

MARCELA OLIVEIRA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TROMBOPLASTINA E
TROMBINA AUTÓGENA PARA ATIVAÇÃO DO GEL DE PLASMA
RICO EM PLAQUETAS DE CÃES**

Recife

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TROMBOPLASTINA E
TROMBINA AUTÓGENA PARA ATIVAÇÃO DO GEL DE PLASMA
RICO EM PLAQUETAS DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:
Profa. Dra. Grazielle Anahy de Sousa Aleixo

**Recife
2016**

Ficha catalográfica

S192a Sampaio, Marcela Oliveira

Avaliação comparativa entre tromboplastina e trombina autógena para ativação do gel de plasma rico em plaquetas de cães / Marcela Oliveira Sampaio. – Recife, 2016.
60 f. : il.

Orientadora: Grazielle Anahy de Sousa Aleixo.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Medicina Veterinária, Recife, 2016.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Cirurgia reconstrutiva 2. Plasma enriquecido de
plaquetas 3. Fatores de crescimento 4. Cão I. Aleixo, Grazielle
Anahy de Sousa, orientadora II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TROMBOPLASTINA E
TROMBINA AUTÓGENA PARA ATIVAÇÃO DO GEL DE PLASMA
RICO EM PLAQUETAS DE CÃES**

Dissertação de Mestrado elaborada por

MARCELA OLIVEIRA SAMPAIO

Recife, 29 de Fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Grazielle Anahy de Sousa Aleixo
Orientadora/Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dra. Lílian Sabrina Silvestre de Andrade
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dedico

A todos os animais que me permitiram cuidar deles até o presente momento.

AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus,

À minha orientadora Profa. Dra. Grazielle Anahy de Sousa Aleixo, sempre preocupada, tranquila e doce;

Ao meu companheiro Bruno Resende, que me apoia em tudo o que faço e que ama os animais tanto quanto eu, pela disponibilidade de sempre, paciência e amor;

Aos meus pais Maria Brandão e Marcelo Cavalcanti, minha irmã Milena Sampaio e meu cunhado Antônio Mourato e meus sogros Jane Resende e Reginaldo Silva;

À querida Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho, por ter sido minha orientadora durante toda minha vida acadêmica e por me apresentar uma orientadora no mestrado que é excelente como pessoa, professora e profissional (Grazy);

À minha querida companheira de aventuras no mestrado, Letícia Bezerra que me ajudou bastante na execução do presente experimento. Sem ela as coletas seriam tristes e solitárias e eu não teria com quem compartilhar um delicioso suco verde e muitas guloseimas;

Aos meus amigos, Maria Medeiros (prima e amiga), Jéssica Bandeira, Tiara Nogueira, Scheilla Araújo, Mirna Mendonça, Priscila Germany, Vitor Marques, Melina Barreto, Fernanda Alves, Isabela Castro, Luiz Eduardo e Renato Souto, Vanessa Souza, Nadja, Marisa e Larissa;

À Dra. Telga Lucena pelos conselhos profissionais e ajuda na produção dos exames;

Aos veterinários Janaína Guimarães, Mayumi Ono, Maria Conceição Carvalho e André Mariano, assim como os Professores Dr. José Wilton Pinheiro Júnior, Dr. Roberto Soares de Castro e Dra Rita de Cassia Carvalho Maia pela colaboração;

Aos pacientes e tutores que voluntariamente participaram dessa pesquisa;

À CAPES pela bolsa concedida;

Agradeço a todos!

“O trabalho só nos cansa, se não nos dedicarmos a ele com alegria”

Rabindranath Tagore

RESUMO

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado plaquetário obtido no final do processo de centrifugação do sangue total. O produto tem sido estudado na reparação tecidual pelo fato das plaquetas conterem no seu interior fatores de crescimento que estimulam processos orgânicos como a mitogênese e a angiogênese. Para que ocorra a liberação de tais fatores de crescimento no tecido onde o PRP é aplicado, as plaquetas precisam ser ativadas, e isso ocorre através da adição de substâncias denominadas fatores de ativação. A partir desse momento, o PRP adquire uma consistência gelatinosa, o que facilita sua aplicação e fixação no tecido alvo, passando a ser denominado gel de plaquetas. Levando em consideração que não existe um único protocolo de obtenção do gel de plaquetas e que diferentes fatores ativadores podem ser utilizados na sua produção, objetivou-se com essa pesquisa realizar uma análise comparativa de dois fatores ativadores: trombina autógena e tromboplastina, com relação a facilidade de aquisição, custo, formação do gel após a ativação e quanto ao risco de contaminação do PRP por meio de análise bacteriológica. Para realização do experimento foram selecionados 20 cães saudáveis dos quais foram coletados amostras de sangue, no total de 18 mL de cada animal para produção do gel de plaquetas pelo método manual usando dois tempos de centrifugação, sendo a primeira centrifugação de 1200 rpm e a segunda 1600 rpm, ambas durante 10 minutos. As amostras de sangue foram divididas igualmente em três grupos, sendo cada grupo com 20 amostras: grupo A (PRP sem ser adicionado fator ativador-controle), grupo B (gel de plaquetas ativado com trombina autógena) e grupo C (gel de plaquetas ativado com tromboplastina). As amostras de PRP líquido (Grupo A) possuíam a coloração variando do transparente esbranquiçado a rósea e as mesmas se mantiveram na forma líquida durante todo o tempo de observação. No grupo B a coloração se manteve turva à medida que o gel era formado e as amostras levaram de 1 a 2 minutos para gelificar, entretanto 40% das amostras continuavam na forma líquida, mesmo sendo adicionado o dobro da proporção do fator ativador. Nas amostras do Grupo C a coloração ficou translúcida e foi formado um gel de consistência firme no tempo máximo de 30 segundos em 100% das amostras. Não houve contaminação das amostras de todos os grupos de acordo com análise bacteriológica. Conclui-se que, apesar da trombina autógena e tromboplastina serem de fácil aquisição na cidade do Recife (Pernambuco), a tromboplastina é uma melhor opção de fator ativador para o gel de PRP por apresentar menos custo e ser mais eficiente em gelificar todas as amostras.

Palavras-chave: Cirurgia reconstrutiva; plasma enriquecido de plaquetas; fatores de crescimento.

ABSTRACT

The Platelet Rich Plasma (PRP) is a platelet concentrate obtained at the end of the centrifugation process whole blood. The product has been studied in tissue repair because platelets contain inside growth factors that stimulate organic processes such as mitogenesis and angiogenesis. For the occurrence of release such growth factors into the tissue which is applied PRP, platelets need to be activated, and this occurs by the addition of substances called activation factors. From that moment, the PRP acquires a gelatinous consistency, which facilitates application and fixing the target tissue, happening to be called platelet gel. Taking into consideration that there is no single protocol for obtaining the platelet gel and different activating factors can be used in their production, aimed with this research conduct a comparative analysis of two activators factors: autogenous and thromboplastin thrombin with respect to ease of acquisition, cost, gel formation after activation and the risk of contamination of PRP through bacteriological analysis. To perform the experiment were 20 healthy dogs which were collected blood samples, a total of 18 ml for each animal for the production of platelet gel by the manual method using two centrifugation times, the first centrifugation at 1200 rpm and second 1600 rpm both for 10 minutes. Blood samples were equally divided into three groups, each group of 20 samples of group A (PRP without added activator control factor), group B (gel activated platelets with autologous thrombin) and group C (platelet gel activated with thromboplastin). Samples of PRP liquid (Group A) had varying in color from whitish to transparent rosea and the same is maintained in liquid form during the whole observation time. In group B staining remained cloudy as it was formed and the gel samples took 1 to 2 minutes to gelatinize, although 40% of the samples were still in liquid form, even with double the added proportion of activator factor. Samples in Group C was translucent and the color was formed a firm gel consistency maximum time of 30 seconds at 100% of the samples. There was no contamination of samples from all groups according to bacteriological analysis. It follows that although the autogenous and thromboplastin thrombin be easily acquired in Recife (Pernambuco), thromboplastin proved to be a better activating factor option for PRP gel have less cost and be more efficient gelling all samples.

Keywords: reconstructive surgery; platelet rich plasma; growth factors.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Revisão de Literatura

Figura 01. Esquema de corte histológico do tegumento, demonstrando todas as camadas e estruturas anexas.	16
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EGF = Fator de crescimento epidérmico
FC's = Fatores de Crescimento
FC's = Fatores de Crescimento
FCP = Fatores de Crescimento Plaquetário
G = Gravidade
IGF = fator de crescimento semelhante a insulina
MICs = microimplantes capilares
PDGF = Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PDGF = Fator Derivado de Plaqueta
PDGFs = Fator Derivado de Plaquetas
PeRP = Plasma enriquecido de plaquetas
PPP = Plasma pobre em plaquetas
PRC = Concentrato rico em plaquetas
PRP = Plasma rico em plaquetas
Rpm = Rotação por minuto
TGF= Fatores de crescimento de transformação
TGF-13s= Fatores de crescimento de transformação 13s
TGF- α = Fator de crescimento transformante- α
TGF- β = fator de crescimento transformador beta
TGF- β 1= Fator de crescimento de transformação-beta 1
TGF- β 2= Fator de crescimento de transformação-beta 2
VEGF = Fator de crescimento de células endoteliais

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PELE E SUA CICATRIZAÇÃO	14
2.2 PRP E OS FATORES DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA	15
2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PRP	17
2.4 FATORES DE ATIVAÇÃO DO PRP	19
2.5 MODALIDADES TERAPÊUTICAS PARA APLICAÇÃO DO PRP.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
4. Artigos.....	30
ARTIGO I.....	31
ARTIGO II.....	43
5. ANEXO	54
ANEXO A: Licença concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para o uso de animais no experimento.....	54
ANEXO B: Informações como raça, idade, sexo, peso e procedência dos animais da pesquisa.	55
ANEXO C: Termo de consentimento para realização da pesquisa por parte dos tutores dos animais.	56
ANEXO D: Normas para publicação da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (Brazilian Journal of Medicine).....	57

1. INTRODUÇÃO

As feridas, também denominadas lesões, são interrupções da integridade cutânea e/ou da mucosa, que resultam em desequilíbrios e agravos da saúde da pele (IRION, 2005). De modo geral, a causa da lesão determina a gravidade e sua extensão, bem como o envolvimento de tecidos adjacentes (SLATTER, 2007).

O que se observa rotineiramente na clínica cirúrgica de pequenos animais são casos de grandes perdas cutâneas, que representam um problema grave para o tratamento do paciente, sendo necessário a aplicação de técnicas alternativas que potencializem a cicatrização (MESTRE et al., 2012).

Segundo Melega (2002), na reparação de tecidos se deseja a reabilitação das funções dos órgãos e reposição de substâncias perdidas para se obter um resultado final que se aproxime ao máximo do que se tinha antes. Antigas e novas técnicas são de extrema importância na reparação de grandes defeitos teciduais, gerando não apenas um resultado funcional, mas também estético, que auxilia na cicatrização (SCHEFFER et al., 2013).

Com relação aos avanços alcançados nos últimos anos na área de reparação tecidual, tem-se o plasma rico em plaquetas (PRP), que consiste em um produto autógeno onde é possível concentrar fatores de crescimento que conferem ao produto uma capacidade para apressar eventos cicatriciais tais como a mitogênese, angiogênese e quimiotaxia (SCARANTO, 2002).

O PRP é considerado um produto inovador e vantajoso que tem apresentado significativos resultados nos diversos ramos da medicina, especialmente no que tange à regeneração tecidual (COSTA e SANTOS, 2014), entretanto ainda necessita ser mais estudado e avaliado para que o seu uso possa ser aplicado rotineiramente na clínica (SCARANTO, 2002).

Resultados obtidos em estudo evidenciaram que a utilização do PRP na forma de gel em cirurgia reconstrutiva é capaz de estimular a angiogênese na ferida favorecendo o processo de cicatrização e que o produto é capaz de reduzir a ocorrência de necrose na extremidade de flapes, além de favorecer a fase de reparação e integração do retalho no leito receptor (PAZZINI, 2014). Estudos também têm apontado o PRP como importante para a reparação óssea, na formação de cartilagem e na reparação de tecidos musculares e esqueléticos (LIEBERMAN et al., 2002).

Segundo uma pesquisa realizada para verificar as verdades e controvérsias que existem acerca do tema PRP, Santos (2009) relatou que existem opiniões diferentes acerca do tema, partindo do princípio que os estudos analisados não seguiram a mesma linha de pesquisa, ou seja, cada pesquisador adotou um método peculiar, considerando diversos fatores, tais como a característica biológica e orgânica de cada paciente, técnica de obtenção e aplicação do PRP obtendo, portanto, resultados inespecíficos.

Muitos autores em seus trabalhos com PRP usaram o mesmo na forma líquida sem adicionar um fator de ativação, porém, acredita-se que existe uma necessidade nesse sentido, pois ao ativar o PRP ele libera fatores de crescimento, que exercem uma função reparadora no processo de cicatrização. Segundo Zazim (2012), é necessário investigar a capacidade de ativação do PRP por substâncias farmacológicas denominadas fatores ativadores, e assim verificar a necessidade ou não dessa ativação para uso terapêutico.

Alguns fatores de ativação descritos na literatura são a tromboplastina, trombina autógena e trombina bovina (SILVA, 2006; VANAT et al., 2012; MARQUES et al., 2014).

