



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO GATO

ADELAIDE DE AGUIAR MARQUES TEIXEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte
Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba
Doutor Fernando António Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António Costa Ferreira

CO-ORIENTADOR

Dr. Henrique da Silva Armés

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO GATO

ADELAIDE DE AGUIAR MARQUES TEIXEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte
Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba
Doutor Fernando António Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António Costa Ferreira

CO-ORIENTADOR

Dr. Henrique da Silva Armés

2014

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, pela ajuda preciosa no desenvolvimento deste trabalho e na elaboração da presente dissertação.

Ao Professor Doutor Henrique Armés, pela oportunidade de estágio e por generosamente ceder o material hospitalar necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Aos restantes profissionais do HVSB agradeço a pronta resposta aos pedidos de socorro e pelos conhecimentos transmitidos.

Às minhas colegas do estágio curricular, agradeço a partilha, a compreensão e o tão bom humor. Aos colegas de Göttingen, pelo valioso contributo para a minha formação profissional, sobretudo para a aquisição de aptidões práticas, pelo carinho com que me receberam e pela confiança.

Ao Professor Telmo Nunes, pela pronta disponibilidade e pelas úteis orientações na parte estatística deste trabalho.

A nível pessoal, aos meus amigos, por quem tenho um carinho inestimável, por alegrarem o meu percurso até aqui, tanto fora como dentro da FMV. Aos amigos que tive a felicidade de conhecer durante os intercâmbios proporcionados pela faculdade e que tanto me ensinaram. Foram experiências inesquecíveis. Em especial, aos meus “companheiros de tese”, agradeço a amizade e o companheirismo. Comigo levarei sempre um pouco de todos vós.

À minha família, a quem mais devo, agradeço os valores, o apoio e o incentivo constantes que me ajudaram a alcançar mais uma etapa.

E como não podia deixar de ser, ao meu “patudinho” Óscar Margarido, que tem sido fiel às noites de estudo e de trabalho ao longo dos anos do curso.

RESUMO

OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO GATO

A aplicação de plasma rico em plaquetas (PRP) constitui um tratamento promissor na reparação de lesões devido aos efeitos benéficos das plaquetas, dos fatores de crescimento e de outras moléculas biológicas nos mecanismos fisiológicos de cicatrização e regeneração tecidual. Porém, atualmente não existe consenso quanto ao valor biológico do PRP, bem como das características ideais para a sua aplicação, o que não é surpreendente dado o número de variáveis que influenciam a obtenção deste produto biológico e do potencial destas poderem interagir entre si, incluindo as variáveis do protocolo de preparação. Não obstante, o interesse no PRP tem vindo a aumentar na Medicina Veterinária, existindo, ainda, poucas referências à sua preparação em algumas espécies, como é o caso do gato.

Assim, este trabalho teve como objetivo rever os princípios da terapia por PRP e otimizar um protocolo de produção de PRP em gatos, através do estudo das variáveis inerentes à sua preparação laboratorial (número de centrifugações, força e tempo de centrifugação) na eficácia de concentração de plaquetas. Adicionalmente, foram realizadas contagens de células sanguíneas de forma a caracterizar o PRP obtido. Concluiu-se que, através da metodologia usada, não foi possível concentrar plaquetas e que, dentro dos limites deste trabalho, uma única “rotação branda” (<100g, durante 5 min.) pode constituir um método relativamente simples e económico para obter PRP em gatos. De futuro, outros parâmetros que deverão ser avaliados são os efeitos isolados dos leucócitos e hemácias na preparação do PRP e mesmo a nível terapêutico, por forma a poder-se adequar a metodologia e a otimizar a obtenção das células que se pretendem aplicar na lesão.

Palavras-chave: plasma rico em plaquetas (PRP), otimização, protocolo, centrifugação, gatos

ABSTRACT

PROTOCOL OPTIMIZATION FOR OBTAINING PLATELET RICH PLASMA IN CATS

The application of platelet-rich plasma (PRP) constitutes a promising therapeutic approach in the repair of lesions due to the beneficial effects of platelets, growth factors, and other biological molecules in the physiological mechanisms of wound healing and tissue regeneration. However, currently there is no consensus on the biological value of PRP, nor on the optimal PRP characteristics for its therapeutic application, which, given the number of variables that affect the final product characteristics and their potential to interact with each other, including variables on the preparation protocol, is not surprising. Nonetheless, interest in PRP has been increasing in veterinary medicine. There is, however, very few references on how to prepare PRP in some species, including the cat.

This study aims to understand the basic principles of PRP therapy and to optimize a protocol for the production of PRP in cats, by assessing how factors derived from its preparation method (number of centrifugations, centrifugation speed and time) modify PRP concentration efficiency. In addition, blood counts were made in order to characterize the PRP. It was concluded that the methodology used in this study was unable to concentrate platelets and that, within the limits of this study, a single "soft spin" (<100g for 5 min.) could represent a relatively simple and economical method for producing PRP in cats. Future studies are necessary to assess other parameters, namely the isolated effects of leukocytes and erythrocytes on the PRP preparation and their therapeutic effects, in order to adjust the methodology and specifically obtain the cells we want to apply in the lesion.

Key words: platelet-rich plasma (PRP), optimization, protocol, centrifugation, cats

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
INTRODUÇÃO	1
BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE OS PERÍODOS DE ESTÁGIO	2
PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. GENERALIDADES SOBRE AS PLAQUETAS	6
1.1. Estrutura das plaquetas	6
1.1.1. Membrana da plaqueta.....	7
1.1.2. Citoesqueleto e estruturas membranosas	7
1.1.3. Grânulos	8
1.2. Origem das plaquetas: Megacariócitopoiese e trombocitopoiese	9
1.2.1. Maturação do megacariócito	10
1.2.2. Diferenciação do megacariócito em proplaquetas	10
1.3. Funções das plaquetas	12
1.3.1. As plaquetas na hemostase.....	12
1.3.2. As plaquetas na reparação de tecido	18
2. GENERALIDADES SOBRE O PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	21
2.1. História: do desenvolvimento à aplicação atual do PRP	21
2.2. PRP, o que é?	22
2.3. Potencial e limitações terapêuticas	25
2.4. Segurança	26
3. PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS	27
3.1. Como se obtém?	27
3.1.1. Colheita	29
3.1.2. Preparação	29
3.1.3. Aplicação	32
3.2. Fatores que influenciam a obtenção do PRP	33
3.2.1. Aparelhos e material	33

3.2.2.	Parâmetros do sangue	34
3.2.3.	O anticoagulante	35
3.2.4.	Número de centrifugações: protocolos de uma ou duas centrifugações	35
3.2.5.	Força de centrifugação e tempo de centrifugação	36
3.2.6.	Redução do volume plasmático	37
3.2.7.	O agente ativador e a matriz de fibrina	38
3.3.	Classificação	40
PARTE II – OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO GATO		44
1.	OBJETIVOS	44
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1.	Desenho experimental.....	44
2.1.1.	Recolha dos dados e dimensão da amostra.....	46
2.1.2.	Recolha de amostras: sedação/ anestesia	47
2.1.3.	Desenvolvimento dos estudos: produção de PRP.....	47
2.1.4.	Análise das amostras de PRP e sangue colhido: contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias	49
2.2.	Análise dos dados	54
2.2.1.	Organização dos dados das amostras	54
2.2.2.	Dados relativos ao protocolo de preparação de PRP.....	54
2.2.3.	Dados relativos à contagem de células	54
2.2.4.	Análise estatística.....	54
3.	APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS	55
3.1.	“Estudo força”.....	55
3.1.1.	Caracterização dos animais.....	55
3.1.2.	Caracterização das amostras de sangue (não centrifugado)	55
3.1.3.	Caracterização das amostras PRP1	56
3.1.4.	Caracterização das amostras PRP2	61
3.1.5.	Caracterização dos resultados dos PRP1 e PRP2.....	66
3.2.	“Estudo tempo”	68
3.2.1.	Caracterização dos pacientes.....	68
3.3.2.	Caracterização das amostras de sangue (não centrifugado)	68
3.1.6.	Caracterização das amostras PRP1	69
3.1.7.	Caracterização das amostras PRP2	74
3.1.8.	Caracterização dos resultados de PRP1 e PRP2	79
4.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	82

