

# Protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) em gatos - Estudo piloto

*Protocols to platelet-rich plasma (PRP) obtainment in cats - pilot study*

**Bianca Bertoletti** – Médico Veterinário (MV), Mestre (MSc). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: bibertoletti@yahoo.com.br.

**Alceu Gaspar Raiser** – MV, MSc, Dr, Professor do PPGMV-UFSM.

**Mirian Denise Schalemborg** – Aluno de graduação, UFSM.

**Alexandre Krause** – MV, MSc, Dr, Professor do PPGMV-UFSM.

**Anne Santos do Amaral** – MV, MSc, Dr, Professor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), UFSM.

**Cássia Bagolin da Silva** – MV, MSc, PPGMV-UFSM.

**Virgínia Heinz Pohl** – MV, MSc, PPGMV-UFSM.

**André Vasconcellos Soares** – MV, MSc, Dr, Professor do PPGMV-UFSM.

**João Eduardo Wallau Schossler** – MV, MSc, Dr, Professor do DCPA- UFSM.

Bertoletti B, Raiser AG, Schalemborg MD, Krause A, Do Amaral AS, Da Silva CB, Pohl VH, Soares AV, Schossler JEW. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; 2014; 12(41); 1-637.

## Resumo

Este estudo piloto objetivou avaliar e comparar três protocolos manuais para produção de plasma rico em plaquetas (PRP), autólogo, em gatos. Utilizaram-se 15 amostras de sangue de três gatos adultos hígidos e domiciliados. Cinco amostras de 4,5ml de sangue foram colhidas da jugular de cada animal, por sistema a vácuo, sequencialmente, em tubos com citrato de sódio. As amostras foram processadas por meio de protocolos de dupla centrifugação: P1 (113g - 10 minutos; 652g - 5 minutos); P2 (400g - 10 minutos; 800g - 10 minutos); P3 (400g - 10 minutos; 600g - 10 minutos). As concentrações plaquetárias obtidas no PRP dos diferentes protocolos foram comparadas por ANOVA. A viabilidade do modo de coleta a vácuo para a espécie e a facilidade de execução das técnicas também foram avaliadas. O uso do sistema a vácuo mostrou-se satisfatório e simplificou o procedimento. Um dos protocolos (P1) não permitiu a separação de sangue em três fases após a primeira centrifugação. Duas das técnicas (P2 e P3) mostraram-se factíveis para a produção do PRP, proporcionando concentrações superiores a  $1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l. O protocolo P3 mostrou-se estatisticamente superior na habilidade de concentrar plaquetas. Conclui-se que o método de coleta é eficiente para o objetivo proposto; a execução das técnicas para obtenção do PRP em gatos, a partir de P2 e P3, pode ser considerada fácil; devido ao reduzido número de amostras, são necessários mais testes para que seja comprovada a eficiência dos protocolos para produção do PRP na rotina clínica de gatos.

**Palavras-chave:** felinos, fatores de crescimento, adjuvante, cicatrização.

## Abstract

This pilot-study aimed to evaluate and to compare three manual protocols of autologous platelets-rich plasma (PRP) achievement in cats. Fifteen blood samples collected from three adult healthy indoor cats were utilized. Five samples of 4.5 ml of jugular blood were collect with a vacuum system, sequentially in citrated tubes from each cat. The samples were processed using double centrifugation protocols (P): P1 (113g - 10 minutes; 652g - 5 minutes); P2 (400g - 10 minutes; 800g - 10 minutes); P3 (400g - 10 minutes; 600g - 10 minutes). Platelet concentrations obtained in PRP in different protocols were analyzed by ANOVA. The feasibility of the collect method to the species and ease of execution of techniques was evaluated too. The collect method was satisfactory and simplified the procedure. One of the protocols (P1) did not enabled the blood separation into three layers after first centrifugation step. Two techniques (P2 and P3)

were effective to produce PRP, yielding concentrations higher than  $1 \times 10^6$  platelets/ $\mu\text{L}$ . The protocol P3 was superior in the platelet concentration ability. The collect method was considered efficient to the purpose; the execution of the techniques to PRP preparation in cats, and two of the protocols (P2 and P3), may be considered relatively easy; although, due to the small number of samples, more tests are needed to prove the efficiency of these protocols for PRP production in clinic routine of cats.