A tromboplastina é obtida por meio de kits industriais prontos para uso na forma líquida ou liofilizada (que requer sua diluição em água destilada). Alguns autores como Rossi Jr. (1999), Fontana et al. (2004) e Aleixo et al. (2011) usaram esse fator ativador em seus estudos com gel de plaquetas.

Para obtenção da trombina autógena e consequente gelificação do PRP, deve ser usada alguma substância como o cloreto de cálcio ou gluconato de cálcio, pois a liberação de íons de cálcio no meio, na proporção de uma parte para cada 10 de PRP, leva à formação do gel. Outros trabalhos citam ainda o uso da trombina bovina para ativação do PRP (WILSON et al., 2006).

Diante do exposto, objetivou-se com essa pesquisa realizar uma análise comparativa entre a trombina autógena e tromboplastina como fatores ativadores para o PRP, avaliando alguns aspectos como a facilidade de aquisição e custo dos mesmos na cidade do Recife (Pernambuco) e formação do gel após a ativação, assim como verificar o risco de contaminação do PRP durante a sua produção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PELE E SUA CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização de feridas envolve uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Esses fenômenos bioquímicos e fisiológicos se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (ORTONNE e CLÉVY, 1994).

Para entender de forma plena a cicatrização, se faz necessário saber sobre o tegumento, que é responsável por recobrir o corpo e apresenta como funções: proteger, regular a perda de água, impedir a invasão de microrganismos e ser uma primeira barreira do organismo contra a radiação ultravioleta. Além disso, possui papel na percepção sensorial do tato, calor, pressão e dor, e atua na produção de vitamina D e na regulação da temperatura corporal (OVALLE e AHIRNEY, 2008; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; LOWE e ANDERSON, 2015).

A pele (Figura 1) é um dos constituintes do tegumento e é considerado o maior órgão do corpo, sendo composta pela epiderme, de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, e derme, de tecido conjuntivo (ROSS e PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). O tegumento possui ainda outros anexos como pelos, unhas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e glândulas mamárias (HAM e CORMACK, 1983; ROSS e PAWLINA, 2012).

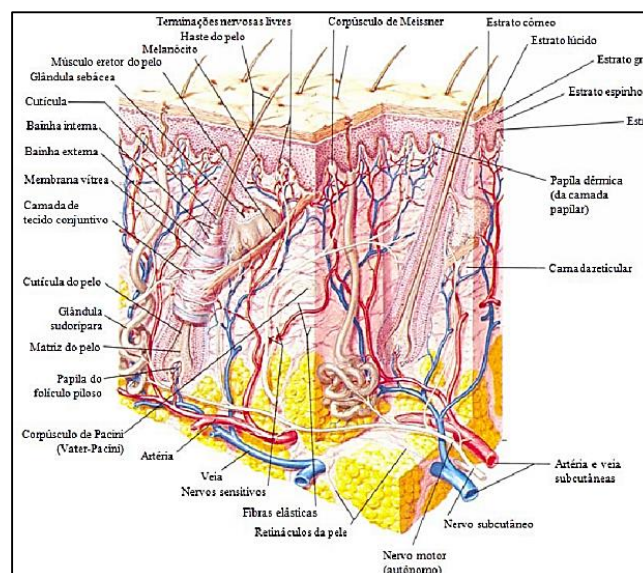


Figura 01. Esquema de um corte histológico do tegumento, demonstrando todas as suas camadas e estruturas anexas. Fonte: Adaptado de Cochard et al. (2003).

Pelo fato da palma das mãos e a planta dos pés dos animais, sofrerem um atrito maior, essas regiões possuem uma camada superficial de queratina mais espessa denominada pele glabra. A pele do restante do corpo tem uma epiderme com poucas camadas celulares e uma camada de queratina delgada e foi designada de pele fina (ou delgada) (GARTNER e HIATT, 2007; ROSS e PAWLINA, 2012).

A cicatrização ocorre depois de um dano tecidual que vai desencadear a ativação fisiológica do organismo visando o reparo desse evento danoso. Como a cicatrização vai ocorrer, dependerá de fatores locais e gerais, como: localização da lesão, tipo de pele, raça, espécie e técnica cirúrgica utilizada (MANDELBAUM et al., 2013).

O processo de cicatrização é dividido em três fases (Figura 2) que se sobrepõem de forma contínua, conhecidas como fase inflamatória, proliferativa e de remodelagem (CLARK, 1986). Na fase inflamatória, observa-se o extravasamento sanguíneo que visa preencher a área lesionada com plasma e outros elementos celulares. Destes o principal são as plaquetas, visto que a agregação plaquetária, associado à coagulação sanguínea, suscitam um tampão rico em fibrina que proporciona hemóstase, cria uma barreira contra a incursão de microrganismos e organiza a matriz base, que será necessária para a migração celular. Essa matriz servirá também, como reservatório de citocinas e fatores de crescimento (FC's) que serão liberados durante as fases seguintes desse processo cicatricial (WERNER e GROSE, 2003; EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007).

Na fase proliferativa acontece o fechamento da lesão através da reepitelização, que tem como principal evento, a movimentação das células epiteliais oriundas da margem e de apêndices epidérmicos para o centro da lesão. Nesta fase acontece a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e uma maior permeabilidade vascular (SINGER e CLARK, 1999). Na fase de remodelagem, existe uma tentativa de recuperar a estrutura tecidual anteriormente presente, através da maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo deposição de proteoglicanas e colágeno (GABBIANI et al., 1972).

2.2 PRP E OS FATORES DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto resultante do processamento laboratorial de sangue autógeno, rico em Fatores de Crescimento (FC's) que geralmente é colhido em período pré-operatório. Seu princípio tem fundamento na aceleração do processo de cicatrização através da concentração desses FC's que são os iniciadores de quase todos os eventos cicatriciais que se tem conhecimento (MARX, 1998).

Para melhor entendimento sobre o PRP, é importante entender sobre a composição desse produto. Este apresenta em sua constituição básica três componentes, que são: plasma, leucócitos e plaquetas. O plasma sanguíneo é formado pelo soro sanguíneo além de diversos fatores de coagulação

sanguínea, como o fibrinogênio e protombina. O mesmo pode apresentar volumes e osmolaridades diferentes, sendo o sódio, o cloreto e o bicarbonato seus eletrólitos mais comuns (GOLDENBERG, 1997).

Os leucócitos são células brancas que estão presentes no PRP (MARX,1999) e conferem ao mesmo uma resistência aos processos infecciosos e/ou alérgicos, de forma natural. A presença destas células melhora o prognóstico de tratamento, visto que a principal função do sistema de defesa do organismo é a de proteger contra substâncias estranhas (GOLDBERG, 1997).

As plaquetas são produzidas por fragmentação do citoplasma de uma célula pluripotencial denominada megacariócito, que se origina na medula óssea. As plaquetas possuem uma sobrevivência de quase dez dias (nove dias e 12 horas), apresentando um turnover de 35.000 por uL/dia. Apesar de terem um tamanho reduzido, exercem uma variedade de importantes funções nos processos de coagulação e cicatrização de ferida e são considerados como os componentes mais importantes na modulação cicatricial, devido a capacidade de liberação de FC's (SCARSO et al. 2001).

Os FC's são mediadores biológicos naturais que exercem diversos efeitos sobre os processos de reparação e regeneração. São polipeptídeos responsáveis pela regulação de eventos celulares como: síntese de DNA, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) foi um dos primeiros fatores a ser descoberto e é considerado o principal FC's das plaquetas, pelo fato de ser o primeiro a estar presente na ferida e a guiar a nova vascularização pós dano (SCARSO et al., 2001).

Outras fontes de PDGF são macrófagos, células endoteliais e osteócitos. Os PDGFs são liberados dos grânulos quando as plaquetas se aderem a locais onde houve o rompimento de vasos. O PDGF das plaquetas inicia o processo de reparo e o presente nos macrófagos continua a cicatrização da ferida (ANITUA, 1999; LYNCH, 1999).

Os fatores de crescimento de transformação (TGF) constituem uma grande família de mediadores locais, que regulam a proliferação e as funções da maioria das células dos vertebrados, sendo os mais comuns no PRP o fator de crescimento de transformação-beta TGF- β 1 e TGF- β 2, que tem relação com a cicatrização do tecido conjuntivo e a regeneração óssea. A estrutura do β 1 é encontrada com abundância nas plaquetas, linfócitos e neutrófilos. O tipo β 2 é encontrado nos extratos ósseos, plaquetas e neutrófilos. As funções mais importantes do TGF- β 1 e β 2 parecem ser a quimiotaxia e a mitogênese (SCARSO, 2001).

Desta forma podemos considerar que as bases biológicas da cicatrização estão relacionadas com os seguintes FC's:

- PDGF: é uma glicoproteína sintetizada e secretada por plaquetas, macrófagos e células endoteliais, que tem atuação imediata assim que se liga aos receptores das células. É encontrado no início da

reparação tecidual e atua na ferida promovendo mitose celular e levando, conseqüentemente, a um aumento do número de células. Promove a angiogênese, com o desenvolvimento de novos capilares, estimula as funções dos fibroblastos e osteoblastos e contribui para a diferenciação celular e aceleração de FC's de outras células, como os macrófagos. Promove a revascularização, o debridamento da ferida, a síntese de colágeno e a regeneração óssea (CARLSON, 2000).

- TGF- β (fator de crescimento transformador beta): é liberado pela degranulação plaquetária ou secretado pelos macrófagos, produzindo efeito nas células adjacentes, incluindo os fibroblastos, as stem cells e os pré-osteoblastos. As suas funções são a quimiotaxia, a mitogênese das células precursoras dos osteoblastos, a capacidade de estimular a deposição de matriz colágena e a formação óssea. Os TGF- β inibem a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea (CARLSON, 2000).
- VEGF (fator de crescimento de células endoteliais): está vinculado ao sistema vascular-endotelial e atua na permeabilidade vascular aumentando a formação de novos vasos sanguíneos, e conseqüentemente, incrementando o aporte sanguíneo necessário para o processo de reparação tecidual. O mesmo atrai os fibroblastos para a produção de tecido conjuntivo e participa na cascata de transformação do fibrinogênio em fibrina, cuja malha serve de base e suporta o crescimento de células endoteliais e fibroblastos e na formação de um novo sistema microcirculatório local (DVORAK, et al., 1988; IRUELA-ARISPE e DVORAK, 1997).
- IGF (fator de crescimento semelhante a insulina): produz aumento da população de osteoblastos, acelerando a deposição óssea. Atua também nas células precursoras dos osteoblastos e nos osteoblastos do endósteo, atuando na fase I de reparação dos enxertos ósseos (CARLSON, 2000).

Os primeiros estudos sobre o PRP e os Fatores de Crescimento Plaquetários (FCPs) foram datados nas décadas de 1970 e 1980, quando o produto foi amplamente aplicado nos processos de cicatrização de úlceras de compressão, de grandes áreas de descolamento de pele (CONVERSE et al., 1969; PIERCE et al., 1991; GREEN e KLINK, 1998) reparação e hemostasia de tecidos, além de ser elemento importante nas osteossínteses e na recomposição de enxertos ósseos utilizados em traumatologia e odontologia (HAYNESWORTH et al., 2002; TISCHLER, 2002; JENSEN et al., 2005; RAGHOEBAR et al., 2005).

2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PRP

O PRP é obtido por meio da coleta de sangue autógeno, que passa por um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial, para conseguir separar as plaquetas (RAVEL, 1997; MARX, 1999).

O PRP pode ser obtido por três técnicas: do tubo (manual), centrifugação (semiautomática) e por aférese (automática). Nestes procedimentos os custos variam, bem como a facilidade de preparação, o volume de sangue necessário e a concentração de plaquetária (PRADES et al., 2006).

Segundo Vendruscolo et al., (2012), na técnica do tubo (ou manual) os custos são mínimos, o volume utilizado é pequeno e o PRP é obtido com pequena concentração de plaquetas. Na técnica de centrifugação (ou semiautomática) os custos são baixos, o volume necessário é pequeno e tem fácil obtenção, conseguindo uma maior concentração de plaquetas, entretanto é necessária a aquisição de uma centrífuga (o que torna mais dispendioso). O último método é oneroso, pois são necessários equipamentos e “kits” específicos, e necessita de um maior volume de sangue, porém se obtém altas concentrações plaquetárias e maior volume de PRP.

Há ainda um método desenvolvido pela empresa VetCell, que é semelhante ao automático, no qual o sangue é coletado em uma bolsa de sangue e passa por um dispositivo que captura as plaquetas. Depois o filtro é lavado e nesse momento as plaquetas são recuperadas na solução, sendo um método de fácil realização, porém com custo elevado (VENDRUSCOLO et al., 2012).

Em qualquer que seja o método, é usado como anticoagulante, o citrato de sódio, que capta os íons de cálcio do sangue e os neutraliza formando um composto denominado quelato que impede a formação do coágulo. Além disso, o citrato de sódio não altera os receptores de membrana das plaquetas e consequentemente, o processo de quelação pode ser revertido através da adição do cloreto de cálcio para gelificação de plaquetas (ANITUA, 2000).