5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	89
6. CONCLUSÃO	90
LISTA DE REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	101
ANEXO I: Casuística discriminada referente aos casos observados nos serviços do HSVB.	101
ANEXO II: Protocolo do “estudo força”.....	111
ANEXO III: Protocolo do “estudo tempo”.....	113
ANEXO IV: Resultados da análise estatística do “estudo força”: comparação das contagens médias de plaquetas, hemácias e leucócitos no sangue e nos três PRP obtidos após cada centrifugação e entre os PRP da primeira e da segunda centrifugação.....	115
ANEXO V: Resultados da análise estatística do “estudo tempo”: comparação das contagens médias de plaquetas, hemácias e leucócitos no sangue e nos quatro PRP obtidos após cada centrifugação e entre os PRP da primeira e da segunda centrifugação	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática da ultraestrutura da plaqueta.....	6
Figura 2. Esquema da produção de plaquetas: desde o desenvolvimento dos megacariócitos à especialização de células e liberação de plaquetas na corrente sanguínea.....	10
Figura 3. Cascata de coagulação: interação dos FC na hemostase.....	16
Figura 4. Método manual de preparação do PRP.....	31
Figura 5. Separação do sangue em camadas após a primeira centrifugação.....	48
Figura 6. Câmara de Neubauer e representação da contagem de elementos sanguíneos nas suas grelhas de contagem.	51
Figura 7. Imagens da observação de plaquetas, leucócitos e hemácias na câmara de Neubauer.	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Duração dos estágios curricular e extracurriculares e número de casos observados nos estágios na área de clínica.....	5
Tabela 2. Principais FC contidos nos grânulos alfa das plaquetas e respectivas funções.....	20
Tabela 3. Classificação "PAW".....	42
Tabela 4. Definição dos parâmetros a ser avaliados em cada protocolo de PRP, segundo Ehrenfest et al. (2009).	42
Tabela 5. Variações da força de centrifugação no conjunto de protocolos que constituem o "estudo força".	45
Tabela 6. Variações do tempo de centrifugação nos grupos de protocolos que constituem o "estudo tempo".	45

Tabela 7. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão das contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas nas amostras de sangue colhidas aos 9 gatos em estudo.	56
Tabela 8. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 3 PRP (A, B e C) resultantes da centrifugação de 3 amostras de sangue colhidas a cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (100, 200 e 400g).	57
Tabela 9. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 3 PRP (A, B e C) resultantes da centrifugação das 3 amostras de sangue colhidas a cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (100, 200 e 300g).	59
Tabela 10. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 3 PRP (A, B e C) resultantes da centrifugação das 3 amostras de sangue colhidas a cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (100, 200 e 400g).	60
Tabela 11. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 3 PRP2 (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das 3 amostras PRP1 de cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (200, 400 e 800g).	61
Tabela 12. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 3 PRP2 (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das 3 amostras PRP1 de cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (200, 400 e 800g).	64
Tabela 13. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 3 PRP2 (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das 3 amostras PRP1 de cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (200, 400 e 800g).	65
Tabela 14. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão das contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas nas amostras de sangue colhidas aos 11 gatos em estudo.	69
Tabela 15. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (5, 5, 5 e 10 min., respectivamente).	70
Tabela 16. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (5, 5, 5 e 10 min., respectivamente).	72
Tabela 17. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (5, 5, 5 e 10 min., respectivamente).	74
Tabela 18. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (10, 15, 5 e 10 min., respectivamente).	76
Tabela 19. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (10, 15, 5 e 10 min., respectivamente).	76
Tabela 20. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (10, 15, 5 e 10 min., respectivamente).	79
Tabela 21. Casuística discriminada referente ao serviço de consulta externa do HVSB.	101
Tabela 22. Casuística discriminada referente ao serviço de internamento do HVSB. * Recobro pós-cirúrgico.	104
Tabela 23. Casuística discriminada referente ao serviço de cirurgia do HVSB.	109

Tabela 24. ANOVA de medições repetidas a um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos três PRP (A, B e C) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes forças (100, 200 e 400g).	115
Tabela 25. ANOVA de medições repetidas a um fator para a comparação das contagens médias de leucócitos no sangue e nos três PRP (A, B e C) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes forças (100, 200 e 400g).	115
Tabela 26. ANOVA de medições repetidas a um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos três PRP (A, B e C) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes forças (100, 200 e 400g).	116
Tabela 27. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos três PRP (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das amostras a diferentes forças (200, 400 e 800g). ...	116
Tabela 28. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de leucócitos no sangue e nos três PRP (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das amostras a diferentes forças (200, 400 e 800g). ...	117
Tabela 29. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos três PRP (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das amostras a diferentes forças (200, 400 e 800g). ...	117
Tabela 30. Teste de Wilcoxon para a comparação das médias das contagens de plaquetas, hemácias e leucócitos nos protocolos força da primeira (PRP1: 100, 200 e 400g) e da segunda centrifugação (PRP2: 200, 400 e 800g).	118
Tabela 31. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 5, 5, 5 e 10 min.).	119
Tabela 32. ANOVA de medições repetidas um fator para a comparação das contagens médias de leucócitos no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 5, 5, 5 e 10 min.).	119
Tabela 33. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 5, 5, 5 e 10 min.).	120
Tabela 34. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após a segunda centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 10, 15, 5 e 20 min.).	120
Tabela 35. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de leucócitos no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após a segunda centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 10, 15, 5 e 20 min.).	121
Tabela 36. ANOVA de medições repetidas um fator e teste <i>post-hoc</i> de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após a segunda centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 10, 15, 5 e 20 min.).	122
Tabela 37. Teste de Wilcoxon para a comparação das médias das contagens de plaquetas, hemácias e leucócitos nos protocolos tempo da primeira (PRP1: 5, 5, 5 e 10min.) e da segunda centrifugação (PRP2: 10,15, 5 e 10min).	122