**Keywords:** felines, growth factors, adjuvant, healing.

## Introdução

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena e pouco onerosa de fatores de crescimento (FC), que é preparada a partir do sangue total retirado do próprio paciente (1,2). O PRP é atóxico, não imunogênico e formado por plaquetas, leucócitos e plasma. Por meio da centrifugação do sangue, obtém-se um pequeno volume de plasma contendo alta concentração de plaquetas (3,4) que atuam no processo de hemostasia, cicatrização e re-epitelização de feridas (5).

O PRP vem sendo utilizado na odontologia com o intuito de favorecer a cicatrização desde a década de 1990, a partir de estudos realizados por Marx et al.(3). Esse autor introduziu o PRP como uma nova biotecnologia com possíveis efeitos terapêuticos e, a partir daí, cresceu o interesse no seu uso como biomaterial na medicina regenerativa, por sua capacidade de conduzir os mais diferentes tecidos ao reparo (4).

Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas estimulam a angiogênese, favorecendo o crescimento vascular e a proliferação de fibroblastos, os quais promovem o aumento na síntese de colágeno (5). Estudos realizados por Robson (6), Marx (5) e Freymiller e Aghaloon (7) revelam que ao menos sete fatores de crescimento diferentes secretados ativamente pelas plaquetas atuam na fase inicial da cicatrização, tornando-a mais eficiente. A ativação dos fibroblastos para a formação de protolágenos é feita pelos fatores de crescimento transformadores (TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2), resultando na deposição de colágeno e cicatrização da ferida. Os isômeros do fator de crescimento plaquetário (PDGF $\alpha\alpha$ , PDGF $\beta\beta$  e PDGF $\alpha\beta$ ), atuando ou não juntamente com os TGF, estimulam a proliferação dos fibroblastos, aumentam a vascularização tecidual e quantidade de colágeno, aprimoram a osteogênese e promovem a produção de tecido de granulação. A estimulação da angiogênese, mitogênese e permeabilidade vascular é conferida pelo fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF). Já o fator de crescimento epitelial (EGF), além de também promover a angiogênese, induz o crescimento do tecido epitelial.

As primeiras técnicas utilizadas para obtenção do PRP eram realizadas por máquinas de plasmáfese, em ambiente hospitalar. Posteriormente foram desenvolvidos protocolos empregando sistemas automatizados, que utilizam sangue colhido por punção venosa periférica e kits para aquisição do PRP, o que tornou o método mais simples, porém dispendioso (8). Centrífugas convencionais de mesa podem ser usadas para a produção de pequenos volumes de PRP, a partir de pequenos volumes de sangue (9). Esses protocolos são mais trabalhosos e exigem aprendizagem por parte do executor, mas permitem a preparação do PRP a baixo custo, podendo ser efetuado em ambiente mais simples (8).

Para que o PRP seja considerado terapêutico e tenha potencial de influenciar biologicamente as células de um leito receptor, deve apresentar concentração plaquetária mínima de  $1 \times 10^6$  plaquetas / $\mu\text{L}$  (1,5). Desta maneira, um PRP com contagem de plaquetas quatro a cinco vezes superior a do sangue é considerado adequado para alcançar respostas significativas (9). Marx (1) cita que, para que as plaquetas sejam verdadeiramente concentradas a partir do sangue autólogo, devem ser utilizados protocolos de dupla centrifugação. Este processo deve ser executado com precisão para que se obtenha plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras, pois a eficácia terapêutica do PRP pode ser reduzida se houver fragmentação das plaquetas e liberação dos fatores de crescimento precocemente (5). Além do número de centrifugações, fatores como força aplicada, tempo de centrifugação e redução do volume plasmático também influem na qualidade do PRP (10).

São vistos diferentes volumes sanguíneos empregados para a produção do PRP, em estudos distintos, realizados em humanos (2,3,4,10), cães (11,12,13), equinos (14) e coelhos (15,16). Nesses estudos, o sangue foi colhido em tubos, seringas ou

bolsas para transfusão contendo como anticoagulante o citrato de sódio, associado ou não a outros constituintes.