O PRP pode ser obtido por meio de uma centrifugação (PAGLIOSA e ALVES, 2007) ou por meio de duas centrifugações (BARBOSA et al., 2008; MAIA, 2008). A técnica para obtenção do PRP na medicina veterinária é baseada na técnica utilizada para a espécie humana. O PRP pode ser obtido por meio da coleta do sangue total em tubos ou bolsas de sangue contendo o anticoagulante apropriado, após a centrifugação e ativação das plaquetas (CARMONA et al., 2007; SCHNABEL et al., 2007; ARGUELES et al., 2008; BARBOSA et al., 2008).

Em estudo que avaliou diferentes velocidades de centrifugação (1.300, 1.600 e 3.200 rpm) do sangue total de cães para a obtenção do PRP, Ferraz et al. (2006), constataram que a velocidade de centrifugação mais adequada após a primeira centrifugação de 800 rpm por 10 minutos é de 1.600 rpm pelo mesmo tempo. Esses autores obtiveram concentrações médias de 550.000 plaquetas/ μL^{-1} e ressaltam que as amostras submetidas a 3.200 rpm apresentaram alto grau de lise plaquetária, o que pode resultar em falha da técnica devido à incapacidade desses fragmentos liberarem os FC's.

Autores recomendam que o PRP deve ser preparado com concentrações de plaquetas de três a cinco vezes maiores que os níveis fisiológicos (GONSHOR, 2002; KEVY e JACOBSON, 2004), os quais podem variar de acordo com a espécie: bovinos e ovinos: 800.000 a 1100.000 plaquetas μL^{-1} ;

gatos: 300.000 a 800.000 plaquetas μL^{-1} , caprinos: 300.000 a 600.000 plaquetas μL^{-1} ; cães: 200.000 a 500.000 plaquetas μL^{-1} e eqüinos: de 100.000 a 350.000 plaquetas μL^{-1} (FELDMAN et al., 2000). Em uma pesquisa usando uma força de centrifugação de 300 g por 10 minutos na 1ª centrifugação e de 640 g por 10 minutos na 2ª centrifugação, foi obtido as maiores concentrações plaquetárias, superiores em 4,5 vezes (VENDRAMIN, 2006).

O que dificulta a obtenção e aplicação do PRP é a falta de padronização para o seu preparo, visto que vários autores citam diferentes metodologias em seus trabalhos (FERRAZ et al., 2006; MISHRA e PAVELKO, 2006; ANDRADE et al., 2008; KAJIKAWA et al., 2008). Essas diferenças consistem em: material de coleta (tubos ou bolsas de sangue), número de centrifugações realizadas, velocidade de centrifugação, bem como a outras variáveis envolvidas na obtenção do PRP.

Segundo Klein et al. (2011), o baixo tempo de centrifugação não é capaz de produzir um concentrado plaquetário onde se pode estabelecer correlação do aumento no número de plaquetas a partir do número de plaquetas basal. Porém, quando utilizado um tempo mais longo, existe correlação positiva entre a concentração de plaquetas no PRP a partir do número de plaquetas basal.

2.4 FATORES DE ATIVAÇÃO DO PRP

Posteriormente, a obtenção do PRP, usam-se fatores de ativação para que ocorra a liberação do FC's e o produto nesse momento adquire uma consistência de gel. A literatura descreve o uso de tromboplastina, trombina autógena (que é obtida por adicionar cloreto de cálcio ou gluconato de cálcio) e trombina bovina. Alguns ainda citam o uso do colágeno (SILVA, 2006; VANAT et al., 2012; MARQUES, et al., 2014).

Segundo Coloma et al. (2011) o PRP, uma vez separado, pode ser coagulado mediante a ação de trombina bovina, cloreto de cálcio ou colágeno tipo I. Scaranto (2002) destaca o uso de cloreto de cálcio e a trombina bovina, entretanto o autor faz uma ressalva de que o uso de trombina bovina tem sido associado com o desenvolvimento dos fatores de coagulação V e XI, resultando na ativação da trombina, com o risco de desencadear coagulopatias.

Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfológicamente e desenvolvem pseudópodos, os quais promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a degranulação dos grânulos plaquetários. Durante a degranulação, as plaquetas liberam no local da lesão os FC's, contidos nos alfa-grânulos, e ainda outras substâncias como a serotonina, a histamina, a bradicinina e a dopamina (EVERTS et al., 2006).

2.5 MODALIDADES TERAPÊUTICAS PARA APLICAÇÃO DO PRP

Diversas são as modalidades terapêuticas do PRP, como o uso na reparação de tecidos danificados, na diminuição da hemorragia pós-operatória, na cicatrização dos tecidos moles com menor padrão inflamatório e na estabilidade inicial do tecido enxertado, devido a suas propriedades adesivas, provando ser uma alternativa terapêutica eficaz (PARDO et al., 2012).

No trabalho de Vendramin et al. (2010) foi realizado um estudo da utilização do PRP nas enxertias cutâneas em feridas crônicas, onde houve integração dos enxertos no lado que recebeu o PRP, demonstrando que a aplicação do produto melhorou a evolução dos enxertos de pele e diminuiu a incidência de perda total dos mesmos.

Camargo (2012) ao avaliar o efeito do PRP na redução das equimoses e edema após rinoplastias e sua participação no processo de estabilização das estruturas ósseas mobilizadas durante a cirurgia, concluiu que o mesmo foi um agente redutor dos sinais decorrentes do procedimento, com manifestações brandas do edema e das equimoses, permitindo um menor tempo de recuperação até o completo desaparecimento destas. A estabilidade óssea em curto prazo, verificada no estudo, abriu perspectivas para o menor surgimento de deformidades após a cirurgia estética do nariz com a utilização do PRP.

Guerreiro et al. (2014) em seu trabalho sobre o uso de PRP em artroplastia total do joelho fizeram uma aplicação intrarticular do concentrado plaquetário em 20 pacientes com indicação de artroplastia total do joelho e concluíram que o PRP não se mostrou efetivo para reduzir sangramento ou melhorar a função do joelho em comparação com o controle, entretanto houve vantagem na escala verbal de dor pós-operatória.

Em seu estudo sobre a influência da ativação do PRP no tratamento de tendinite em equinos, Rajão (2012) chegou à conclusão de que o protocolo de preparo do concentrado de plaquetas inativado foi mais rápido, estando sujeito a menos erros de técnica e sendo menos dispendioso tornando, portanto, esta técnica mais viável de ser realizada a campo.

Os resultados obtidos nas condições do estudo realizado por Silveira (2009), sobre a utilização do PRP ou (plasma pobre em plaquetas) PPP, associado ou não à enxerto ósseo cortical alógeno em ovinos, permitiram concluir que o osso cortical alógeno triturado, utilizado de forma isolada, promoveu o preenchimento completo de defeito ósseo de ossos longos e formação óssea satisfatória, enquanto que a utilização de osso cortical associado ao PRP e ao PPP diminuiu a quantidade de fragmentos ósseos necessário para o preenchimento da falha e permitiu melhor acomodação do implante no defeito. Ao exame radiográfico, a associação do PRP e do PPP nos defeitos ósseos, demonstraram precocidade de reparação óssea e formação de calo ósseo satisfatório, porém no final do período de observação, o

comportamento dos grupos osso cortical e osso cortical associado ao PRP e PPP, em relação ao preenchimento ósseo, foram semelhantes.

Em um estudo com microimplantes capilares em humanos (MICs) houve um rendimento considerável superior de 3,6% no lado onde se utilizaram os MICs embebidos com PRP e seus FC's. Houve eficácia e melhor integração, resultando num maior número de folículos e em uma maior densidade capilar, o que trouxe um resultado positivo na cirurgia da calvície masculina (UEBEL, 2006).

O PRP também tem demonstrado ser eficaz no tratamento das epicondiloses e tendinopatias rotulianas em humanos. Nas lesões musculares, os poucos estudos encontrados parecem confirmar um efeito positivo desta terapia (FERRÃO e GUTIERRES, 2013).

Na pesquisa de Bauer et al. (2009) a avaliação do efeito do PRP no processo de reparação tecidual em feridas dérmicas padronizadas em ratos, através das análises macroscópica, histomorfológica e histomorfométrica permitiu afirmar que o mesmo não apresentou efeitos superiores ao uso do soro fisiológico no processo de reparação das feridas durante os períodos de observação e não apresentou efeitos tóxicos ou deletérios.

De acordo com o artigo de Silva (2010), a utilização do PRP, devido à sua origem autóloga, não tem risco de rejeição, e associado à fácil preparação, abriu uma nova porta para o tratamento das lesões desportivas. No entanto, a sua utilização na reconstrução do ligamento cruzado anterior, nas lesões da cartilagem, lesões meniscais e osteoartrose ainda está no início. Apesar da grande expectativa e de parecer muito promissor, não existe evidência clínica que suporte a sua utilização, após vários estudos feitos nesta área. No entanto, alguns estudos laboratoriais em modelos animais revelam resultados animadores. A utilização futura e bem fundamentada vai depender de resultados de estudos prospectivos, bem desenhados, que permitam avaliar corretamente a eficácia terapêutica do PRP.

Segundo Ferrão e Gutierrez (2013), é possível que os diferentes resultados observados nos diversos estudos pesquisados, se devam à não uniformização dos protocolos de preparação e aplicação do PRP, e assim os mesmos relatam que novos estudos são necessários para padronizar estes parâmetros de modo a maximizar o efeito terapêutico do produto.

Diante do contexto, estudos que possam elucidar quais fatores de ativação contribuem para melhor aplicação do PRP são relevantes uma vez que existem diversos trabalhos citando diferentes protocolos de produção de PRP.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEIXO, G.A.S; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N.; MESQUITA, E.P.; OLIVEIRA, F.F.; L.M.V. ZUBIETA, T.L.C. ALMEIDA, A.L.N. GUIMARÃES, F.C. MAIA, T.F.L. ZACARIAS, S.M.L.G. SANTOS, C.P.S. LIMA. Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães [Comparison between two protocols to obtain platelet-rich plasma in dogs] **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.63, n.3, p.567-573, 2011.

ANDRADE, M.G.S., BRANDÃO, C.J.F., SÁ, C.N., BITTENCOURT, T.C., SADIGURSKY, M. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St Louis, v.105, n.1, p.5-12, 2008.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int J. Oral Maxillofac Implants**, v.14, p.529-35,1999.

ANITUA, E; ORTIZ, I. A. Un nuevo enfoque en la regeneracion osea: plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). **Vitoria, Spain. Ed. Puesta Al Dia Publicaciones** ISBN: 9788487673108, v.6, n.3 (JUN), p.305-315, 2000.

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

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

BAUER, J.A.; CORREA, L.; LIMA, F.L.M.; LIMA, L.A.P.A.; PUSTIGLIONI, F.E. Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. **R. Periodontia**. v.19, n.03, Setembro, 2009.

CAMARGO, V.J. Utilização Do Plasma Rico Em Plaquetas Autólogo Na Rinoplastia Primária. **Arquivos Catarinenses de Medicina** - Volume 41, Suplemento 01, 2012.

CARLSON, E.R. Bone grafting the jaws in the 21 st century: the use of Platelet-Rich Plasma and bone morphogenetic protein. **Alpha Omegan**; v.93, 3ed, p.26-9, 2000.

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

CLARK, R. A. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2ed. New York: Plenum Press, 1996.

COCHARD, L. R. **Atlas de embriologia humana de Netter**. Porto Alegre: Artmed, p.27, 2003.

COLOMA, E.S.; ROLON, A. U.; KHOURY, M. A.; La actualidad del plasma rico en plaquetas em traumatología del deporte. **Revista De La Asociacion Argentina De Traumatologia Del Deporte**, pg. 30-43, 2011.

CONVERSE, J.M.; UHLSCHMID, G.K.; BALLANTYNE, D.L.JR. "Plasmatic circulation" in skin grafts. The phase of serum imbinition. **Plastic Reonstrutive Surgery**. v.43, p.495-9, 1969.

COSTA, P. A.; SANTOS, P. **Plasma rico em plaquetas: uma revisão sobre seu uso terapêutico**. Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP) Curso de Farmácia Caçador, SC., RIES, ISSN 2238-832X, Caçador, v.3, n.Especial, p.68-70, 2014.

DVORAK, J., MCGUIRE, P.E., E CASSIDY, B. Apparent sources of the A genomes of wheat inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. **Genome**, v.30, p. 680-689, 1988.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. **Gene therapy and wound healing**. Clínica Dermatologica, cap.25 p.79-92, 2007.

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

FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p1344, 2000.

FERRÃO, A.; GUTIERRES, M. Aplicação de fatores de crescimento no tratamento de lesões musculotendinosas Solução ou ilusão? Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Portugal. **Serviço de Ortopedia e Traumatologia**. Centro Hospitalar de São João. Porto. Portugal Rev Port Ortop Traum v.21, n.3, p.259-270, 2013.

FERRAZ, V.C.M. et al. Concentração do plasma rico em plaquetas de cães obtida por três velocidades de centrifugação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, supl.2, p.18, 2006.

FONTANA, L., MEYER, T.E., KLEIN, S, HOLLOSZY, J.O. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans, **Pub Med**. n.101, p.6659–6663, 2004.

GABBIANI, G.; HIRSCHL, B. J.; RYAN, G. B.; STATKOV, P. R; MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. **J. Exp Med**. 135:p.719-34, 1972.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 333-335, 2007.