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Tempo de estágio (horas) nos serviços do HVSB	3
Gráfico 2. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (0 g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na primeira centrifugação (100, 200 e 400g).....	57
Gráfico 3. Diagrama de extremos e de quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na primeira centrifugação (100, 200 e 400g).....	58
Gráfico 4. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GV) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na primeira centrifugação (100, 200 e 400g).....	60
Gráfico 5. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na segunda centrifugação (200, 400 e 800g).....	62
Gráfico 6. Diagrama de extremos e quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na segunda centrifugação (200, 400 e 800g).....	63
Gráfico 7. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GV) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na segunda centrifugação (200, 400 e 800g).....	65
Gráfico 8. Contagens de plaquetas no PRP relativamente à contagem no sangue (fator de concentração plaquetária) de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 correspondem respetivamente às forças 100, 200 e 400g da primeira centrifugação de 5 minutos e A2, B2 e C2 às forças 200, 400 e 800 da segunda centrifugação de 10 minutos.	66
Gráfico 9. Contagens de leucócitos no sangue e PRPs em cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 correspondem respetivamente às forças 100, 200 e 400g da primeira centrifugação de 5 minutos e A2, B2 e C2 às forças 200, 400 e 800 da segunda centrifugação de 10 minutos.....	67
Gráfico 10. Contagens de hemácias no sangue e PRPs em cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 correspondem respetivamente às forças 100, 200 e 400g da primeira centrifugação de 5 minutos e A2, B2 e C2 às forças 200, 400 e 800 da segunda centrifugação de 10 minutos.....	68
Gráfico 11. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (S) e nos PRP resultantes da centrifugação do sangue a 100g e a diferentes tempos (5 e 10 min.).....	70
Gráfico 12. Diagrama de extremos e quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (S) e nos PRP resultantes da centrifugação do sangue a 100g e a diferentes tempos de centrifugação (5 e 10 min.).....	72
Gráfico 13. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GV) no sangue não centrifugado (S) e nos PRP resultantes da centrifugação do sangue a 100g e a diferentes tempos (5 e 10 min.).....	73
Gráfico 14. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (S) e nos quatro PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação do PRP1 a 200g e a diferentes tempos (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).....	75
Gráfico 15. Diagrama de extremos e quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (S) e nos quatro PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação do PRP1 a 200g e a diferentes tempos (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).....	77

Gráfico 16. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GB) no sangue não centrifugado (S) e nos quatro PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação do PRP1 a 200g e a diferentes tempos (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).	78
Gráfico 17. Contagens de plaquetas no PRP relativamente à contagem no sangue (fator de concentração plaquetária) de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 e D1 correspondem respetivamente aos tempos 5, 5, 5 e 10 min. da primeira centrifugação a 100g e A2, B2, C2 e D2 aos tempos 10, 15, 5 e 10 min. da segunda centrifugação a 200g.	80
Gráfico 18. Contagens de leucócitos no sangue e nos PRP de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 e D1 correspondem respetivamente aos tempos 5, 5, 5 e 10 min. da primeira centrifugação a 100g e A2, B2, C2 e D2 aos tempos 10, 15, 5 e 10 min. da segunda centrifugação a 200g.....	81
Gráfico 19. Contagens de hemácias no sangue e nos PRP de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 e D1 correspondem respetivamente aos tempos 5, 5, 5 e 10 min. da primeira centrifugação a 100g e A2, B2, C2 e D2 aos tempos 10, 15, 5 e 10 min. da segunda centrifugação a 200g.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	alfa
$\alpha 2M$	$\alpha 2$ – Macroglobulina
$\alpha 2 - PI$	Inibidor da $\alpha 2$ -Plasmina
ACD - A	Ácido citrato dextrose - A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AP-t	Ativador do plasminogênio tecidual
ASC	<i>Adipose-derived mesenchymal stem cells</i> (células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo)
AT	Antitrombina
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase	Adenilpirofosfatase
BMSC	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i> (células-estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea)
CF	Camada flogística
COP	<i>Circulating osteogenic precursor cells</i> (células precursoras osteogénicas circulantes)
CPD	<i>Citrate Phosphate Dextrose</i> (citrato fosfato dextrose)
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i> (fator de crescimento do tecido conjuntivo)
dp	Desvio-padrão
EGF	<i>Epithelial growth factor</i> ou <i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epitelial ou epidérmico)
FC	Fatores de crescimento
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento fibroblástico)
FP3	Fator plaquetário 3
FS	Fosfatidilserina
FVW	Fator von Willebrand
GB	Glóbulos brancos (leucócitos)
GM – CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador das colónias de granulócitos-macrófagos)
GP	Glicoproteína

GV	Glóbulos vermelhos (hemácias)
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> (fator de crescimento de hepatócitos)
Htc	Hematócrito
HVSB	Hospital Veterinário de São Bento
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (fator de crescimento semelhante à insulina)
IL	Interleucina
IAP- 1	Inibidor 1 do ativador do plasminogénio
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> (fator inibidor de leucemia)
L - PRF	<i>Leucocyte- and platelet-rich fibrin</i> (fibrina rica em plaquetas e leucócitos)
L - PRP	<i>Leukocyte and platelet-rich plasma</i> (plasma rico em plaquetas e leucócitos)
MEC	Matriz extracelular
MPV	<i>Mean platelet volume</i> (volume médio das plaquetas)
MSCs	<i>Mesenchymal stem cells</i> (células estaminais mesenquimatosas)
NO	Óxido nítrico
PGI ₂	Prostaciclina
PMCA _s	<i>Plasma membrane calcium ATPases</i> (ATPase de cálcio da membrana plasmática)
pH	Potencial hidrogeniónico
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado das plaquetas)
PDF	Produtos de degradação de fibrina/fibrinogénio
PDW	<i>Platelet distribution width</i> (volume plaquetário médio)
PLT	Plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
P- PRF	<i>Pure platelet-rich fibrin</i> (fibrina rica em plaquetas pura)
P-PRP	<i>Pure platelet-rich plasma</i> (plasma rico em plaquetas puro)
QMH - RVC	Queen Mother Hospital for Small Animals - Royal Veterinary College
SERCA _s	<i>Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases</i> (ATPase de cálcio do retículo sarco/endoplasmático)
SCA	Sistema canalicular aberto
SCF	<i>Stem cell factor</i> (fator de células estaminais)

SDF – 1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i> (fator derivado da célula do estroma- 1)
SDM	Sistema de demarcação de membrana
STD	Sistema tubular denso
TGF - β	<i>Transforming growth factor beta</i> (fator de crescimento transformador beta)
TPO	Trombopoietina
TT	Tromboplastina tecidual
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)
min.	Minutos
n	Tamanho da amostra
μ L	Microlitro
μ m	Micrómetro
mol	Mole
%	Porcentagem

INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é considerado, por muitos, um meio para aplicar em lesões um número elevado de plaquetas, mas também fatores de crescimento e outras moléculas biológicas que estimulam os mecanismos de cicatrização e regeneração tecidual. A sua produção e aplicação para propósitos regenerativos em Medicina Veterinária tem vindo a aumentar. Porém, na literatura apenas foi encontrada uma referência relativa à preparação em gatos. De salientar que os gatos podem desenvolver vários problemas músculo-esqueléticos e sofrer de lesões traumáticas severas que poderiam ser suscetíveis ao tratamento com o PRP, como acontece nas outras espécies. Adicionalmente, e mais recentemente, o PRP tem vindo a ser utilizado como um biomaterial coadjuvante na cirurgia ortopédica de gatos.

Devido à grande variedade de protocolos disponíveis para a obtenção de PRP, não existe consenso quer quanto às características do PRP ideal, como à metodologia de produção mais eficiente, dificultando a definição de um protocolo padrão. Assim, torna-se imperativo entender os mecanismos precisos pelos quais o PRP poderá otimizar a reparação tecidual e como o protocolo de obtenção poderá modelar as suas características e a sua potencial eficácia terapêutica.