Lacoste et al. (17) referem que, para que os FC presentes no PRP sejam liberados é necessária a ativação das plaquetas. Para tal, podem ser empregados diferentes métodos que vão desde a adição de trombina bovina ou autóloga, até a exposição direta do colágeno em vivo (18). Estando as plaquetas ativadas, inicia a liberação dos FC de seus  $\alpha$ -grânulos imediatamente. Dentro de dez minutos 70% do total armazenado é secretado e, aproximadamente 100% é liberado dentro da primeira hora (1).

Apesar dos numerosos protocolos para obtenção do PRP descritos na literatura, não há um protocolo padrão para sua produção (19). Por sua aplicação ser mais recente na medicina veterinária, em comparação à medicina humana, são necessárias mais pesquisas para validação, padronização e seu melhor aproveitamento (20) nas diferentes espécies animais. Em pequenos animais, o uso do PRP é ainda menos frequente e os resultados obtidos referem-se principalmente à reparação óssea (11,13,21) e cicatrização cutânea (22,23) em cães. Em gatos, protocolos de dupla centrifugação para produção de PRP, visando seu uso como adjuvante da cicatrização, não são do conhecimento dos autores do presente estudo.

Para Welles et al. (24), gatos não são bons candidatos à separação de plaquetas, pois têm um volume relativo e total de sangue consideravelmente pequeno, quando comparados às demais espécies animais e pessoas. Além disso, possuem veias pequenas e temperamento difícil. Logo, métodos ideais para a separação de plaquetas em gatos devem requerer pequena quantidade de sangue e diminuir o risco da ativação plaquetária devido ao procedimento de coleta.

Acredita-se que os benefícios alcançados na cicatrização tecidual a partir do uso do PRP também possam ser obtidos para a espécie felina. Porém, até o momento, não existem dados reais sobre seu efeito terapêutico em felinos. Este estudo piloto tem por objetivo avaliar e comparar três protocolos para a separação do PRP em gatos. Também visa testar a viabilidade do modo de coleta e a facilidade de execução das técnicas, para que, futuramente, o PRP possa ser utilizado como adjuvante da cicatrização também na espécie felina.

## Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê em Ética no Uso dos Animais em Ensino e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, sob registro nº 011/2013, e seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 1. Obtenção das amostras de sangue

Para a obtenção das amostras de sangue foram utilizados três gatos machos, adultos jovens, com idade entre um e três anos, castrados, hígidos, pesando em média 4,4 kg (3,6 a 6,0kg), domiciliados, com consentimento de seus tutores (através de Termo de consentimento livre e esclarecido).

Os animais foram anestesiados com a associação cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam, na dose de 6mg/kg, por via intramuscular. A seguir, foi feita tricotomia ampla da região ventral do pescoço e nos membros torácicos. Fluidoterapia de manutenção (8ml/kg/h) foi instituída com ringer lactato de sódio através de venoclise da cefálica com cateter nº 22G. Com os animais anestesiados, posicionados em decúbito dorsal, foi realizada antissepsia com solução de clorexidina 0,5% em meio alcoólico. Em seguida, foi procedida a punção da jugular utilizando sistema de coleta de sangue a vácuo (Vacutainer®), com agulha 21G1 e tubos estéreis com citrato de sódio a 3,2%. Foram colhidas cinco amostras de 4,5ml de sangue, sequencialmente, de cada um dos animais, totalizando 22,5ml de sangue. Todas as coletas de sangue foram realizadas de forma asséptica, pelo mesmo operador. O sangue foi homogeneizado, mantido refrigerado durante o transporte. Cada protocolo foi testado em cinco amostras de um mesmo animal.

### 2. Processamento do PRP

A manipulação do sangue para obtenção do PRP ocorreu em sala com temperatura controlada (22°C), em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultravioleta durante 30min. Todas as etapas de manipulação das amostras até a produção do PRP foram realizadas pelo mesmo operador.

Foram testados três diferentes protocolos para obtenção do PRP, referidos como P1, P2 e P3. Em linhas gerais, para cada um dos protocolos adotados, as cinco amostras de sangue em citrato foram homogeneizadas e centrifugadas (centrífuga Centri-

## Protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) em gatos

bioTDL80-2B), em forças e tempos pré-estabelecidos (Tab. 1).