GOLDENBERG, S. **Descomplicando a Fisiologia**. 2ed., Artes Médicas, Porto Alegre, p.61-5,1997.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: background and process. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Swampscott, v.22, n.6, p.547-557, 2002.

GREEN, D.M.; KLINK, B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. **Plast Reconstructive Surgery** v.101, p.1161-2, 1998.

GUERREIRO J.P.F.; DANIELI, M. V.; QUEIROZA, O.A.; DEFFUNE, E.; FERREIRA, R.R. Plasma rico em Plaquetas (PRP) aplicado na artroplastia total do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 2014.

HAM A.W., E CORMACK, D.H. Os tecidos hematopoiéticos: o tecido mielóide. **In: Ibid. (Eds), Histologia**. 8ª ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 279-304, 1983

HAYNESWORTH, S.E.; KADIYALA, S., LIANG, L. Chemotactic and mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet rich plasma suggests a mechanism for enhancement of bone

repair. In: Proceedings of the 48th. **Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society**. Feb 9-3; Dallas, TX; 2002.

IRION, G. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

IRUELA-ARISPE, M.L. e DVORAK, H.F. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. **Throm. Haemost**, v. 78, p.672-677, 1997.

JENSEN, T.B.; RAHBK, O.; OVERGAARD, S.; SOBALLE, K. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented Implants. **Int Orthop**. v.29, p.67-72, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 354-359, 2013.

KAJIKAWA, Y. et al. Platelet rich plasma initial mobilization circulation derived tendon healing. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v.215, n.3, p.837-845, 2008.

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

KLEINI, 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 Biociência**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 509-513, out./dez. 2011.

LIEBERMAN, J.R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T.A. The role of growth factors in the repair bone. **Journal of Bone & Joint Surgery**, v.84, n.6, p.1032-1042, 2002.

LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. **Stevens & Lowe's Human Histology**. 4. ed. p. 49, 363, Philadelphia: Elsevier, Mosby, 2015.

LYNCH, S. E. **Introduction. Tissue Engineering: Applications in Maxilofacial Surgery and Periodontics**. 1ed. Illinois, Quintessence Books, cap.1, 1999.

MAIA L. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. 2008.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. **Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares Parte I.** Anais brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v.78, n.4, p.393-410, jul./ago., 2003.

MARQUES, F.P.; INGHAM, S.J.M.; FORGAS, A.; FRANCIOZI, C.E.S.; SASAKI, P.H.; ABDALLA, R.J. Um método manual de obtenção do plasma rico em plaquetas. **Revist. Acta Ortop Bras.** [online]; v.22, n.2, p.75-7, 2014.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg., Oral Med. Oral Pathol**, v.85, p.638-46,1998.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R. The potential role of growth and differentiation factors in periodontol. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol** v.67, p.545-553, 1999.

MÉLEGA, J. M. **Cirurgia plástica – fundamentos e arte – princípios gerais.** Rio de Janeiro, Editora Medsi, 1 Edição, Capítulo I, pg. 3-8, 2002.

MESTRE, T.; RODRIGUES, A.; CARDOSO, J. Cicatrização de feridas crônicas **Revista SPDV**, v. 70, n. 4, 2012.

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. **American Journal of Sports Medicine**, Chicago, v.34, n.11, p.1774-1778, 2006.

ORTONNE, J. P.; CLÉVY, J. P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. **Vet. Prat.** Paris, v. 44, n. 13, p. 1733-1734, 1994.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, p. 244, 2008.

PAGLIOSA, G.M.; ALVES, G.E.S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.

PARDO, M.; SACCO, S. R.; SURIAN, C. R. S.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Principais Usos Do Plasma Rico Em Plaquetas Na Medicina Veterinária. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** – ISSN: 1679-7353 Ano IX – Número 18 – Periódicos Semestral, Janeiro de 2012.

PAZZINI, J. M. Plasma rico em plaquetas empregado na cirurgia reconstrutiva em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*): Avaliação da exequibilidade da técnica, achados macroscópicos e histopatológicos. **Jaboticabal**, 2014.

PIERCE, G.F.; MUSTOE, T.A.; ALTROCK, B.W.; DEUEL, T.F.; THOMASON, A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. **J. Cell Biochem.** v.45, p.319-26, 1991.

PRADES M.; ABELLANET I.; CARMONA J.U.; ARGÜELLES D.; MASRI M. Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair. In: Proceedings of the 15th **Annual Meeting European College of Veterinary Surgeons**, Seville: ECVS, p.211-216, 2006.

RAGHOEBAR. G. M.; SCHORTINGHUIS, J.; LIEM, R. S.; RUBEN, J L.; VAN DER WAL, J. E.; VISSINK, A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? **Clin Oral Implants Res.** ;16:349-56. 2005.

RAJÃO, M. D. Influência da ativação do plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos. Brasília: **Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária**, Universidade de Brasília, Dissertação de Mestrado, p.65, 2012.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico Aplicações clínicas dos dados laboratoriais.** 6 ed. Ed. Guanabara Koogan, p.109-29,1997.

ROSSI JR., R.; LEMOS, J. J.; PISPICO, R. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – proposta de um protocolo de obtenção simplificado. 1999. **Disponível em:** <<http://www.Dentalnet.com.br>>. Acesso em: 02/02/2016.

SCARANTO, M.K.; Plasma rico em plaquetas. Universidade Federal De Santa Catarina Centro De Ciências Da Saúde Departamento De Estomatologia **Curso De Especialização Em Periodontia**. Florianópolis, 2002.

SCARSO FILHO, J.; BARRETO, M. A.; MENDONÇA, R. G.; DINATO, J. C. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO, J. C.; POLIDO, W. D. Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese. p.315-342. São Paulo: **Artes Médicas**, 2001.

SCHEFFER, J. P.; ATALLAH, F. A.; GOMES, C.; ESTUPÑAN, O. F. T.; SILVA, S. J. Q.; SILVA, T. I. R.; VALE, D. F.; OLIVEIRA, A. L. A. Cirurgia Reconstitutiva No Tratamento De Feridas Traumáticas Em Pequenos Animais. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.35(Supl. 1), p.70-78, dezembro, 2013.

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

SILVA, A. Fatores de crescimento derivados das plaquetas. **Revista de Medicina Desportiva in forma**, 2010.

SILVA, S.B. Efeitos do plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita em fraturas induzidas experimentalmente em rádio de cães: avaliação radiográfica simples e por meio da densitometria óptica radiográfica. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.

SILVEIRA, P.R. Utilização De Plasma Rico Ou Pobre Em Plaquetas, Associado Ou Não À Enxerto Ósseo Cortical Alógeno, Na Reparação Cirúrgica De Falha Ulnar Em Ovinos. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” **Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias** Jaboticabal. São Paulo, 2009.

SINGER A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**.v.341, p.738-46, 1999.

SLATTER, D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. 3ª ed. v.1. São Paulo. Manole: 2007

TISCHLER, M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. **NY State Dent J.** v.68, p.22-4, 2002.

UEBEL, C. O. Ação do plasma rico em plaquetas e seus fatores de crescimento na cirurgia dos microimplantes capilares. Orient. Jefferson Braga da Silva. **Porto Alegre: PUCRS**, 2006.

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

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R.; Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica;** v.25, n.4, p.589-94, 2010.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C M.; PEREIRA, M.S.; FRANCO, T. R. Plasma Rico Em Plaquetas E Fatores De Crescimento: Técnica De Preparo E Utilização Em Cirurgia Plástica. Trabalho realizado no **Serviço de Cirurgia Plástica e no Serviço de Hematologia do HUCFF – UFRJ**, vinculado ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia, 2006.

VENDRUSCOLO C.P.; WATANABE M.J.; MAIA, L.; CARVALHO, A.M.; ALVES, A.L.G. Plasma rico em plaquetas: Uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. **Veterinária e Zootecnia**, março; v.19, n.1, p.033-043, 2012.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiology Revist**, v.83, p.835-70, 2003.

WHITE, M. M.; JENNINGS, L. K. **Basic introduction to platelets.** In: Platelet protocols.San Diego,CA. Academic Press, c. 1. p. 3-26, 1996.

WILSON, E.M.K.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Estimulação da Cicatrização Óssea pelo Plasma Autôgeno Rico em Plaquetas. Estudo Experimental em Coelhos. **Acta Ortop Bras** v.14, n.4, 2006.

ZANDIM, B.M. et al. Ativação plaquetária: ultraestrutura e morfometria no plasma rico em plaquetas de equinos. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. vol.32, n.1, pp. 83-92. ISSN 0100-736X, 2012.

4. Artigos

COMPARAÇÃO ENTRE O GLICONATO DE CÁLCIO A 10% E A TROMBOPLASTINA COMO FATORES AGONISTAS PARA ATIVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM CÃES

Formatado segundo as normas para publicação da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (*Brazilian Journal of Medicine*)

Comparação entre o gliconato de cálcio a 10% e a tromboplastina como fatores agonistas para ativação do plasma rico em plaquetas em cães

Comparison of de calcium gluconate the 10% and thromboplastin as agonists factors to rich plasma activation in platelets in dogs

ABSTRACT: The Platelet Rich Plasma (PRP), the product obtained at the end of a process of centrifugation of whole blood has been studied in tissue repair due to the fact that platelets contain in its interior growth factors (FC's) that stimulate healing process. For release of such factors into the tissue which is applied PRP, platelets need to be activated, and this occurs by the addition of substances called activation factors. The objective of this research conduct a comparative analysis of two activators factors: calcium gluconate 10% (autologous thrombin) and thromboplastin with respect to ease of acquisition, cost and formation of gel after activation. For the experiment were 20 healthy dogs which blood samples were collected for the production of platelet gel. Blood samples were equally divided into three groups: 20 samples in group A (PRP without activating factor - liquid) 20 samples in group B (platelet gel activated with calcium gluconate 10%) and 20 samples of group C (gel platelet activated with thromboplastin). In the group of samples The PRP had a slightly red color and it remained in liquid form throughout the observation time. In group B, the sample became turbid, as the gel was formed. After addition of 10% calcium gluconate, within about 30 seconds to two minutes was formed PRP gel, however 20% of the 20 samples, part formed the gel and another part remained liquid and up to 40% samples remained in liquid form, even being added twice the proportion of activator factor. In PRP samples of group C who received thromboplastin, after the formation of the gel product acquired a translucent color and firm consistency, being formed at least the gel time of 30 seconds and a maximum of one minute in 100% of the samples. It follows that the products tested, the best platelet activating factor for formation of the PRP gel is thromboplastin to be the most stable in the formation of platelet gel in all the samples

KEY WORDS: Reconstructive surgery, concentrate rich in platelets, growth factors.

RESUMO: O Plasma Rico em Plaquetas (PRP), produto obtido ao final de um processo de centrifugação do sangue total, tem sido estudado no processo de reparação tecidual devido ao fato das plaquetas conterem em seu interior fatores de crescimento (FC's) que estimulam o processo de cicatrização. Para liberação de tais fatores no tecido onde o PRP é aplicado, as plaquetas precisam ser ativadas, e isso ocorre através da adição de substâncias denominadas fatores de ativação. Objetivou-se com essa pesquisa realizar uma análise comparativa de dois fatores ativadores: gliconato de cálcio a 10% (trombina autógena) e tromboplastina, com relação à facilidade de aquisição, custo e formação do gel após a ativação. Para realização do experimento foram selecionados 20 cães saudáveis dos quais foram coletadas amostras de sangue periférico para produção do gel de plaquetas. As amostras de sangue foram divididas igualmente em três grupos: 20 amostras no grupo A (PRP sem fator ativador - líquido), 20 amostras no grupo B (gel de plaquetas ativado com gliconato de cálcio 10%) e 20 amostras no grupo C (gel de plaquetas ativado com tromboplastina). Nas amostras do grupo A o PRP apresentou uma coloração levemente vermelha e o mesmo se manteve na forma líquida durante todo o tempo de

observação. No grupo B, as amostras se tornaram turvas, à medida que o gel era formado. Após a adição do gliconato de cálcio a 10%, em aproximadamente 30 segundos a dois minutos era formado o gel de PRP, entretanto em 20% das 20 amostras, parte dela formava o gel e outra parte permanecia líquida e ainda 40% amostras continuaram na forma líquida, mesmo sendo adicionado o dobro da proporção de fator ativador. Nas amostras de PRP do grupo C que receberam tromboplastina, após a formação do gel o produto adquiria uma coloração translúcida e consistência firme, sendo formado o gel no tempo mínimo de 30 segundos e máximo de um minuto em 100% das amostras. Conclui-se que dos produtos testados, o melhor fator de ativação plaquetária para formação do gel de PRP é a tromboplastina por ser o mais estável na formação do gel de plaquetas em todas as amostras.

PALAVRAS CHAVE: cirurgia reconstrutiva, concentrado rico em plaquetas, fatores de crescimento.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 1970, autores já descreviam o uso do concentrado de plaquetas autólogo (Whitman et al. 1997), conhecido como plasma rico em plaquetas (PRP) (Ehrenfest et al. 2009) para otimizar o processo de regeneração tecidual (Robson 1997, Marx 1998, Marx 2001, Gandhi et al., 2006). O produto também recebe outras denominações, tais como plasma enriquecido de plaquetas (PeRP), concentrado rico em plaquetas (PRC) ou gel de plaquetas autólogo (Ehrenfest et al., 2009).