Com o desenvolvimento da presente dissertação do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária pretendeu-se estudar estas questões, desenvolvendo dois estudos que permitissem determinar a influência das variáveis inerentes à preparação de PRP na concentração de plaquetas em gatos. Neste documento, antes dos estudos e depois de uma breve descrição das atividades e casuística acompanhadas durante o período do estágio curricular e dos estágios extracurriculares, são apresentadas generalidades fundamentais sobre a biologia das plaquetas e das suas funções na hemostase e reparação tecidual, bem como métodos de preparação, caracterização e aplicação de PRP, com especial enfoque nos fatores que influenciam a sua obtenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE OS PERÍODOS DE ESTÁGIO

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, a autora realizou um estágio curricular na área de Medicina e Cirurgia de Animais de Companhia no Hospital Veterinário de São Bento (HVSB), em Lisboa. O estágio objetivava proporcionar uma formação ampla e diversificada na área de clínica e o desenvolvimento de um estudo de investigação que fundamentou a realização da presente Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Assim, o estágio teve dois períodos. Entre o período de 1 de Outubro de 2012 e 15 de Março de 2013, a aluna estagiária participou ativamente nos principais serviços da clínica (consulta externa, internamento e cirurgia), num calendário de rotatividade semanal e executando o horário de cada serviço e horas extra no serviço de urgências (atendimento além do horário de consultas externas, tanto durante a semana como nos dias de fim-de-semana). Durante o período de 28 de Maio a 24 de Julho de 2013, a autora desenvolveu o estudo que serviu de base para a realização da presente dissertação, como será descrito no Capítulo II.

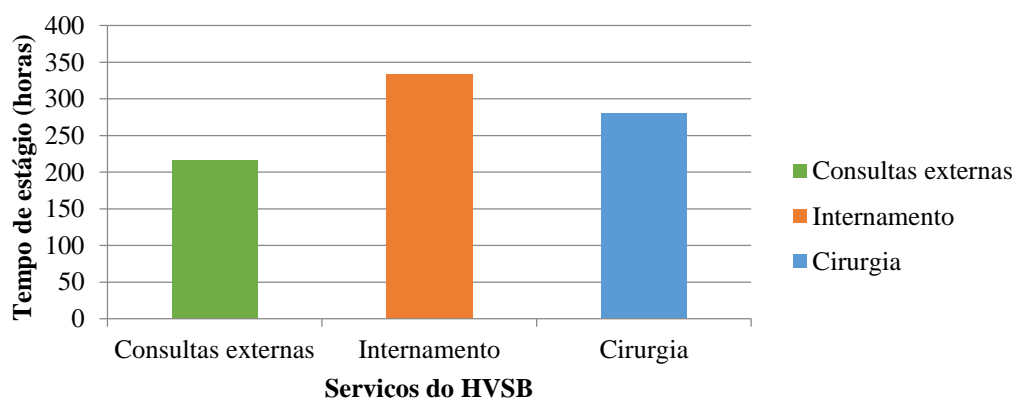
Na rotação de consulta externa, a estagiária foi convidada a assistir às consultas de medicina geral e de especialidade (tabela 21 do ANEXO I), durante o período das 10h às 20h, podendo participar na contenção dos animais, na avaliação de parâmetros do exame de estado geral, na preparação e administração de medicação e na execução de exames complementares de diagnóstico de forma independente, quando solicitada para tal. Destes destaca-se a realização e interpretação de análises hematológicas e bioquímicas, exames de diagnóstico rápido, radiografias, eletrocardiografias e ecografias. Quando possível, a estagiária conduziu as consultas de forma independente, destacando-se a discussão de planos de vacinação e desparasitação em consultas de medicina preventiva e a remoção de pontos, a desinfeção da ferida cirúrgica e a informação dos proprietários dos cuidados pós-cirúrgicos nas consultas de seguimento pós-cirúrgico.

De forma a acompanhar as atividades desempenhadas no serviço de internamento permanente do HVSB, a estagiária realizou rotações no horário das 9.30h às 20h durante os dias de semana, das 9h30 às 14h nos dias de fim-de-semana e das 22 às 8h durante os turnos noturnos. Em cada rotação, a estagiária participou de forma ativa em todas as tarefas do serviço, desde a discussão dos casos clínicos com o médico veterinário de serviço (tabela 22 do ANEXO I), à preparação e à administração da medicação, à monitorização de parâmetros clínicos dos pacientes internados, até à gestão dos respetivos cuidados básicos de higiene e de alimentação. A

estagiária tinha também sob responsabilidade o processo de internamento dos animais precedentes da consulta externa, nomeadamente a cateterização, administração de medicação e fluidos adequados, acondicionamento na jaula e, quando solicitado, a realização de exames de diagnósticos complementares, incluindo a recolha e análise de amostras. Com o avançar do estágio e o conseqüente aumento de prática, a estagiária realizou de forma autónoma tarefas de crescente responsabilidade, sendo exemplos: a colocação de sondas esofágicas, a realização de cistocentese ecoguiada, a drenagem de líquidos de derrame e a execução de protocolos de fisioterapia.

No serviço de cirurgia, foi possível acompanhar cirurgias de tecidos moles e cirurgias ortopédicas, bem como outras pequenas intervenções (tabela 23 do ANEXO I). Neste serviço, a estagiária assegurou não só acompanhamento das cirurgias, como também dos procedimentos pré e pós-cirúrgicos, entre as 10 e as 18h ou até à conclusão das cirurgias desse dia. Durante a cirurgia, a estagiária teve a oportunidade de participar como circulante, ajudante de cirurgião e anestesista, assumindo apenas função de cirurgião em intervenções simples, como a orquiectomia eletiva em gatos. Além disso, foi-lhe solicitado que, sob supervisão, realizasse a preparação pré-cirúrgica da sala e do animal, incluindo a indução anestésica e a entubação endotraqueal do animal sujeito à intervenção cirúrgica. Após a conclusão da cirurgia, a estagiária participou no acompanhamento dos animais durante o período de recobro, monitorizando sinais clínicos vitais e administrando a medicação necessária para o seu bem-estar e recuperação, além de auxiliar na manutenção das condições de higiene e esterilidade da sala e dos instrumentos cirúrgicos.

Gráfico 1. Tempo de estágio (horas) nos serviços do HVSB



Com o propósito de desenvolver competências adicionais e experienciar outra realidade relativamente à prática clínica em Animais de Companhia, após o primeiro período de estágio curricular a estagiária participou no programa de visita ao Queen Mother Hospital for Small

Animals do Royal Veterinary College (QMH - RVC), em Londres, Inglaterra. Compreendido entre 25 de março e 5 de abril, este programa permitiu o acompanhamento da atividade clínica de um hospital veterinário de referência, incidindo maioritariamente na abordagem de emergências e no tratamento dos animais internados. Durante o período de visita, a estagiária cumpriu o horário do serviço de urgências, compreendido entre as 8 e as 18 horas, alternando-o com o horário entre as 12 e as 24h do serviço de cuidados intensivos.

Além dos serviços de urgência e de cuidados intensivos, o hospital oferecia consultas de referência noutras áreas especializadas da Medicina Veterinária, nomeadamente na cardiologia, na neurologia e na imagiologia, nas quais a estagiária teve o privilégio de participar, sempre que o caso clínico tivesse sido referenciado pelos serviços em visita. Desta forma, a aluna participou ativamente na rotina de uma clínica de referência, desempenhando diversas tarefas que variaram desde a triagem de animais, à realização do exame de estado geral, à monitorização dos animais admitidos e internados, até à discussão e diagnóstico de casos clínicos com especialistas das áreas clínicas em questão.

Por fim, ao abrigo da bolsa IAESTE, foi realizado um estágio de investigação na área de produção animal que decorreu entre 7 de outubro de 2013 e 26 de janeiro de 2014, no Department für Nutztierwissenschaften Georg-August-Universität Göttingen, na Alemanha. Esta bolsa tem como objetivo preparar os estudantes para o mercado de trabalho, promovendo o desenvolvimento de competências técnicas relevantes para os seus estudos e garantindo ao mesmo tempo a oferta de estagiários qualificados aos empregadores. Uma vez que os estágios decorrem em ambiente internacional, também o enriquecimento cultural dos estagiários e das comunidades hospedeiras é um objetivo.