Após a primeira centrifugação do sangue total, foi esperada a separação dos constituintes em três frações, de acordo com seu gradiente de densidade: a fase inferior, constituída pelos eritrócitos, a intermediária, formada pela zona da névoa (ZN), onde estão as plaquetas maiores e os leucócitos, e a superior, representada pelo plasma e as plaquetas.

| Protocolo | 1ª centrifugação | 2ª centrifugação |
|-----------|------------------|------------------|
| P1        | 113G – 10min     | 652G – 5min      |
| P2        | 400G – 10min     | 800G – 10min     |
| P3        | 400G – 10min     | 600G – 10min     |

**Tabela 1-** Protocolos (P1, P2, P3) de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) em felinos.

As frações correspondentes à ZN e ao plasma foram aspiradas com o auxílio de pipeta automática e transferidas para um tubo Falcon de 15 ml estéril. O volume restante, correspondente aos eritrócitos, foi desprezado. A seguir, os tubos Falcon foram centrifugados (centrífuga microprocessadora Quimis Q222TM204) no tempo e velocidade especificados para cada um dos protocolos na Tabela 1.

A partir da segunda centrifugação foi obtido o plasma pobre em plaquetas (PPP), localizado na região superior do tubo e, ao fundo, um botão com o concentrado de plaquetas junto com leucócitos e alguns eritrócitos. Parte do PPP foi retirado e desprezado, mantendo-se o volume restante para diluir as células do botão, que foram homogeneizadas cuidadosamente, formando o PRP. O volume final obtido de PRP correspondeu a aproximadamente 10% do volume de sangue total coletado.

### 3. Avaliação laboratorial

Para a contagem plaquetária basal, foi coletado 0,5 ml de sangue da veia jugular imediatamente após a coleta para a separação do PRP. Este foi acondicionado em tubos contendo EDTA e homogeneizado. Foram empregados 50 µL do PRP para determinar a quantidade de plaquetas. As contagens de plaquetas basal e do PRP foram realizadas manualmente em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico binocular com aumento de 400x. Cada

amostra foi previamente diluída e homogeneizada em líquido de Brecehr (oxalato de amônia a 1%). Ao dividir o número de plaquetas obtido no PRP pelo número de plaquetas no sangue total, foi obtido o índice de concentração de plaquetas. As avaliações laboratoriais do sangue e PRP foram realizadas sempre pelo mesmo operador.

### 4. Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SigmaStat versão 3.5 (Systat Software Inc.). Os resultados obtidos foram avaliados por análise da variância pelo método de Holm-Sidak para comparação das concentrações plaquetárias nos diferentes protocolos. O nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$ .

## Resultados e discussão

O método utilizado para coleta do sangue mostrou-se satisfatório. O uso da coleta a vácuo tornou o procedimento mais fácil, visto que há refluxo de sangue para os tubos imediatamente após a punção, minimizando o risco de transfixação do vaso e ativação das plaquetas pelo dano causado pela punção. Esse mesmo sistema também foi utilizado para produção de PRP por Barbosa et al. (11) e Vanat et al. (12) em estudos utilizando cães. Apesar de Everst et al. (9) indicarem o uso de agulhas com numerações superiores a 17G ( $\varnothing=1,33\text{mm}$ ), para evitar possíveis danos às plaquetas, nesse estudo utilizaram-se agulhas com menor calibre. Com agulhas 21G (25X0,8mm) foi possível realizar a coleta e não foram visualizados agregados plaquetários, que indicariam ativação das plaquetas, durante a contagem manual.

Com relação à coleta, esperava-se que os tubos fossem preenchidos com velocidade semelhante, com uma única punção em cada animal; entretanto, observou-se grande variação, tanto no número de punções necessárias, quanto na velocidade em que os tubos foram preenchidos. Para evitar que esses fatores influenciassem no resultado obtido, foi padronizado que cada animal corresponderia a um protocolo. No animal do protocolo P1 foi possível preencher quatro tubos com a primeira punção no lado direito, sendo necessário coletar o último tubo da jugular esquerda. A coleta de sangue dos cinco tubos do animal do grupo P2 foi feita na jugular

direita. E, para P3, foi possível coletar os três primeiros tubos na jugular esquerda e os dois tubos seguintes foram então coletados da jugular direita. Para todos os animais, o garroteamento da veia jugular foi desfeito sempre que se realizava a troca de tubo, com o intuito de favorecer seu preenchimento. Para os protocolos P1 e P2, foram utilizadas forças e tempos já descritos previamente na literatura por Barbosa (13) e Vendramin et. al. (10), respectivamente. Porém, no presente estudo, modificaram-se algumas variáveis como o método de coleta, os tipos de tubos utilizados, tipo de anticoagulante e centrífugas.