A utilização do PRP em medicina se baseia no fato de que as plaquetas contêm diversos fatores de crescimento (FC's) em seus alfa-grânulos (Monteiro, 2013) que são fundamentais para a cicatrização (Cross et al., 1995, Dohan et al., 2006). Esses FC's, como o fator derivado de plaqueta (PDGF), o fator de crescimento transformante beta-1 (TGF beta-1) e o fator de crescimento endotelial (VEGF) são moléculas proteicas que em contato com seus receptores nucleares, estimulam a angiogênese e a replicação dos tecidos, induzindo a cicatrização e o crescimento de novas estruturas orgânicas (Stenn et al. 1996, Mcelwee & Hoffmann 2000). Desse modo, a concentração desses fatores em tecidos lesados poderia ser benéfica para atribuir mais agilidade aos processos de regeneração (Monteiro, 2013).

Para isso, é preciso confeccionar o PRP, sendo este obtido por meio da centrifugação do sangue basal, permitindo dessa maneira que as plaquetas sejam concentradas em um pequeno volume de plasma (Anitua 2001, Lacci & Dardik 2010). Através desse processo, é possível obter uma quantidade de plaquetas de quatro a seis vezes acima dos níveis fisiológicos, ou seja, aproximadamente um milhão de plaquetas por microlitro de sangue (Choukroun 2006, Wrotniak et al., 2007). Segundo Marx (2001), para ser considerado PRP, o produto deve apresentar uma concentração de no mínimo 1.000.000 de plaquetas/ μ L em um volume de 5 mL de plasma.

Assim, por meio da coleta de sangue autógeno, que passa por um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial, consegue-se concentrar as plaquetas obtendo o PRP (Ravel 1997, Marx 1999).

Esse processo de obtenção de PRP pode ser classificado em dois tipos: convencional e simplificado. O primeiro é conseguido em equipamentos de centrifugação de grande porte, enquanto

que o segundo é executado em centrífugas de bancada para uso ambulatorial. Após a centrifugação, o PRP fica situado no meio do tubo, enquanto que o plasma pobre em plaquetas (PPP) permanece no topo do tubo e as hemácias ficam localizadas no fundo do tubo (Scaranto 2002).

Porém mesmo após a obtenção do PRP é necessária ativá-lo e isso se faz pela adição de fatores ativadores, como tromboplastina, trombina bovina, colágeno, cloreto de cálcio ou gliconato de cálcio, sendo estes dois últimos responsáveis pela obtenção da trombina autógena (Coloma et al. 2011, Marques et al. 2014). Isto conduz a ativação das plaquetas, o que resulta na liberação dos FC's. Scaranto (2002) destaca o uso de cloreto de cálcio e a trombina bovina, entretanto o autor faz uma ressalva de que o uso de trombina bovina tem sido associado com o desenvolvimento dos fatores de coagulação V e XI, resultando na ativação da trombina, com o risco de desencadear coagulopatias.

Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfológicamente e desenvolvem pseudópodos, os quais promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a degranulação dos grânulos plaquetários. Durante a degranulação, as plaquetas liberam no local da lesão os FC's (contidos nos alfa-grânulos), e ainda outras substâncias como a serotonina, histamina, bradicinina e dopamina (Everts et al., 2006).

Diante do exposto, objetivou-se com essa pesquisa realizar uma análise comparativa entre dois fatores ativadores (trombina autógena e tromboplastina), com relação a facilidade de aquisição, custo, formação do gel após a ativação e avaliação macroscópica.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e após a liberação da licença nº 23082.005174/2015, o projeto foi iniciado.

Para realização da pesquisa, foram coletadas amostras de sangue periféricos de 20 animais da espécie canina, machos e fêmeas, das raças Rotweiler, Greyhound e Golden Retriever provenientes de canis particulares no Estado de Pernambuco. Os animais estavam saudáveis e sem alterações no exame hematológico e com dosagens de ureia, creatinina, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie.

De cada animal foram coletados quatro frascos de sangue de 3,5 mL contendo citrato de sódio (para produção do PRP), um tubo de plástico de 2 mL com EDTA e um frasco de 2 mL sem anticoagulante (para realização da bioquímica), totalizando seis frascos de sangue por paciente. Do frasco com EDTA, foram efetuados o hemograma e a contagem de plaquetas no sangue basal, para avaliar o estado de saúde do paciente e determinar a plaquetometria, que serviu de referência para o valor encontrado no PRP.

O PRP foi fabricado de acordo com o protocolo desenvolvido por Aleixo & Coelho (2011), onde em um primeiro momento os quatro frascos foram centrifugados a 1200 rotações por minutos (rpm) durante 10 minutos em centrífuga laboratorial (FANEN[®] modelo Baby[®] Centrifuge I, Mod. 206). Após a primeira centrifugação, foi pipetado todo o plasma e a camada leucoplaquetária de cada um dos frascos, com uma pipeta automática de precisão e ponteiros estéreis (1 µL, 10 µL e 100 µL), os quais foram transferidos para outros quatro frascos estéreis (sem aditivo) para a realização de uma segunda centrifugação a 1600 rpm por 10 minutos. Após esse procedimento, era descartado 80% do plasma sobrenadante, sendo o restante homogeneizado às plaquetas decantadas, obtendo-se assim, o PRP.

Após a obtenção do PRP os quatro frascos eram reunidos em um único frasco, para obtenção do volume total do PRP utilizando uma seringa estéril de 3 mL. Em seguida o PRP era dividido em volumes iguais novamente e recolocado nos quatro frascos.

Dos quatro frascos coletados com citrato de sódio como anticoagulante, o frasco 1, era destinado à plaquetometria do PRP; no frasco 2, não era adicionado nenhum fator de ativação (PRP líquido – grupo controle); no 3 era adicionado o Gliconato de Cálcio 10% e por fim no tubo 4, era colocado a tromboplastina.

Dos 20 animais da pesquisa, foram obtidas 80 amostras, sendo os grupos experimentais divididos da seguinte maneira: 20 amostras para o grupo A (PRP na forma líquida sem fator ativador - controle), 20 amostras para o grupo B (gel de plaquetas ativado com Gliconato de cálcio 10%) e 20 amostras para o grupo C (gel de plaquetas ativado com tromboplastina).

Nos frascos dos grupos B e C, os fatores de ativação foram inicialmente adicionados na proporção de 2:1 (1 mL de PRP para 0,5 mL do ativador de plaquetas).

A avaliação quantitativa de plaquetas no PRP (frasco 1) era efetuada pelo método da contagem direta na câmara de Neubauer usando o diluente de Rees-Ecker, enquanto que a avaliação morfológica das plaquetas era realizada através do exame microscópico do esfregaço sanguíneo.

O gliconato de cálcio 10% utilizado para obtenção de trombina autóloga foi comprado em loja de materiais médico-hospitalar na cidade do Recife (Pernambuco), na forma líquida contido em um frasco-ampola de plástico com 10 mL de volume.

A tromboplastina* foi adquirida da mesma maneira e na mesma cidade, sendo esta vendida na forma de kit industrial pronto para uso, onde cada kit era dividido em seis frascos de vidro contendo o produto liofilizado para ser diluído em 2 mL de água destilada.

RESULTADOS

No que diz respeito aos resultados do experimento, dos 20 animais foram obtidas 80 amostras de sangue (quatro amostras de cada paciente). Em relação à gelificação das mesmas, foi

observado que no grupo A (sem fator ativador - controle) as 20 amostras permaneceram no estado líquido. No grupo A, não foi adicionado fator de ativação, e por isso esse grupo foi considerado controle.

Das 20 amostras do grupo B (ativado com Gliconato de cálcio 10%) onde foi empregada a trombina autógena para ativação do PRP, 15% apresentaram consistência gelatinosa em um minuto; 5% obtiveram consistência gelatinosa em dois minutos sendo que parte da amostra continuava na forma líquida; 40% das amostras não formou gel; 5% formou gel em um minuto e meio; 5% obtiveram consistência gelatinosa em um minuto sendo que parte da amostra continuava na forma líquida; 5% formaram o gel em 30 segundos, permanecendo parte da amostra líquida; 5% das amostras deu origem a um gel inconsistente em 2 minutos; 5% das amostras formaram gel inconsistente após 2 minutos sendo que parte das mesmas continuava na forma líquida e 15% das amostras levaram à formação do gel em 2 minutos ao usar a proporção de 2:2 (PRP: trombina autóloga).

Das 20 amostras para o grupo C (ativado com tromboplastina), 30% das amostras formaram gel consistente em 30 segundos e 70% das amostras formaram gel consistente em 1 minuto.

Em 100% das amostras do PRP líquido (Grupo A), a coloração do concentrado de plaquetas variou de avermelhado a rósea. O mesmo se manteve na forma líquida durante todo o tempo de observação, sendo importante ressaltar que não houve a adição de nenhum fator ativador, e conseqüentemente o custo do seu processamento foi menor em relação aos grupos B e C. Nas amostras do grupo B (PRP ativado com Gliconato de cálcio 10%), a coloração se manteve transparente à medida que o gel era formado. As amostras desse grupo levaram entre 1 a 2 minutos para gelificar, sendo que em 65% das amostras a formação do gel não era completa, e uma parte do material permanecia líquido ou mesmo a amostra inteira. Nessas, mesmo sendo adicionado na sequência o dobro da proporção do fator ativador descrita na literatura, ou seja, o mesmo volume de fator ativador e PRP, algumas amostras permaneceram líquidas.

Diferentemente do que aconteceu no grupo B, naquele que se empregou a tromboplastina com fator agonista (Grupo C), 100% das amostras formaram um gel de consistência firme e coloração translúcida de 30 segundos a 1 minuto (no máximo).

No que diz respeito ao odor das amostras antes, durante e após a adição dos fatores de ativação, todas as amostras, tanto do PRP líquido (Grupo A) como de gel de PRP (Grupos B e C), permaneceram com odor *sui generis*.

Quanto aos custos, foi observado que o gliconato de cálcio 10%, usado para obtenção de trombina autóloga foi comprado em loja de materiais médico-hospitalar na cidade do Recife/PE na forma líquida contido em um frasco-ampola de plástico com 10 mL de volume ao preço R\$ 1,70. A tromboplastina foi adquirida no mesmo local, sendo esta vendida na forma de kit industrial pronto para

uso, ao custo R\$ 63,80, onde cada kit era dividido em seis frascos de vidro contendo o produto liofilizado para ser diluído em água destilada no volume indicado pelo fabricante.

Assim, o custo por amostra foi de R\$ 2,23 para a confecção do gel de PRP com tromboplastina e de R\$ 0.34 para a produção do gel de PRP com trombina autógena, ou seja, o custo de fabricação de uma amostra de PRP gelificada com tromboplastina é 6.5 vezes maior do que a produção de uma amostra de gel de PRP com trombina autógena.

No que diz respeito à formação do gel de plaquetas em cada amostra de PRP, foi possível verificar que no Grupo C (tromboplastina) 100% das amostras formaram o gel, independente do fato de ter se obtido uma concentração muito alta de plaquetas. Já nas amostras do Grupo B (Gliconato de cálcio a 10%) foi observado que nas duas amostras que mais concentraram plaquetas, em uma delas não foi formado o gel, enquanto que na outra isso ocorreu em 30 segundos, caracterizando uma não padronização do grupo.

DISCUSSÃO

Autores como Aleixo & Coelho (2010), Vendramin et al. (2010) e Zandin et al. (2012), fizeram uso do PRP ativado, assim como no presente estudo, acreditando que esta ativação seria necessária para a liberação dos FC's contidos nas plaquetas.

Uma parte das amostras (Grupo A) foi mantida na forma líquida, ou seja, sem a adição de um fator agonistas, assim como realizado por Zandin et al. (2012). Essa técnica é especialmente comum por aqueles que trabalham à campo, pois segundo tais autores, isso torna mais simples a obtenção dos FC's, porém com resultados alcançados contraditórios.

Nas amostras do grupo B (PRP ativado com trombina autógena), a coloração se manteve transparente à medida que o gel era formado. Em seu estudo com gel de plaquetas, Vendramin et al. (2006), utilizaram esse tipo de fator agonista para ativar as plaquetas do PRP.

O resultado final demonstrou que em 35% das amostras ativadas com trombina autógena no presente estudo, houve a formação do gel entre 30 segundos a dois minutos, o que não foi achado em literatura vigente sobre o tempo de gelificação. Apesar disso, autores como Obarrio et al. (2000) relatam que a formação do gel é esperada devido ao fato de que a trombina autógena, na presença do cálcio, promove a clivagem do fibrinogênio plasmático em fibrina e atua promovendo a polimerização dessa enzima, dando origem a um composto insolúvel, de consistência semelhante a de um gel, que estimula a degranulação das plaquetas. Pontual & Magini (2004) também corroboram com Obarrio et al. (2000), ao afirmar que o gluconato ativa o sistema de coagulação e as plaquetas, resultando na gelação do mesmo.

Ainda assim, em 65% das amostras a formação do gel não era completa, e uma parte do material permanecia líquida. Nessas amostras, mesmo sendo adicionado na sequência o dobro da proporção

descrita no trabalho de gliconato de cálcio, ou seja, o mesmo volume de fator ativador e de PRP, algumas continuavam na forma líquida. Ao aumentar a quantidade de fator ativador utilizado, elevou-se também o custo de produção do gel de PRP e ainda assim, não se sabe se o produto foi realmente efetivo, levando em consideração que mesmo aumentando a quantidade adicionada ao PRP, o produto não gelificou por completo.