Durante as dezasseis semanas de estágio, a estagiária foi integrada num projeto de investigação na área da produção animal em galinhas que tinha como objetivo desenvolver métodos de diagnóstico utilizando anticorpos que permitissem a deteção precoce de estados parasitários e a melhoria do bem-estar animal. Maioritariamente, a estagiária executou técnicas de laboratório mas também tinha a responsabilidade de organizar e de interpretar os resultados obtidos nas experiências conduzidas por si, bem como apresentar relatórios diários das atividades desenvolvidas. Devido à grande componente didática deste estágio, a estagiária teve a liberdade de acompanhar e participar noutros projetos de investigação que incluíam diversas áreas, tais como a nutrição e a reprodução animal. Desta forma, além do conhecimento adquirido no estágio foi possível desenvolver conhecimentos na língua e cultura germânica.

Tabela 1. Duração dos estágios curricular e extracurriculares e número de casos observados nos estágios na área de clínica.

Estágios (curricular e extracurriculares)		
Instituição	Duração do estágio (horas)	Nº de casos clínicos
HVSB	861	379
QMH - RVC	110	22
Department für Nutztierwissenschaften	640	--

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. GENERALIDADES SOBRE AS PLAQUETAS

1.1. Estrutura das plaquetas

As plaquetas dos mamíferos são pequenos fragmentos citoplasmáticos irregulares, anucleados e incolores que circulam no sangue (Dailey, 1998; Voigt, 2000). O seu tamanho é relativamente constante entre os mamíferos (2 a 4 μm) com exceção do gato doméstico, em que é comum a ocorrência de variações significativas no tamanho das plaquetas (2 a 6 μm). Assim, o volume médio das plaquetas (MPV) dos gatos é superior, podendo atingir dimensões semelhantes às das hemácias. (Boudreaux & Ebbe, 1998; Boudreaux, Osborne, Herre, Rivera, & Spangler, 2010).

Apesar da sua pequena dimensão, as plaquetas possuem uma organização complexa, composta por uma membrana externa que limita um citoplasma rico em estruturas membranosas e organelos como o citoesqueleto, as mitocôndrias e diferentes tipos de grânulos (Boudreaux, 2010) (Fig. 1).

Figura 1. Ilustração esquemática da ultraestrutura da plaqueta.

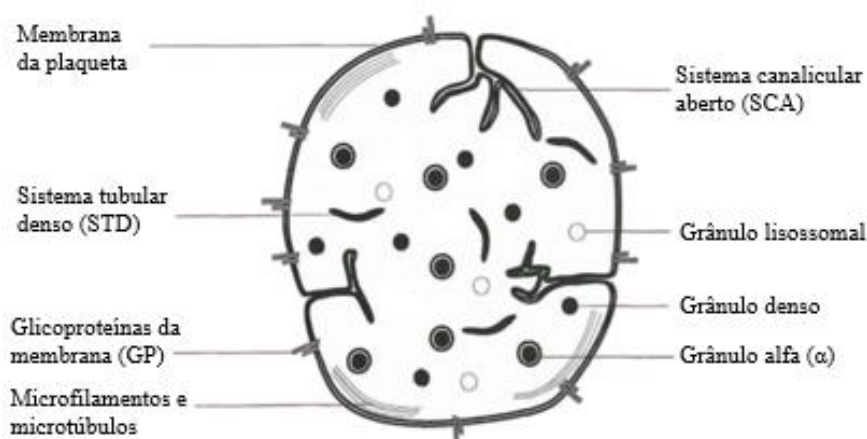


Figura adaptada de Stokol (2000).

Nos esfregaços sanguíneos, as plaquetas podem ser encontradas isoladas ou em pequenos aglomerados, o que acontece com maior propensão nos felinos após a colheita de sangue. Individualmente e quando não ativadas, apresentam uma forma discóide característica, sendo que nos felinos ocasionalmente também se podem observar formas mais alongadas; no caso de ativadas, as plaquetas apresentam extensões pseudópodes na sua superfície (Jain, 1993; Rizzi, Clinkenbeard & Meinkoth, 2010).

1.1.1. Membrana da plaqueta

À semelhança das membranas plasmáticas das células, a membrana das plaquetas é constituída por uma camada dupla fosfolipídica (Boudreaux, 2010). Os fosfolípidos da membrana estão distribuídos assimetricamente pelas camadas; sendo a camada mais externa rica em fosfolípidos de carga positiva, como a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, enquanto na camada mais interna prevalecem os fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina (FS) e a fosfatidiletanolamina. Esta distribuição é assegurada por proteínas específicas e é importante para a correta função pró coagulante das plaquetas (Boudreaux & Catalfamo, 2010; Stokol, 2000).

Intercaladas na matriz fluída lipídica existem acumulações lipídicas¹ que constituem microdomínios de membrana, ricas em colesterol e esfingolípidos. Estas intervêm na ampliação da sinalização, nas fases iniciais da ativação plaquetária e nos fenómenos de reorganização do citoesqueleto, essenciais para a retração do coágulo. Quer no interior como no exterior destas acumulações lipídicas¹ existem várias proteínas e glicoproteínas (GP) que se comportam como recetores específicos importantes na resposta plaquetária, por permitirem que as plaquetas interajam com outras células e com a matriz subendotelial (Boudreaux, 2010; Stokol, 2000).

1.1.2. Citoesqueleto e estruturas membranosas

A camada interna da membrana está em contacto com o citoesqueleto da plaqueta, constituído por um conjunto de microfilamentos e de microtúbulos. O citoesqueleto é responsável pela manutenção da forma discóide da plaqueta em repouso e permite a alteração da sua forma e exteriorização do conteúdo dos grânulos durante a reação de ativação (Stokol, 2000). A interação entre o conteúdo da plaqueta e o plasma é mantida através de dois sistemas de membrana: o sistema canalicular aberto (SCA) e o sistema tubular denso (STD).

O SCA consiste num labirinto tortuoso de canais interligados que se estende até à superfície da plaqueta, contactando diretamente com o plasma (Boudreaux, 2010; Jain, 1993). O SCA atua tanto como um canal para captar partículas, como para libertar o conteúdo dos grânulos. Ao captar partículas, como vírus ou bactérias, a plaqueta é ativada e os grânulos fundem-se com o SCA, libertando o seu conteúdo em torno das partículas captadas. Adicionalmente, durante a ativação plaquetária, o SCA é projetado até determinada extensão aumentando assim o número de recetores de superfície, muitos dos quais comuns aos da superfície da plaqueta (Boudreaux, 2010). De salientar que as plaquetas dos ruminantes e dos equinos não possuem o SCA. Nestas

¹ Tradução livre de “lipidic rafts”

espécies, a libertação do conteúdo dos grânulos é conseguida por fusão dos mesmos diretamente na membrana mais externa da plaqueta (Boudreaux, 2010)

O STD é composto por um retículo endoplasmático liso residual e, ao contrário do SCA não comunica com o plasma ou com as membranas dos grânulos (Jain, 1993; Stokol, 2000). As membranas do STD contêm cicloxigenase e tromboxano-sintase, enzimas que intervêm na síntese de prostaglandinas. O STD também sequestra ativamente cálcio através de bombas ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCAs) que estão acopladas com as bombas ATPase da membrana plasmática (PMCA) que, por sua vez libertam o cálcio para o meio extracelular. A libertação de cálcio por este sistema é essencial na ativação plaquetária e nas reações de libertação e de agregação. A energia metabólica necessária para estes eventos é fornecida pelas mitocôndrias da plaqueta (Boudreaux, 2010; Stokol, 2000).