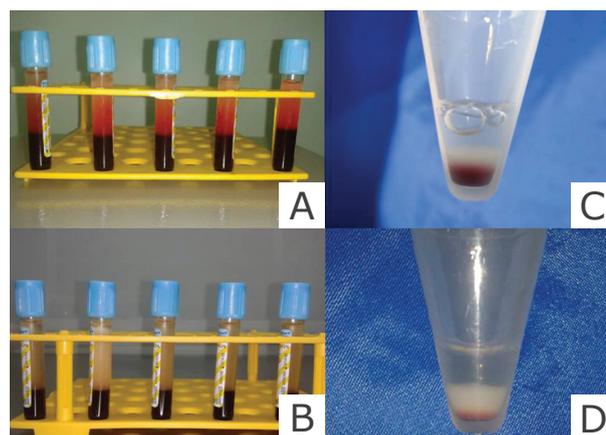
Ao utilizar a força de 113 g na primeira centrifugação (protocolo P1), não houve separação do sangue em três fases em nenhum dos cinco tubos. Optou-se por homogeneizar o sangue e centrifugá-lo novamente, com a velocidade de 400g, que seria utilizada nos outros dois protocolos, apenas para teste. Nesta nova centrifugação obteve-se a separação esperada, porém esse resultado não foi utilizado. Apesar de não poder se descartar possível variação individual, já que neste estudo foram utilizadas cinco amostras do mesmo animal para cada protocolo, considerou-se importante a não separação do sangue com a utilização desse protocolo. A mesma velocidade já havia sido utilizada com êxito por Pereira et al. (14) em um estudo que utilizou equinos e por Barbosa (13) que testou cães e coelhos.

Optou-se pela utilização de técnicas com dupla centrifugação, pois o objetivo foi a obtenção de PRP. Quando utilizada uma única centrifugação, a concentração total de plaquetas é mais baixa, por se tratar de uma mistura de plasma pobre em plaquetas (PPP) e PRP (1). Essa baixa concentração foi vista no estudo com centrifugação única, realizado por Molano (25), que utilizou gatos.

Diferentemente dos dados obtidos por Vendramin et. al. (10) e Pereira et. al. (14), não se conseguiu maior concentração de plaquetas com o aumento da força g. Ao ser utilizada uma força menor na segunda centrifugação em P3 (600g) houve maior concentração de plaquetas. Não se sabe ao certo porque isso aconteceu, já que não foram utilizadas forças excessivamente altas em P2 (800g). Durgrillon et. al. (26) ao utilizarem forças superiores a 800g na segunda centrifugação, relataram a liberação precoce dos FC e agregação plaquetária. Não foram mensurados os FC nesse estudo, mas como já mencionado anteriormente, não houve visualização de agregados plaquetários durante a contagem manual em

nenhuma das cinco repetições de P2 e P3.

Tanto no P2 como em P3 foi possível realizar a separação do PRP, conforme o esperado, com protocolo de dupla centrifugação (Figura 1). Em ambos obtiveram-se concentrações superiores a 1.000.000 de plaquetas/ $\mu\text{L}$ , ou mais de quatro a cinco vezes o valor da contagem de plaquetas basal, para todas as cinco repetições, favorecendo seu potencial terapêutico (1,5,9).



**Figura 1** – Processamento do sangue. Separação após a primeira centrifugação: (A) em P2; (B) em P3. Botão plaquetário formado após a segunda centrifugação: (C) em P2; (D) em P3.

A contagem média de plaquetas obtida no PRP em P2 foi de 5.206.000 ( $\pm 609.297$ ) plaquetas/ $\mu\text{L}$ , o que corresponde a concentração 9,33 vezes superior à contagem basal, que foi de 558.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ . Já com PRP produzido em P3, em que se obteve a média de 7.912.220 ( $\pm 1.447.582$ ) plaquetas/ $\mu\text{L}$ , atingiu-se a concentração média de plaquetas 22,67 vezes superior à encontrada no sangue (349.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ ). Ao se comparar ambos os protocolos, houve diferença estatisticamente significativa ( $P=0,005$ ), sendo o protocolo P3 mais eficiente em concentrar grande número de plaquetas em um pequeno volume de plasma.