Diferentemente do que aconteceu no grupo B, no grupo C, que empregou a tromboplastina com fator agonista, 100% das amostras formaram um gel de consistência firme em aproximadamente 30 segundos a 1 minuto (no máximo), corroborando com os resultados encontrados por Aleixo & Coelho (2011). Nesse grupo a coloração das amostras, após a formação do gel era translúcida.

Além da importância destacada por autores como Harmon et al. (2012) e Webb (2012) com relação à ativação do PRP para que ocorra a liberação dos FC's que vão atuar sobre a lesão melhorando a reparação dos tecidos, Pontual & Magini (2004) afirmam que a gelificação do PRP facilita sua aplicação em diversas cirurgias. Isso foi constatado no trabalho desenvolvido por Aleixo & Coelho (2010), onde os autores relataram que a consistência do gel de PRP facilitou a aplicação e permanência do produto por baixo de flaps de avanço em cães.

Apesar de não haverem estudos que dissertem sobre o odor do PRP, no presente trabalho, todas as amostras, tanto de PRP líquido como de gel de PRP, permaneceram com odor *sui generis*.

Quanto aos custos e a disponibilidade dos fatores de ativação utilizados na pesquisa, na Cidade de Recife/PE o gliconato de cálcio 10% é facilmente obtido em lojas do seguimento médico-hospitalar e farmácias humanas na forma de frasco ampola de plástico de 10 mL, custando R\$1,70 a unidade. Não foram encontrados trabalhos que disponibilizem informações de custo e aquisição do material citado.

A tromboplastina (kit teste para tempo de protombina) utilizada no experimento, é vendida em kits dentro de uma caixa contendo 6 frascos de vidro rosqueados, cujo o conteúdo liofilizado vem protegido por uma borracha para que não haja contato com o meio externo. Cada frasco pode ser diluído em 2 mL de água destilada (que precisa ser comprado, já que que o kit não inclui), conforme o manual de instrução.

Em Recife/PE, um kit de tromboplastina custa em média R\$ 63,80, podendo ser encontrado em lojas de produtos médico-hospitalares. Vanat et al. (2012), optaram por utilizar o Soluplastin[®], que é um kit comercial cujo o princípio é semelhante ao PT Hemostasis[®], utilizado neste experimento. Os autores supracitados alegaram que usaram tal produto ao invés de outras substâncias, pela facilidade de obtenção comercial do mesmo, quando comparado a outros fatores de ativação que são mais difíceis de encontrar no Brasil (Barbosa et al., 2008), como é o caso da trombina bovina.

Scaranto (2002), destaca o uso de cloreto de cálcio e a trombina bovina. Entretanto o autor faz uma ressalva de que o uso de trombina bovina tem sido associado com o desenvolvimento dos fatores

de coagulação V e XI, resultando na ativação da trombina, com o risco de desencadear coagulopatias. Apesar de Melo et al. (2006), descrever a trombina bovina como um tipo de fator ativador para o PRP, o mesmo não foi encontrado na cidade de Recife/PE, o que impossibilitou seu uso nesse experimento.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados alcançados, conclui-se que a tromboplastina foi mais eficiente para a ativação do gel de PRP quando comparada ao gliconato de cálcio a 10% (trombina autógena), mesmo ambas sendo de fácil aquisição, pois a tromboplastina foi capaz de formar gel em 100% das amostras de PRP, apesar da mesma ter um custo mais elevado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aleixo G.A.S., Coelho M.C.O.C. Plasma rico em plaquetas: obtenção, momento de produção e uso na integração de flaps cutâneos de avanço em cães. Recife, UFRPE, 2010, 131 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária, 2010.

Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.*, 13:487-493, 2001.

Barbosa A. L. T., Del Carlo R. J., Gomes H. C., Oliveira A. C., Monteiro B. S., Del Carlo B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, 2008.

Choukroun J., Diss A., Simonpieri A. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*;101:299-303, 2006.

Coloma E.S., Rolon A.U., Khoury M.A. La actualidad del plasma rico en plaquetas em traumatología del deporte. *Revista De La Asociacion Argentina De Traumatologia Del Deporte*, pg. 30-43, 2011.

Cross S.E., Naylor I.L., Coleman R.A., Teo T.C. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg*;48:189-197. 1995.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378,785 -789.

Dohan D.M., Choukroun J., Diss A. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 101:51-55, 2006.

Ehrenfest D.M., Rasmusson L., Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 27(3):158-67, 2009.

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

Gandhi A., Doumas C., O'connor J.P., Parsons J.R., Lin S.S. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*, 38:540-546, 2006.

Harmon K., Hanson R., Bowen J., Greenberg S., Magaziner E., Vandebosch J., Harshfield D., Shiple B., Audley D. Guidelines for the Use of Platelet Rich Plasma. The International Cellular Medical Society, 2011.

Lacci, K. M., & Dardick, A. Platelet- Rich Plasma: Support for Its Use in Wound Healing. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 83(1):1-9, 2010.

Marques F.P., Ingham S.J.M., Forgas A., Franciozi C.E.S., Sasaki P.H., Abdalla, R.J. Um método manual de obtenção do plasma rico em plaquetas. *Revist. Acta Ortop Bras*, 22(2):75-7. 2014.

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

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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 85:638-646. 176, 1998.

Marx, R. E.; Carlson, E. R. The potential role of growth and differentiation factors in periodontol. *Oral Surg., Oral Med. Oral Pathol*, 67:545-553, 1999.

McElwee, K. and Hoffmann, R. Growth factors in early hair follicle morphogenesis. *Eur. J. Dermatol.* (10):341-350, 2000.

Mello E.D.A., Mello, G.P.S., Silva L.A., Freitas M.A.C. As bases biológicas do plasma rico em plaquetas The biologics basis of the platelet-rich plasma RFO UPF; 11(2):91-95,2006.

Monteiro M.R. Plasma rico em plaquetas em dermatologia. *Surg Cosmet Dermatol.*, 5(2):1559, 2013.
Obarrio J. J., Arauz-Dutari J. I., Chamberlain T. M., Croston A. The use autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. *International Journal Periodontics Restorative Dentistry*, v.20, p. 487- 497, 2000.

Pontual M. A. B.; Magini R. S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento; das pesquisas científicas à clínica Odontológica. São Paulo: Santos, 2004.

Ravel, R. Laboratório Clínico Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6 ed. Ed. Guanabara Koogan, p.109-29,1997.

Robson M.C., The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen*, 5:12-17, 1997.

Scaranto, M. K. Plasma Rico Em Plaquetas. Universidade Federal De Santa Catarina Centro De Ciências Da Saúde Departamento De Estomatologia Curso De Especialização Em Periodontia, Florianópolis, 2002.

Stenn K. S., Combates N. J., Eilertsen K. J., Gordon, J. S, Pardinas J. R., Parimoo, S. Hair follicle growth controls. *Dermatol Clin.* 14:543-58. 1996.

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, jan./mar. 2012

Vendramin F.S., Franco D., Schamall R.F., Franco T.R. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos *Rev. Bras. Cir. Plást.*, 25(1): 4-10, 2010.

Webb C.A. Platelet-Rich Plasma Update: Clinical Use in Musculoskeletal Care. *J Musculoskel Med.* 29:96-101, 2012.

Whitman D.H., Berry R.L., Green D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.*;55(11):1294–9, 1997.

Wrotniak M., Bielecki T., Gazdzik T.S. Current opinion about using the plateletrich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil.*, 9:227- 238, 2007.

Zandim B.M., Souza M.V., Magalhães P.C., Benjamin L.A., Maia L., Oliveira A.C., Pinto J.O., Júnioret J.I.R. Ativação plaquetária: ultraestrutura e morfometria no plasma rico em plaquetas de equinos. *Pesq. Vet. Bras.* vol.32, n.1, pp. 83-92. ISSN 0100-736X, 2012.

ARTIGO II

ANÁLISE DO RISCO DE CONTAMINAÇÃO BACTERIOLÓGICA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE CÃES ELABORADO PELO MÉTODO MANUAL

Formatado segundo as normas para publicação da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (*Brazilian Journal of Medicine*)

Análise do risco de contaminação bacteriológica do plasma rico em plaquetas de cães elaborado pelo método manual

Analysis of the risk of bacteriological contamination of plasma rich platelet dogs prepared by the manual method

ABSTRACT: The Platelet Rich Plasma (PRP) is a derivative product of autologous centrifugation of whole blood comprising plasma, leukocytes, and platelets containing various growth factors (FC's) therein, whose function is to stimulate the scar events. Although authors attribute the PRP fungal and bacteriostatic protection, blood is an excellent medium for bacterial culture and therefore, microbiological analysis of this concentrate is important to assess the risk of contamination by opportunistic microorganisms, especially when opting for manual production method, which increases the possibility PRP contact with the hands of those who handle the product. The objective of this experiment was to evaluate the risk of contamination of PRP samples produced by the manual method, and thus identify (s) time (s) greater risk of microbial contamination during the processing steps. Blood samples from 20 healthy animals were collected for production of PRP through the manual method and three different times called M0 (after the first centrifugation), M1 (after the second centrifugation) and M2 (when PRP samples were collected in plate petri) were performed in a microbiological culture aliquot of PRP. These samples were plated on medium type sheep blood agar and cultured on bacteriological culture greenhouse, where two observations were made, the first 24 hours and the second at 48 hours. All the PRP production process was conducted in biological safety hood with sterile protective equipment to prevent contamination of the blood from the time of collection to final obtaining the product. There was no contamination of PRP in either time intervals, indicating the production of PRP by the manual method is a safe technique with regard to the risk of contamination, since all steps are carried out ensuring the asepsis.

KEY WORDS: Blood, platelet concentrate, microorganisms.

RESUMO: O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um produto autólogo derivado da centrifugação do sangue total, composto por plasma, leucócitos e plaquetas que contém diversos fatores de crescimento (FC's) no seu interior, cujo a função é estimular os eventos cicatriciais. Apesar de autores atribuírem ao PRP proteção fúngica e bacteriostática, o sangue é um excelente meio de cultura bacteriana e assim sendo, uma análise microbiológica desse concentrado é importante para avaliar o risco de contaminação por microrganismos oportunistas, especialmente quando se opta pelo método manual de produção, no qual aumenta a possibilidade de contato do PRP com as mãos de quem processa o produto. Objetivou-se com o presente experimento avaliar o risco de contaminação de amostras do PRP produzidas pelo método manual, e assim identificar o(s) momento(s) de maior risco de contaminação microbiana durante as etapas de processamento. Foram coletadas amostras de sangue de 20 animais saudáveis para produção do PRP através do método manual e em três momentos distintos denominados M0 (após a primeira centrifugação), M1 (após a segunda centrifugação) e M2 (quando as amostras de PRP eram reunidas em placa de Petri) foram realizados cultura microbiológica de uma alíquota do PRP. Estas amostras foram semeadas em meio de cultura do tipo Ágar Sangue Ovino e cultivadas em estufa bacteriológica, onde foram efetuadas duas observações, sendo a primeira com 24 horas e a segunda com 48 horas. Todo o processo de produção do PRP foi realizado em capela de segurança biológica, com equipamentos de

proteção estéreis, visando evitar a contaminação do sangue desde o momento da coleta até a obtenção final do produto. Não houve a contaminação do PRP em nenhum dos momentos avaliados, indicando que a produção do PRP pelo método manual é uma técnica segura no que diz respeito ao risco de contaminação, desde que todas as etapas sejam realizadas assegurando a assepsia.

PALAVRAS CHAVE: Sangue, concentrado de plaquetas, microrganismos.

INTRODUÇÃO

Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um produto obtido através da centrifugação de sangue autógeno, no qual se consegue obter uma maior concentração de plaquetas em um menor volume de plasma (Vendramin et al. 2006, Pagliosa & Alves 2007, Díaz et al. 2015). Segundo Whitlow et al. (2008), é possível concentrar por meio de centrifugação de três a cinco vezes a quantidade de plaquetas em comparação com a sua quantidade no sangue basal.

A obtenção de uma maior quantidade de plaquetas é justificada pelo fato de que existem fatores de crescimento (FC's) no seu interior, que promovem angiogênese, mitogênese, quimiotaxia (Maia & Souza 2009), diferenciação celular e proliferação de fibroblastos (Lagunas 2006, Pardo 2012). Diante das propriedades atribuídas aos FC's, o PRP tem o potencial de estimular a cicatrização (Fossum 2008), favorecendo a fase de reparação (Pazzini 2014).

A justificativa para a realização de novas pesquisas sobre o uso de PRP em cirurgias de pequenos animais está embasada no fato de que os resultados dos estudos laboratoriais e testes clínicos já divulgados são prósperos (Fossum 2014).

Quando se iniciaram as pesquisas e a confecção do PRP, eram utilizados grandes equipamentos de autotransusão que colhiam amostras de sangue volumosas (Kevy & Jacobson 2004). Com o tempo foram criados equipamentos automáticos mais compactos e simples (Jameson 2007), como o Magellan® (Roukis et al. 2006), que se por um lado exigiam menores amostras de sangue (Kevy & Jacobson 2004), por outro, possuíam custo elevado (Lemos et al. 2002).