1.1.3. Grânulos

As plaquetas possuem três tipos de grânulos de armazenamento distintos entre si, no que toca à morfologia e ao seu conteúdo: conhecem-se os grânulos alfa (α), densos e lisossomais (Boudreaux, 2010).

Os grânulos alfa são os grânulos maiores e mais numerosos. Contêm várias moléculas como as citocinas, fatores de coagulação, fatores de crescimento, entre outras proteínas que participam em distintas funções das plaquetas, tais como: na formação de coágulos, na modulação da inflamação e na síntese de matriz extracelular (MEC). As proteínas contidas nos grânulos alfa podem ter diferentes origens, podendo ser endocitadas pela plaqueta em circulação (como o fibrinogénio, a albumina e as imunoglobulinas), ou sintetizadas pelos megacariócitos. No interior destes grânulos, as proteínas estão armazenadas em dois compartimentos principais, o que poderá permitir a sua libertação diferencial durante a ativação (Boudreaux, 2010; Pereira, 2012; Stokol, 2000).

Entre as moléculas armazenadas e libertadas pelos grânulos densos encontram-se aminas vasoativas como a histamina e a serotonina, íões de cálcio e um reservatório² de adenosina (ADP e ATP). O cálcio contido nestes grânulos constitui 70% da reserva de cálcio na plaqueta e, ao contrário do cálcio contido no STD, este não é mobilizado para a ativação plaquetária (Boudreaux, 2010; Sánchez-González, Méndez-Bolaina, & Trejo-Bahena, 2012; Stokol, 2000). Os grânulos densos contêm também fosfolípidos, gangliosídeo GM3³ e diferentes categorias de proteínas (proteínas de sinalização celular, chaperonas regulatórias, proteínas do citoesqueleto,

² Tradução livre de "pool"

³ Tradução livre de "ganglioside GM3"

proteínas envolvidas na glicólise e proteínas envolvidas na função da plaqueta). Durante a ativação plaquetária, os grânulos densos fundem-se com a membrana da plaqueta expondo recetores que são comuns a outros grânulos e à membrana da plaqueta. Nos grânulos lisossomais estão armazenadas hidrólases ácido – dependentes, incluindo glicosidades, proteases e lipases (Boudreaux, 2010).

1.2. Origem das plaquetas: Megacariocitopoiese e trombocitopoiese

As plaquetas são produzidas e libertadas na corrente sanguínea por fragmentação citoplasmática das suas células precursoras, os megacariócitos. (Machlus & Italiano, 2013; Patel, Hartwig, & Italiano, 2005; Weiss & Wardrop, 2010). Os megacariócitos são células mielóides gigantes (50 – 100 μm), representando aproximadamente 0,01% das células nucleadas da medula óssea. Encontram-se principalmente na medula óssea mas podem também ser identificadas nos pulmões e no sangue periférico (Machlus & Italiano, 2013). A megacariocitopoiese tem início com a multiplicação e diferenciação de células em precursores de megacariócitos ao longo de uma linhagem cada vez mais restrita, que culmina na maturação de megacariócitos capazes de produzir plaquetas funcionais (Deutsch & Tomer, 2013) (Fig. 2). Um só megacariócito consegue gerar milhares de plaquetas através de um processo dinâmico e regulado (trombocitopoiese), que pode ser dividido em duas etapas. A primeira ocorre durante 4 a 5 dias e consiste na maturação do megacariócito. A segunda fase é relativamente curta, demorando entre 4 a 10 horas. Nesta fase, o citoplasma do megacariócito é remodelado em longos prolongamentos denominados proplaquetas que servem como “linhas de montagem” de plaquetas. A trombocitopoiese culmina com a libertação de plaquetas a partir das extremidades das proplaquetas para o sangue (Machlus & Italiano, 2013; Richardson, Shivdasani, Boers, Hartwig, & Italiano, 2005).

Figura 2. Esquema da produção de plaquetas: desde o desenvolvimento dos megacariócitos à especialização de células e liberação de plaquetas na corrente sanguínea.

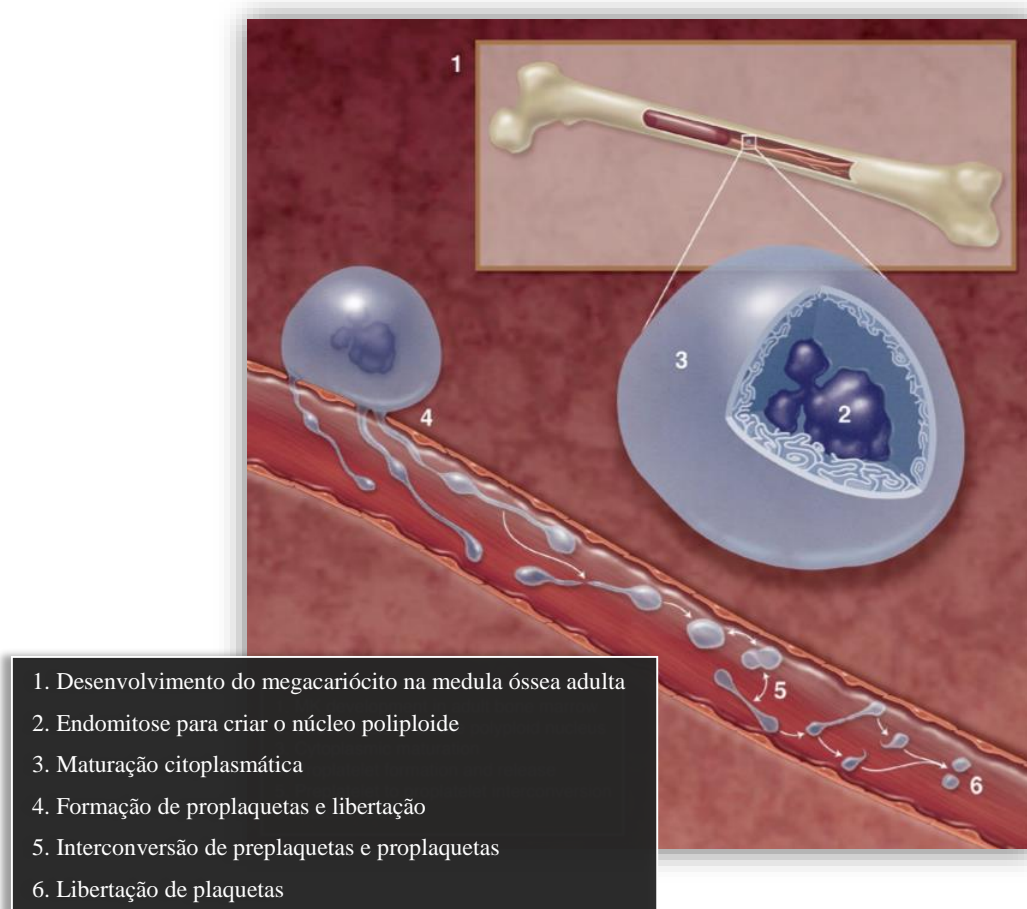


Figura adaptada de Machlus e Italiano (2013).

1.2.1. Maturação do megacariócito

Durante a fase de maturação, o megacariócito torna-se poliploide por endomitose (replicação de ADN sem divisão celular) e acumula grandes quantidades de proteínas, de grânulos específicos das plaquetas e de membrana. Consequentemente, o megacariócito aumenta de tamanho e de volume, sendo que, quanto maior a ploidia, maior o aumento de volume e, consequentemente, maior o número de plaquetas produzidas (Machlus & Italiano, 2013; Russell, 2010).