Estudos (1,5,9) consideram que, para alcançar respostas significativas, o PRP deve atingir a concentração plaquetária de  $1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  (1,5) o que corresponderia a aumento quatro a cinco vezes superiores a contagem de plaquetas do sangue (9). Ainda existem divergências quanto ao fator dose-resposta. Relata-se que quando os receptores específicos para FC da superfície da célula estão completamente ocupados, concentrações crescentes desses

fatores parecem não ter qualquer efeito benéfico adicional. Ou, por outro lado, alguns FC poderiam exercer um efeito inibitório sobre as funções das células, quando em altas concentrações (27).

A concentração final de plaquetas de qualquer PRP é determinada pelo volume inicial de sangue coletado, pela eficiência na recuperação de plaquetas pela técnica utilizada e volume final de plasma utilizado para ressuspender as plaquetas concentradas. A alteração de qualquer uma das três variáveis irá alterar proporcionalmente a concentração final do PRP (28). Tendo em vista esses dados, acredita-se que as altas concentrações de plaquetas alcançadas nesse experimento ilustram a real eficiência de recuperação de plaquetas pelos protocolos executados, principalmente em P3 ( $7.912.220 \pm 1.447.582$ ). Para evitar possíveis efeitos inibitórios devido às altas concentrações obtidas, sugere-se que a redução do PPP na etapa final seja menor, pois no presente estudo optou-se por manter um volume que correspondesse a 10% do total de sangue coletado. Como resultado, haverá maior volume de PRP, para utilização em áreas mais extensas, ainda mantendo concentração que o torna terapêutico.

Apesar dos protocolos realizados utilizarem um volume de sangue total de 22,5ml, que pode ser considerado relativamente elevado para gatos, correspondendo em média a 5,11ml/kg por animal, em cada uma das repetições empregou-se apenas 4,5ml. Essas repetições ocorreram para garantir a reprodutibilidade da técnica. Logo, se for considerado cada tubo individualmente, é possível obter excelente concentração de plaquetas em P2 e P3, com pequeno volume de sangue em gatos, o que torna ambos os protocolos adequados para uso na clínica e cirurgia de felinos.

Optou-se por não realizar a ativação do PRP devido às possibilidades de seu uso na forma líquida parecerem mais vantajosas para os autores do presente estudo. Quando o PRP é injetado diretamente na ferida, a ativação das plaquetas, para liberação dos FC, pode ocorrer por meio de substâncias geradas pelo traumatismo provocado pela agulha no tecido e, principalmente pelo colágeno tecidual (29). Westerlaine et. al. (18) alegam que essa ativação, tem como vantagens a possibilidade de aplicação do PRP através de agulhas pequenas, porque o coágulo ainda não foi formado, eliminação de riscos de reação imunológica, como na ativação exógena, e leva a liberação de FC de forma mais lenta e continuada, em comparação à trombina. Vendramin

et. al. (29), em um estudo que objetivou buscar a melhor forma de aplicação do PRP em enxertias cutâneas em coelhos, concluíram que a forma líquida, além de demonstrar melhores resultados, tem preparação mais rápida e a aplicação direta sob a ferida mostrou-se mais fácil, uniforme e com menor desperdício, em comparação ao gel. Por dispensar a preparação da trombina autóloga, houve economia de tempo e diminuição nos custos de sua execução.

A simplificação no preparo, por meio de técnicas manuais, permitiu a difusão de pesquisas sobre o PRP. Contudo, essas técnicas são mais trabalhosas (8) e sua execução por pessoa treinada é enfatizada, por estarem mais sujeitos a erros durante a preparação, prejudicando a qualidade do produto (10,29).

O processamento manual do PRP, nesse estudo, foi realizado por profissional com experiência em práticas laboratoriais, que realizou manipulação cuidadosa, principalmente quando utilizadas as pipetas automáticas, para evitar danos às plaquetas.

Logo, os autores consideraram os protocolos de fácil execução, mas por conter várias etapas, também os avaliam como trabalhosos.

## Considerações finais

Apesar da obtenção de boas concentrações de plaquetas em P2 e P3, e da não separação do sangue em P1, considera-se fundamental a realização de mais testes utilizando a mesma metodologia. A existência de variação individual não pode ser excluída em nenhuma das três técnicas testadas, mesmo com as cinco repetições.