Na sequência, pesquisadores desenvolveram protocolos de obtenção de PRP mais simples, por meio do uso de centrífugas laboratoriais de bancada, conhecido como método manual (Lemos et al. 2002, Macedo 2004, Junior & Filho 2004, Ferraz et al. 2007, Barbosa et al. 2008, Aleixo & Coelho 2011). A partir disso, o PRP passou a ser considerado um produto de fácil obtenção e baixo custo (Maia & Souza 2009),

No método manual, o PRP é obtido pela centrifugação do sangue de modo que as hemácias possam se sedimentar, mantendo os leucócitos e as plaquetas em suspensão no plasma. Esse plasma retorna para a centrífuga, após o descarte das hemácias (Jameson 2007) e é novamente centrifugado em velocidade um pouco mais alta que a inicial, levando à precipitação das plaquetas e leucócitos no fundo do tubo (Vendramin et al. 2006). Na sequência, 80% da parte superior do plasma, correspondente ao

plasma pobre em plaquetas (PPP) é descartado (Macedo 2004) e o botão plaquetário localizado no fundo do frasco junto com o plasma, é homogeneizado dando origem ao PRP (Barroso et al. 2007).

Na obtenção do PRP pelo método manual, há uma maior possibilidade de exposição desse fluido biológico (Miranda 2011), levando em consideração também que esse material pode conter microrganismos existentes no próprio sangue, caso o paciente esteja doente (Balsamo & Felli 2006, Caetano et al. 2006, Sarquis 2007).

Segundo Niu et al. (2006) e Palavecino et al. (2010) apesar do risco de infecção viral ter diminuído consideravelmente nos últimos anos, a contaminação bacteriana de concentrados plaquetários (CPs) é, um perigo remanescente. Muitas vezes a estocagem de hemocomponentes em temperaturas entre 20 a 24°C por cinco a sete dias facilita a replicação bacteriana (Simon et al 2002, Mcdonald 2004).

Em estudo realizado por Cunha et al. (2008), em um Hospital Universitário no Brasil, foi detectado contaminação bacteriana de 0,4% de concentrados de plaquetas (CPs), ou seja, 8 de 2.000 amostras investigadas, sendo bactérias gram-positivas as responsáveis por 38% das contaminações.

Para saber o tipo de bactéria presente nesses concentrados, pode ser realizado o cultivo microbiano em placas de petri contendo o meio ágar sangue, que oferece ótimas condições de crescimento para a maioria dos microrganismos. Amostras são coletadas por meio de swabs do tipo Stuart (meio Stuart) que por apresentar carência de uma fonte de nitrogênio, impede consideravelmente a multiplicação dos microrganismos no seu meio, entretanto sua composição nutritiva garante a sobrevivência deles para que esses possam ser cultivados em outros meios, como o ágar sangue. Esse tipo de swab permite o transporte de diversos materiais e conseqüentemente a conservação dos microrganismos patogênicos como: *Haemophilus* spp., *Pneumococcus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. *Streptococcus pneumoniae* e *Bordetella pertussis*.

Já o meio ágar sangue, que conserva os eritrócitos íntegros, favorece a formação de halos de hemólise nítidos na presença de microrganismos não fastidiosos, como o *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (ANVISA 2004a).

Visto que pode haver a possibilidade de contaminação do PRP obtido por meio do método manual pelo fato de se tratar de um produto de origem biológico, o que pode resultar inclusive na infecção no local de aplicação do mesmo (Costa 2010) objetivou-se com o presente experimento avaliar o risco de contaminação de amostras do PRP processadas pelo método manual em três momentos distintos, e assim identificar o (s) momento (s) de maior risco de contaminação microbiana.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e após a liberação da licença nº 23082.005174/2015, a pesquisa foi iniciada.

Para compor o grupo experimental desta pesquisa, foram coletadas amostras de sangue de 20 animais provenientes de canis particulares nas cidades de Recife e Paulista do estado de Pernambuco. Estes animais possuíam idade entre 9 meses e 14 anos, com peso variando entre 25 e 43 kg, eram saudáveis e não apresentavam alterações no hemograma e nas dosagens de uréia, creatinina, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase. Foi solicitado aos tutores dos animais o preenchimento de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorização do procedimento.

A coleta de sangue era realizada utilizando um sistema fechado a vácuo com frascos contendo citrato de sódio como anticoagulante, sendo obtido de cada paciente quatro frascos de 3,5 mL (para confecção manual do PRP). Além dessas amostras, foram coletados mais dois tubos de sangue de cada paciente, sendo um tubo de 2 mL contendo EDTA para realização do hemograma e quantificação plaquetária do sangue basal, e, um tubo sem anticoagulante para análise bioquímica do paciente.

Após a coleta, os tubos contendo citrato de sódio eram remetidos ao laboratório para que fosse realizado o processamento do PRP pelo protocolo elaborado por Aleixo e Coelho (2010), no qual os mesmos eram submetidos a uma primeira centrifugação a 1200 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos em uma centrífuga laboratorial de bancada (FANEN[®] modelo Baby[®] Centrifuge). Após a primeira centrifugação, todo o plasma e camada leucoplaquetária era aspirado por meio de um pipetador automático, sendo transferido para um tubo estéril sem aditivo para que fosse submetido à segunda centrifugação a 1600 rpm por 10 minutos.

Em seguida, foi descartado aproximadamente 80% do sobrenadante, onde permaneceu apenas a parte enriquecida de plaquetas (PRP). Na sequência, o PRP foi depositado em placa de Petri estéril, aonde era adicionado um fator agonista para ativar o concentrado de plaquetas, dando origem ao gel de plaquetas.

Ao longo do processo de produção do PRP, foram realizadas coletas de parte do material utilizando swabs em tubos estéreis com meio Stuart em três momentos: na transição do PRP de um frasco para o outro após a primeira centrifugação (M0), ao abrir o tubo para descartar o sobrenadante do PRP depois da segunda centrifugação (M1) e na Placa de Petri estéril após a produção do gel de plaquetas (M2).

As amostras foram semeadas em placas de Petri, contendo Ágar Sangue Ovino e incubadas em estufa bacteriológica à 37°C, com observações das placas com 24 e 48 horas. Posteriormente, foram

efetuadas as leituras em microscópio óptico, anotando-se os aspectos de crescimento das colônias e produção de hemólise no meio de cultura.

O processamento do PRP foi realizado em capela de segurança biológica e durante todo o procedimento foi feito o uso de máscara, touca, avental cirúrgico descartável e luvas estéreis, além dos tubos estéreis que também foram higienizados externamente com álcool a 70%, para evitar e/ou minimizar a contaminação da amostra coletada.

RESULTADOS

Após 24 horas de incubação, as amostras foram analisadas macroscopicamente quanto ao crescimento bacteriano durante esse período. Na estria feita na placa de Petri com o meio de cultura do tipo ágar sangue, não foi observado nenhuma contaminação em nenhum dos momentos das coletas, ou seja, na transição do PRP de um frasco para o outro após a primeira centrifugação (M0), ao abrir o tubo para descartar o sobrenadante do PRP depois da segunda centrifugação (M1) e na Placa de Petri estéril após a produção do gel de plaquetas (M2).

Com 48 horas de incubação novamente as placas foram analisadas macroscopicamente, e assim como observado na leitura do material com as 24 horas, não houve crescimento bacteriano nas placas de Petri em todos os momentos de coleta dos swabs (M0, M1 e M2).

DISCUSSÃO

O protocolo de obtenção do PRP eleito no presente experimento foi criado a partir da pesquisa em artigos sobre a produção do plasma enriquecido em plaquetas, onde autores criaram protocolos mais simples fazendo uso de centrífugas laboratoriais de bancada, técnica conhecida por método manual (Lemos et al. 2002, Macedo 2004, Junior & Filho 2004, Ferraz et al. 2007, Barbosa et al. 2008). Assim o PRP passou a ser considerado um produto de fácil obtenção, porém com maior predisposição à contaminação devido a maior manipulação e exposição desse material biológico (Miranda 2011).

Apesar dos autores como Niu et al. (2006) e Palavecino et al. (2010), citarem que contaminação bacteriana de concentrados plaquetários (CPs) é um perigo remanescente, no presente estudo isso não foi observado, pois todas as amostras foram negativas para crescimento biológico.

Levando em consideração também que essas amostras poderiam conter microrganismos existentes no próprio sangue do paciente, pelo fato de que existem animais doentes sem percepção clínica (Sarquis 2007), justificou-se a necessidade de realização da cultura do PRP, associado a realização do exame clínico prévio dos pacientes e hemograma, visando descartar a possibilidade de coleta de sangue em animais doentes.

Apesar do resultado favorável do presente estudo (100% das amostras negativas), em pesquisa realizada por Cunha et al (2008), foi detectado contaminação bacteriana de 0,4% de CPs (8 de 2.000 amostras investigadas), sendo bactérias gram-positivas as responsáveis por 38% das contaminações.

Para a coleta do PRP, foi feito uso do swab Stuart, pois este impede consideravelmente a multiplicação de microorganismos dentro do frasco, entretanto a sua composição nutritiva garante a sobrevivência deles para que esses possam ser cultivados em outros meios como o ágar sangue (ANVISA 2004a). Essa consideração era muito importante, pelo fato de que as amostras eram coletadas de animais pertencentes a canis que ficavam distantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, local aonde as culturas eram realizadas.

Para realização da cultura bacteriana foi empregado o meio de ágar sangue ovino, que parte do princípio do uso de uma base rica, oferecendo ótimas condições de crescimento para a maioria dos microorganismos, como Gram negativo e Gram positivo, além de fungos filamentosos (bolors) e leveduras (ANVISA 2004a). Segundo Antunes (2000), hemoderivados de origem animal são empregados de forma ampla no preparo de meios de cultura utilizados em práticas laboratoriais de rotina, e por isso o respectivo meio foi selecionado. Mesmo usando o meio ideal, não houve crescimento bacteriano, e diante desse resultado, a próxima etapa da pesquisa, que seria a classificação dos microorganismos de acordo com as características morfológicas das colônias e morfotintórias à técnica do Gram, não foi realizada.

Segundo Costa (2010) um risco de contaminação para o paciente por meio do método manual, inclui a infecção no local de aplicação. No presente estudo esse fator de risco não foi observado, pois todos os animais eram previamente avaliados para descartar animais com infecções visíveis, e associado a isto, os locais da coleta eram submetido à antissepsia com álcool a 70% antes da coleta de sangue.

Além do fator de risco citado no parágrafo acima, o mesmo autor (Costa 2010), relata que os laboratórios de análises clínicas proporcionam uma série de atividades e situações que são potenciais de risco. Porém, mesmo diante destes riscos, neste trabalho nenhuma amostra apresentou contaminação.

Acreditamos que os resultados aqui obtidos podem ser atribuídos aos cuidados da equipe de execução do experimento, pois segundo a ANVISA (2004b) todo o processo desde a coleta, processamento e aplicação, devem ser executados com elevadíssimo controle de qualidade, evitando a propagação de doenças e afastando qualquer tipo de contaminação e complicações cirúrgicas (Fernandes et al 2010). Conforme descrito na metodologia, as amostras do experimento foram processadas em capela de segurança biológica e durante toda manipulação do produto foram utilizados gorro, máscara, avental e luva cirúrgica, garantindo a assepsia de todo procedimento. Segundo Ueiki et al (2008) a utilização das boas práticas é fundamental para minimizar os riscos.

Acreditamos ser importante a divulgação dos resultados positivos obtidos nessa pesquisa, diante de todas as práticas instituídas visando minimizar a contaminação, pois a maioria dos artigos que relatam o uso do PRP em diversas áreas da saúde, não descrevem as condições em que o mesmo é produzido. É preciso estar atento à importância dessa temática, levando em consideração que o PRP contaminado poderia gerar um transtorno ainda maior para o paciente no qual o produto poderia ser aplicado, como uma infecção local, sistêmica ou até a morte.

CONCLUSÃO

Conclui-se que nas condições em que o experimento foi realizado, de que o método manual de obtenção do plasma rico em plaquetas é seguro quanto ao risco de contaminação por microrganismos quando são adotadas práticas rigorosas de assepsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aleixo G.A.S., Coelho M.C.O.C. Plasma rico em plaquetas: obtenção, momento de produção e uso na integração de flaps cutâneos de avanço em cães. Recife, UFRPE, 2010, 131 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária, 2010.

Antunes G.S. Meios de Cultura. Manual de Diagnóstico Bacteriológico. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS; 1998. p. 242-266. 6 2. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal. [<http://www.meusite.com.br/COBEA/etica.htm>] 03 março 2000.

Balsamo AC, Felli V.E.A. Estudo sobre acidentes de trabalho com exposição aos líquidos corporais humanos em trabalhadores da saúde de um hospital universitário. Rev Latino Am Enferm. 14(3):346-53, 2006.

Barbosa A. L. T., Del Carlo, R. J., Gomes, H. C., Oliveira, A. C., Monteiro, B. S., Del Carlo B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. Ciência Rural, v.38, n. 5, p. 1335-1340, 2008.

Barroso C. S. T., Benito J. C., Puig A. G. Calidad Del plasma rico em plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. Ver. Esp. Cir. Oral y Maxilofac., v. 29, n. 4, p. 240-248, 2007.