1.2.2. Diferenciação do megacariócito em proplaquetas

A remodelação do citoplasma dos megacariócitos maduros decorre num processo conduzido pelo citoesqueleto da célula (Italiano, Lecine, Shivdasani, & Hartwig, 1999; Machlus & Italiano, 2013). Inicialmente ocorre invaginação da membrana plasmática para formar o sistema de demarcação de membrana (SDM), que se associa a microtúbulos e a um complexo de

actina/miosina. A associação com os microtúbulos resulta na evaginação do SDM e na formação de extensões pseudópodes que derivam na formação de proplaquetas. Apesar da função do complexo actina/miosina ser ainda indeterminada, evidências sugerem ser importante na formação de proplaquetas e na posterior separação entre as plaquetas e as proplaquetas (Russell, 2010).

Um megacariócito pode originar cerca de 10 a 20 proplaquetas a partir de um pólo em erosão do citoplasma, formando uma saliência romba que se alonga e ramifica repetidamente para formar túbulos mais delgados (Richardson et al., 2005). Gradualmente todo o espaço citoplasmático do megacariócito é expandido e convertido em prolongamentos de proplaquetas anastomosados. Juntamente com o material citoplasmático, organelos e grânulos essenciais à função da plaqueta são condensados em partículas do tamanho de plaquetas, ao longo do comprimento das proplaquetas, adquirindo o aspeto característico de “contas” ligadas por pontes citoplasmáticas.

A maturação das proplaquetas culmina com a migração do megacariócito para o nicho vascular e penetração das proplaquetas nos vasos sanguíneos sinusais da medula, onde se separam da massa nuclear residual do megacariócito (Italiano et al., 1999). No sangue e por ação de forças hemodinâmicas, as proplaquetas dividem-se em segmentos menores ou diretamente em plaquetas individuais (Junt et al., 2007). Trabalhos recentemente desenvolvidos por Thon *et al.* (2010) adicionam um novo elemento intermediário na maturação e libertação de plaquetas, a preplaqueta. As preplaquetas são partículas maiores que as plaquetas que se conseguem converter, reversivelmente, em proplaquetas em forma de alter, através de um sistema de microtúbulos. Thon *et al.* (2010) concluem que ambas (preplaqueta e proplaqueta) contribuem para o reservatório⁴ de plaquetas maduras em circulação.

A produção de plaquetas é regulada pela sua massa total e pela trombopoietina (TPO), uma citocina secretada maioritariamente pelo fígado e, em menor quantidade, pelos rins (Russell, 2010). A diminuição da renovação de plaquetas resulta no aumento dos níveis de TPO em circulação. A TPO liga-se aos receptores c-Mpl dos precursores de megacariócitos, megacariócitos e plaquetas, induzindo uma resposta concentração - dependente que culmina com a proliferação e com o desenvolvimento das células mencionadas (Deutsch & Tomer, 2013; Stasi et al., 2010).

Embora não essenciais para a regulação da megacariocitopoiese ou trombocitopoiese, diferentes fatores de crescimento e citocinas atuam em sinergia com a TPO ou na hematopoiese

⁴ Tradução literal de “pool”.

em geral. São exemplos de estimuladores dos precursores de megacariócitos: o fator derivado da célula do estroma-1 (SDF-1), o qual se considera ser relevante na migração dos megacariócitos; as interleucinas (IL) IL-3, IL-6, IL-11, IL-12; o fator estimulador das colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); e a eritropoietina. Já a IL-1, o fator de células estaminais (SCF) e o fator inibidor de leucemia (LIF) são relevantes à trombocitopoiese.

Nos mamíferos as plaquetas circulam no sangue entre 5 a 9 dias e uma pequena percentagem destas é constantemente removida devido à sua função na manutenção da integridade endotelial. Adicionalmente, cerca de 30% da massa plaquetária circulante é sequestrada no baço onde fica retida temporariamente. As plaquetas velhas, danificadas ou não-funcionais são removidas da circulação pelos macrófagos do baço e do fígado (Dailey, 1998; Russell, 2010).

1.3. Funções das plaquetas

As plaquetas são elementos cruciais na hemostase e na reparação tecidual. Além destas funções intervêm na resposta imunitária, inflamação, trombose e metastização hematogénica (Jurk & Kehrel, 2005). A hemostase é considerada a primeira fase da reparação tecidual e, por conveniência, as funções fisiológicas das plaquetas são separadas em duas partes, descritas em seguida (Pietrzak & Eppley, 2005).

1.3.1. As plaquetas na hemostase

Quando um vaso sanguíneo é danificado, a perda de sangue é minimizada através da resposta integrada dos mecanismos que constituem a hemostase: a resposta do vaso sanguíneo à lesão, a ativação das plaquetas e a ativação da cascata de coagulação. A hemostase visa manter a integridade vascular e a fluidez sanguínea necessárias ao normal funcionamento do sangue, de forma a evitar que lesões menores, como os hematomas, se tornem fatais (McConnell, 2000b; Voigt, 2000).

Assim, as plaquetas atuam na primeira linha de defesa contra hemorragias em lesões vasculares, através da formação local de um tampão plaquetário e na sua estabilização por uma rede de fibrina (Boudreaux & Catalfamo, 2010; McConnell, 2000b).

1.3.1.1. Resposta do vaso sanguíneo à lesão

Perante uma lesão vascular ocorre uma resposta reflexa do sistema nervoso simpático que leva à vasoconstrição quase imediata do vaso lesionado. Consequentemente, o fluxo sanguíneo local diminui, criando a turbulência adequada para que se dê a adesão das plaquetas ao endotélio lesionado, diminuindo a perda de sangue (Dailey, 1998; Voigt, 2000).

O endotélio do vaso sanguíneo íntegro inibe a adesão das plaquetas funcionando como uma barreira física entre as mesmas e o subendotélio trombogénico, ao mesmo tempo que secreta substâncias que inibem a resposta plaquetária, como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂) (Stokol, 2000). A lesão do vaso sanguíneo quebra a barreira endotelial, expondo o tecido subendotelial rico em colagénio que serve de substrato para a adesão e ativação das plaquetas (McConnell, 2000b). Adicionalmente, a resposta plaquetária é ampliada pela diminuição da secreção local das substâncias que inibem as plaquetas (Baker, 2012). Contudo, a secreção destas substâncias pelo endotélio íntegro adjacente à lesão é contínua e essencial para limitar a formação do trombo (Dailey, 1998). Os eventos subjacentes à adesão e à ativação das plaquetas dependem das condições hemodinâmicas locais e da interação dos recetores de membrana das plaquetas com o colagénio ou, indiretamente, por intermédio de ligandos (Baker, 2012; Ruggeri, 2009; Stokol, 2000). A adesão direta ao colagénio ocorre em vasos de fluxo venoso com baixa pressão sanguínea, através da ligação a dois principais recetores de membrana: o GPVI e a integrina $\alpha_2\beta_1$. Em condições de fluxo arterial onde se verifique uma elevada pressão sanguínea, as plaquetas têm de diminuir a velocidade de circulação para conseguirem aderir à lesão. Nestas condições a ligação ao colagénio é inicialmente mediada pela GP plasmática fator von Willebrand (FVW) que forma uma ligação fraca e transitória entre o GP Ib – IX – V das plaquetas e o colagénio. O complexo de recetores GPII – IIIa também conhecido como integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ funciona, igualmente, como um recetor do FVW durante a fase inicial da adesão plaquetária. À medida que as plaquetas se movimentam pelo endotélio lesionado contactam com o colagénio, ao qual se ligam através da GPVI (Baker, 2012; Boudreaux, 2010; Boudreaux & Catalfamo, 2010; Jurk & Kehrel, 2005). Outros ligandos, como por exemplo a laminina e a fibronectina, também participam na fixação das plaquetas ao endotélio promovendo a adesão plaquetária e contribuindo para a sua ativação (Baker, 2012; Inoue et al., 2006).

