASILEIRO DE CIÊNCIA ANIMAL, 2010, Búzios. **Anais...** Búzios: JBCA, 2010b. p. 12.

SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. Uso de plasma rico em plaquetas intra-articulares como tratamento pós-cirúrgico da ruptura do ligamento cruzado cranial num cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 4, p. 847-852, 2012.

TEIXEIRA, M. L. C. D. **Efeito do laser de baixa intensidade na prevenção de aderências abdominais e cicatrização da pele após peritonectomia em modelo experimental**. 2012. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Biomedicina) - Núcleo de Pós-graduação e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 2012.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica**. São Paulo: Roca, 2006, 582p.

TRIOLA. M. F. **Introdução à estatística**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1999. 410p.

VANAT, N.; MEDEIROS, T. N. S.; BALARIN, M. R. S.; PEREIRA, P. M.; DE BIASI, F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 313-322, 2012.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; T. R. FRANCO. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de

preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 24 – 18, 2006.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; SCHAMALL, R. F.; FRANCO, T. R. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.589 - 594, 2010.

VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F.; MAIA, L.; QUIROZ, D. L.; WATANABE, M. J.; YAMADA, A. L. M.; ALVES, A. L. G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 106-110, 2012.

WASTERLAIN, A. S.; BRAUN, H. J.; DRAGO, J. L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. **Operative techniques in orthopaedics**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 33-42, 2012.

WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W.; BUCH, R.; HITZLER, W. E. Effect of platelet con-centration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, New York, v. 34, n. 4, p. 665-671, 2004.

WHITE, J. G.; RAO, G. H. R. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 152, n. 2, p. 596 – 609, 1998.

WILSON, E. M. K.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas: estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 208 – 212, 2006.

YAMADA, A. L.M.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, P. G. G.; FELISBINO, S. L.; QUEIROZ, D. L.; WATANABE, M. J.; HUSSUN, C. A.; ALVES, A. L. G. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e

histoquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 2, p. 323-332, 2012.

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