Caetano J.A., Soares E., Braquehais A.R., Rolim K.A.C. Acidentes de trabalho com material biológico no cotidiano da enfermagem em unidade de alta complexidade. Enfermagem Global, 9(1):1-10, 2006.

Costa M. A. F., Costa M. F. B. Biossegurança: elo estratégico de SST. Centro Nacional de Epidemiologia / Fundação Nacional de Saúde / Ministério da Saúde - Setor de Autarquias Sul, Brasília DF Brasil. Revista CIPA nº 253, 2010.

Cunha G.S., Leão L., Pimenta F. Bacterial contamination of random-donor platelets in a university hospital in the midwestern region of Brazil. *Transfusion*; 48:282-285, 2008.

Díaz R.M., Carreño M.G., Torres J. J., Herreros J.M.A., Villimar A., Sánchez P.L. Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. *Farmacia hospitalaria: órgano oficial de expresión científica de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*. Vol. 39, Nº. 3, 2015, págs. 130-136

Ferraz V.C.M. et al. Concentração do plasma rico em plaquetas de cães obtida por três velocidades de centrifugação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.58, supl.2, p.18, 2006.

Filho J. M. J. Desenho do Trabalho e Patologia Organizacional: um estudo de caso no serviço público. *Revista Produção – vol.14 (3) p.60, set/dez 2004.*

Fossum T. W., Hedlund C. S., Johnson A. L., Schulz K. S., Seim H. B., Wichaël D. W., Bahr A., Carroll G. L. *Cirurgia de pequenos animais*, Rio de Janeiro, Ed. Elsevier, 3 edição, Cap. 18, pg. 317-138, 2008.
Fossum T.W. *Cirurgia de Pequenos Animais 4ª Edição/2014* - Theresa Welch Fossum. Editora Elsevier, 2014.

Jameson C.A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. *Labmedicine*, v. 38, p. 39-42, January 2007.

Kevy S.V., Jacobson M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J. Extra. Corpor. Technol.* 36(1):28-35, 2004.

Lagunas, J.G. Plasma rico em plaquetas. *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.*, v.28, n. 2, p. 89-99, 2006.

Lemos J.J., Rossi Junior R., Píspico, R. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – proposta de um protocolo de obtenção simplificado, 2002. Disponível em: <<http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225>> Acesso em: 06 Nov 2015.

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

Macedo A.P. 2004. Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção. Dissertação de Mestrado em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, p.64.

McDonald C.P., Roy A., Mahajan P., Smith R., Charlett A., Barbara J.A. Relative values of the interventions of diversion and improved donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang*; 86:178-182, 2004.

Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos, módulo IV, 2004.

Miranda F.M.D., Stein Junior A.V., Petreli S., Pires M.R., Soares L.G., Ribeira, B. N., Sarquis L.M.M., Felli V.E.A., Oliveira M.C.L.X., Uma contribuição à saúde dos trabalhadores: um guia sobre exposição aos fluídos biológicos *Rev Esc Enferm USP*, 45(4):1018-22, 2011.

Niu M.T., Knippen M., Simmons L., Holness L.G. Transfusion-transmitted *Klebsiella pneumoniae* Fatalities 1995 to 2004. *Transfus Med Rev* 20:149-157, 2006.

Pagliosa, G.M.; Alves, G.E.S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.

Palavecino E.L., Yomtovian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets. *Transfus Apher Sci*; 42:71-82, 2010.

Pardo M., Sacco S.R., Surian C.R.S., Landim-Alvarenga F.C. Principais Usos Do Plasma Rico Em Plaquetas Na Medicina Veterinária. Revista científica eletrônica de medicina veterinária – ISSN: 1679-7353 Ano IX – Número 18 – Periódicos Semestral, Janeiro De 2012.

Pazzini J. M. Plasma rico em plaquetas empregado na cirurgia reconstrutiva em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*): Avaliação da exequibilidade da técnica, achados macroscópicos e histopatológicos. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014.

Roukis T.S., Zgonis T., Tiernan B. Autologous platelet-rich plasma for wound and osseous healing: a review of the literature and commercially available products. *Advances in Therapy*, v. 23, n.2, p.218-237, 2006.

Sarquis L.M.M. O monitoramento do trabalhador de saúde, após exposição a fluidos biológicos [tese doutorado]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2007.


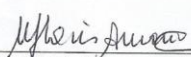

Simon T.L., Dzik W.H., Snyder E.L., Stowel C.P., Stauss R.G. *Principles of Transfusion Medicine*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002.

Vendramin F.S., Franco D., Nogueira C.M., Pereira M.S., Franco T.R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.

Whitlow J., Shackelford A.G., Sievert A.N., Sistino J.J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. *Perfusion*, v.23, p283-289, 2008.

5. ANEXO

ANEXO A: Licença concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para o uso de animais no experimento.

 <p>Universidade Federal Rural de Pernambuco Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE</p>	
<p>Comissão de ética no uso de animais - CEUA</p> <p>Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino</p>	
<p>O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.</p>	
Número da licença	028/2015
Número do processo	23082.005174/2015
Data de emissão da licença	10 de Abril de 2015
Título do Projeto	Estudo comparativo entre o gel de plaquetas ativado com diferentes fatores agonistas e o plasma rico em plaquetas não ativado em cães.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Grazielle Anahy de Sousa Aleixo Cavalcanti
Colaboradores	Marcela Oliveira Sampaio
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Cão; total de 20 animais.
<p> Prof. Dra. Marleyne Amorim (Presidente da CEUA-UFRPE)</p>	
<p> Prof. Dr. Marleyne Amorim Coordenadora CEUA</p>	

ANEXO B: Informações como raça, idade, sexo, peso e procedência dos animais da pesquisa.

Animal	Raça	Idade	Sexo	Peso (kg)	Procedência
1	Greyhound	2a	Macho	30	Canil de Rebeca. Animais doadores de sangue
2	Greyhound	4a	Fêmea	27	Canil de Rebeca. Animais doadores de sangue
3	Greyhound	3a	Macho	30	Canil de Rebeca. Animais doadores de sangue
4	Rottweiler	8a	Macho	35	Canil de seu Elzir
5	Rottweiler	4a	Fêmea	32	Canil de seu Elzir
6	Rottweiler	3a	Fêmea	32,5	Canil de seu Elzir
7	Rottweiler	14a	Fêmea	36	Canil de seu Elzir
8	Rottweiler	9a	Macho	35	Canil de seu Elzir
9	Rottweiler	9a	Macho	35,6	Canil de seu Elzir
10	Labrador	2a 3m	Macho	38.3	Animal do Kennel Club de PE
11	Labrador	1a 3m	Fêmea	31.3	Animal do Kennel Club de PE
12	Labrador	2a 5m	Fêmea	48.5	Animal do Kennel Club de PE
13	Labrador	1a 3m	Macho	36.1	Animal do Kennel Club de PE
14	Golden	2a 3m	Macho	37,2	Animal do Kennel Club de PE
15	Golden	1a	Macho	31,1	Animal do Kennel Club de PE
16	Golden	10m	Fêmea	25.1	Animal do Kennel Club de PE
17	Rottweiler	9a	Fêmea	33.3	Animal do Kennel Club de PE
18	Golden	3a	Macho	34.6	Canil White Sand
19	Golden	8a	Macho	40	Canil White Sand
20	Golden	4a	Macho	43,3	Canil White Sand

ANEXO C: Termo de consentimento para realização da pesquisa por parte dos tutores dos animais.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu, _____ com número de RG, _____, declaro para os devidos fins que permito que os animais sob minha tutoria, participem de uma pesquisa de mestrado onde serão coletadas amostras de sangue, por punção de veia cefálica em sistema fechado a vácuo, para confecção de plasma rico em plaquetas (PRP) e para realização de exames de hemograma e bioquímica sérica.

Pesquisa de mestrado:

“Avaliação Comparativa Entre Diferentes Fatores De Ativação Para Produção Do Gel De Plasma Rico Em Plaquetas Em Cães” do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Recife, ____ de _____ de _____

Assinatura do Tutor

ANEXO D: Normas para publicação da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (Brazilian Journal of Medicine)

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivos e política editorial

A Revista Brasileira de Medicina Veterinária (RBMV) é uma publicação trimestral e multidisciplinar, da Sociedade de Medicina Veterinária do Estado do Rio de Janeiro (SOMVERJ) (www.somveri.org.br), que tem como objetivo publicar os resultados de trabalhos de pesquisa originais nas subáreas da Medicina Veterinária, visando o aprimoramento técnico-científico e profissional. Nos manuscritos encaminhados para avaliação e que forem relativos à produção animal deverá ter em seu conteúdo enfoque clínico relativo aos objetivos da proposta apresentada. Deverão ser citados no Material e Métodos o número indicativo da aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Instituição onde o trabalho foi feito. Além disso, quando se tratar de fauna silvestre deverá constar também o número do SESBIO emitido pelo órgão competente para o mesmo. Os artigos de Produção Animal, deverão ter enfoque em Saúde Animal.

Revisões serão aceitas, quando a convite do Editor.

Os trabalhos para submissão deverão ser enviados por via eletrônica, através do site da revista, www.rbmv.com.br e-mail: submissao@rbmv.com.br. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Comitê Editorial, apoiado pela Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares ("peer review").

Os trabalhos devem ser organizados, sempre, em TÍTULO, TÍTULO EM INGLÊS, AUTORES, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes dois últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Os relatos de casos devem constar sempre de TÍTULO, TÍTULO EM INGLÊS, AUTORES, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, HISTÓRIO, DISCUSSÃO E/OU CONCLUSÃO E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Em relatos de casos, o texto deve ser organizado, sempre, em INTRODUÇÃO, HISTÓRIO (Este deve ser constituído por Anamnese, material e métodos, e resultados), DISCUSSÃO E/OU CONCLUSÃO.

Abstract: deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ao final devem ser relacionadas às "Key Words";

Resumo: deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português do trabalho, deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO. Ao final, devem ser relacionadas às "Palavras-Chave";

Introdução: deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

Material e Métodos: devem ser reunir os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

Resultados: deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; Tabelas devem ser preparadas sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em tabelas extensas;

Discussão: os resultados devem ser discutidos diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

Conclusões: devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

Agradecimentos: devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

Referências: só deve ser incluída a lista da bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta; deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (não deverão ser precedidos de et al.), o título de cada publicação e, por extenso, o nome da revista ou obra.

Exemplos de citação na lista das referências:**Artigo Científico**

Carrington S.D., Bedford P.G.C., Guillon J.P. & Woodward E.G. Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film.3. The normal tear film of the cat. *Journal of Small Animal Practice*, 28:821-826, 1987.

Artigo Eletrônico

COBEA, Legislação & ética. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/ética.htm>>. Acesso em: 14 Mar 2007.

Livro

Rodrigues H. *Técnicas anatômicas*. 2ª ed. Arte Visual, Vitória, 1998. 200p.

Capítulo de Livro

Strubbe A.T. & Gelatt K.N. Ophthalmic examination and diagnostic procedures, p. 427-466. In: Gelatt K.N. (Ed.), *Veterinary Ophthalmology*. 3rd ed. Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1999.

Não serão aceitas citações de Monografias, Dissertações, Teses, Resumos e publicações na íntegra, de reuniões científicas.

Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel A4, com margens superior e inferior de 2cm e direita e esquerda de 2cm em fonte **Book Antiqua** corpo 12, em espaço simples. As chamadas de rodapé devem ser inseridas como “Cabeçalho e rodapé” e não, “inserir como nota”. A formatação do original a ser submetida para publicação deve seguir o exemplo de apresentação do último fascículo da revista (Exemplos podem ser observados em pdf no site da revista, www.rbmv.com.br). O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras no final. As Figuras (inclusive gráficos) e as Tabelas devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto;

A redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todas as tabelas e todas as Figuras deverão ser mencionadas no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. Abstract e Resumo serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

No rodapé da primeira página deverá constar a profissão de graduação e o título acadêmico maior, este último deve ser indicado com PhD quando for o caso e MSc ou DSc quando a indicação acadêmica não seguir o modelo prévio. O endereço profissional completo do(s) autor(es), E-mail do autor para correspondência indicado anterior ao e-mail por um sinal de + seguido de Autor(a) para correspondência e demais outros autores; quando os autores forem discentes de Programas de Pós-Graduação, Pós-Doutorado ou bolsistas de produtividade devem colocar após o seu e-mail a identificação como: - bolsista CAPES ou CNPq ou das demais agências de fomento se for o caso. Veja os exemplos em pdf no site da revista quando for o caso.

Siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

Citações bibliográficas no texto serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos e entre eles o sinal &, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, e vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais, em papel ou outro suporte, deverão ser fornecidas em arquivo, na extensão tiff, pelo autor. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em

branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto de cada figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides") coloridos. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão "jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações) em TIF 300 dpi; na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e serão apresentadas no final do trabalho.

As Tabelas deverão ser explicativas por si mesmas e colocadas no final do texto. Cada uma terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de *a* em cada Tabela; as notas serão lançadas logo abaixo da Tabela respectiva, da qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

Encargos

Se o artigo for aceito, será cobrada taxa de publicação de R\$ 150,00 por página editorada, que será enviada ao autor para correspondência, no ato do envio da prova final, para aprovação para publicação, independentemente de serem sócios, ou não, da SOMVERJ ou assinantes da Revista Brasileira de Medicina.