O método de coleta mostra-se eficiente para o objetivo proposto e pode-se considerar relativamente fácil a execução das técnicas para obtenção do PRP em gatos, a partir dos protocolos P2 e P3. Embora se tenha utilizado pequeno número de amostras, foi vista real possibilidade de produção de PRP, visando aplicação clínica como adjuvante no reparo tecidual, para essa espécie.

## Referências

1. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001; 10(4):225-8.
2. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical applications.* *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84(6):1032-44.
3. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for

## Protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) em gatos

- bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(6):638-46.
4. Klein CP, Wagner SC, Silva JB. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. *R Bras Bioci.* 2011; 4(9): 509-13.
  5. Marx RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(4): 489-96.
  6. Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound repair and regeneration.* 1997; 1(5):12-7.
  7. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(4):484-8.
  8. Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2006; 1(33): 24-8.
  9. Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overvest EP et al. Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel: A Review. *J Extra Corpor Technol.* 2006; 38(2):174-87.
  10. Vendramin FS, Franco D, Franco TR. et. al. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2009; 24(2): 212-18.
  11. Barbosa ALT, Del Carlo JR, Gomes HC, Oliveira AC, Monteiro BS, Del Carlo BND. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. *Cienc rural* 2008; 5(38):1335-1340.
  12. Vanat N, Medeiros TNS, Balarin MRS, Pereira PM, Biasi F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. *Semina Cienc Agrar* 2012; 1(33):313-21.
  13. Barbosa ALT. Células-tronco mononucleares associadas ao plasma rico em plaquetas na cicatrização da falha óssea no cão [Tese de doutorado]. Santa Maria: Faculdade de Medicina Veterinária da UFSM, 2013.
  14. Pereira RCF Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). [Dissertação de mestrado]. Santa Maria: Faculdade de Medicina Veterinária da UFSM, 2012.
  15. Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng.* 2007; 13(1):147-58.
  16. Garcez TNA. Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvante da cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos nova zelândia [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, 2012.
  17. Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol,* 2003; 10(74): 1498-507.
  18. Wasterlain A, Braun HJ, Dragoo JL. Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. *Oper Tech Orthop.* 2012; 22(1):33-42.
  19. Andrade MG, de Freitas Brandão CJ, Sá CN, de Bittencourt TC, Sadigursky M. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(1):e5-e12.
  20. Maia L, Souza MV. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. *Cienc Rural,* 2009; 4(39):1267
  21. Silva SB, Ferrigno CRA, Sterman FA, Baccarin DCB, Yazbek KVB, Muramoto C, Amaku M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. *Cienc Rural* 2007; 4(37):1045-51.
  22. Kim JH, Park C, Park HM. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol.* 2009 Apr; 20(2):123-6.
  23. Hermeto LC, Rossi R, Pádua SB, Pontes ERJ, Santana AE. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. *Acta Cir Bras.* 2012; 11(27):789-94.
  24. Welles EG, Bourne C, Tyler JW, Boudreaux MK. Detection of Activated Feline Platelets in Platelet-rich plasma by use of fluorescein-labeled antibodies and flow cytometry. *Vet Pathol.* 1994 Sep; 31(5):553-60.
  25. Molano R. Caracterizações celular e ultra-estrutural do concentrado de plaquetas em cães e gatos e avaliação do seu efeito na ortartrose em cães [Tese de doutorado]. Belo Horizonte: Escola de Medicina Veterinária da UFMG, 2012.
  26. Durgrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31(6):615-9.
  27. Ranly DM, McMillan J, Keller T, Lohmann CH, Meunch T, Cochran DL, et al. Platelet-derived growth factor inhibits mineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immune-compromised mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87(9):2052-64
  28. Arnoczky S, Delos D, Rodeo S. What Is Platelet-Rich Plasma? *Oper Tech Sports Med.* 2011; 19(3 ):142-8.
  29. Vendramin FS, Franco D, Schamall RF, Franco TR. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. – *Rev. Bras. Cir. Plást,* 2010-a; 1(25):4-10.

Recebido para publicação em: 10/06/2011.

Enviado para análise em: 13/06/2011.

Aceito para publicação em: 15/06/2011.