1.3.1.2. Resposta das plaquetas – ativação plaquetária (dispersão, recrutamento e agregação)

A interação entre o colagénio e a GPVI resulta na ativação plaquetária (Inoue et al., 2006). Através deste recetor, uma onda de sinalização do interior para o exterior da plaqueta (“*inside-out signaling*”) é ativada, estimulando alterações estruturais na membrana e o desenvolvimento de pseudópodes que aumentam a sua área de superfície e permitem a adesão e agregação plaquetária (Baker, 2012; Boudreaux & Catalfamo, 2010; Stokol, 2000). As integrinas da membrana $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ aumentam assim a afinidade para os seus respetivos ligandos, colagénio

e fVW, reforçando a ligação das plaquetas ao colagénio. Adicionalmente, a integrina $\alpha_2\beta_1$ estimulada contribui para o fortalecimento da adesão plaquetária ao promover a dispersão das plaquetas pelo endotélio lesado (Boudreaux & Catalfamo, 2010; Inoue et al., 2006).

Por sua vez, os recetores estimulados transmitem uma segunda onda de sinalização para o citoplasma da plaqueta (“*outside-in signaling*”) que desencadeia a secreção de moléculas dos grânulos alfa e denso para o plasma, processo conhecido por reação de libertação. As moléculas libertadas interagem com os recetores das plaquetas mediando, segundo um feedback positivo, a agregação e o recrutamento de plaquetas, além de intervirem na ativação da cascata de coagulação e na reparação tecidual (Baker, 2012; Boudreaux & Catalfamo, 2010; Jurk & Kehrel, 2005; Pietrzak & Eppley, 2005).

O fenómeno de agregação plaquetária consiste na interligação das plaquetas que se acumulam no local da lesão através da formação de ligações entre proteínas plasmáticas (principalmente o fibrinogénio) e as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ das plaquetas adjacentes. As moléculas de ADP são um agonista importante na ativação e na agregação plaquetária, inicialmente libertadas pelo endotélio lesionado e, posteriormente, pelas plaquetas (Inoue et al., 2006; Jain, 1993; Jurk & Kehrel, 2005). A serotonina e a histamina constituem exemplos de outras moléculas que não só contribuem para a agregação das plaquetas como também são responsáveis pela manutenção da vasoconstrição originada pelo trauma. O recrutamento das plaquetas ao local da lesão é também facilitado por um potente mediador produzido na membrana das plaquetas ativadas, o tromboxano A_2 (TXA₂) (Baker, 2012; Boudreaux & Catalfamo, 2010; Voigt, 2000). Adicionalmente, o TXA₂ interage com os recetores das plaquetas em circulação estimulando a sua ativação e aumentando a libertação de ADP (Dailey, 1998). Segundo Ruggeri (2009), as plaquetas podem também recrutar diferentes tipos de leucócitos que coordenam as respostas de defesa do hospedeiro (Ruggeri, 2009).

As plaquetas recrutadas para junto da lesão agregam-se àquelas já recrutadas, de forma a formarem um tampão plaquetário que cobre o endotélio exposto (McConnell, 2000b). Pietrzak e Eppley (2005) referem que se a lesão vascular for pequena, o tampão plaquetário deverá ser suficiente para conter a perda de sangue. Contudo, se o defeito vascular for extenso, será necessária a formação de um coágulo de fibrina para estancar a hemorragia. No entanto, Jain (1993) e McConnell (2000b) descrevem que os mecanismos para atingir uma hemostase adequada dependem das dimensões do vaso lesionado; se a lesão ocorrer em capilares e vénulas, a combinação da vasoconstrição e do tampão plaquetário poderá ser suficiente; nos vasos maiores em que o fluxo e a pressão são elevados é necessária a formação do coágulo de fibrina.

1.3.1.3. Ativação da cascata de coagulação

O tampão plaquetário formado resulta de uma resposta rápida para diminuir a perda de sangue sendo, por isso, pouco estável e (dependendo da bibliografia) insuficiente para manter a integridade do vaso, no caso do defeito vascular ou do vaso ser grande. A estabilização do tampão plaquetário ocorre na sequência das reações iniciadas com o trauma e com a ativação das plaquetas. Consiste na fusão da massa plaquetária e conseqüente formação de um coágulo sólido de fibrina, através de um processo denominado coagulação ou cascata de coagulação (Jain, 1993; Pietrzak & Eppley, 2005). Uma vez que tanto a hemostase como a coagulação contribuem para a formação de um coágulo de fibrina estável e para a diminuição da perda de sangue, é - lhes também atribuída a designação de hemostase primária e hemostase secundária, respetivamente. Adicionalmente, por forma a prevenir perda de sangue adicional, a hemostase secundária assiste na reparação do revestimento endotelial do vaso (Dailey, 1998; McConnell, 2000b).

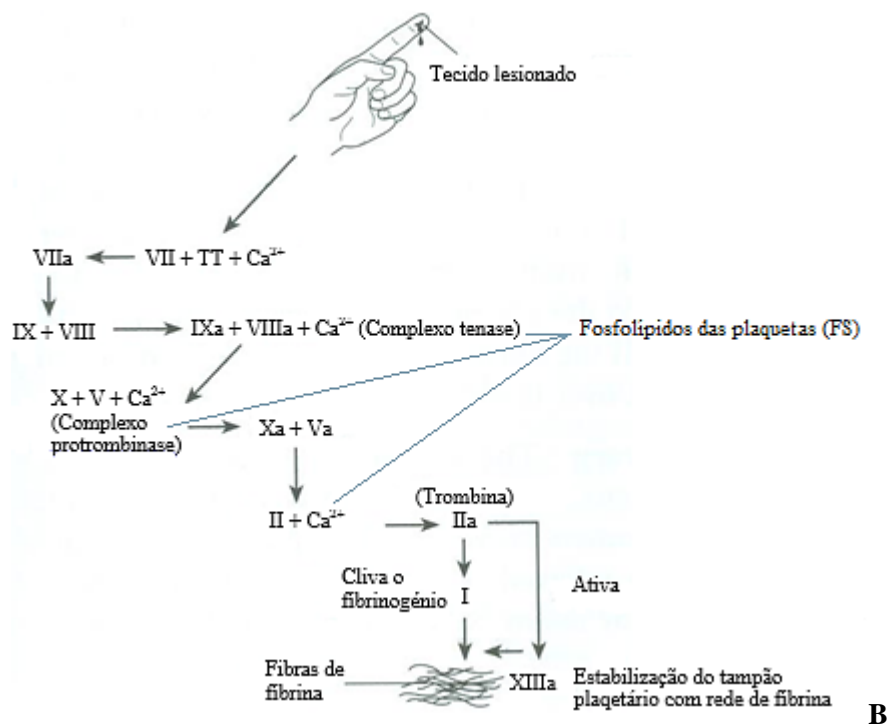
A coagulação do sangue é em muito semelhante à metamorfose que ocorre durante a solidificação da gelatina, em que a mistura inicial líquida torna-se semissólida através da reorganização das fibras proteicas devidamente ativadas (pela refrigeração). A coagulação é iniciada pela ativação de fatores de coagulação, que são proteínas que circulam no sangue na forma inativa (Jain, 1993; Voigt, 2000). A ativação inicial progride numa cascata de reações em que cada fator de coagulação é ativado para catalisar a etapa seguinte. À medida que vão sendo ativados, os fatores de coagulação são rapidamente destruídos por forma a conterem a sua ação à lesão (Stokol, 2000; Voigt, 2000).

Os produtos das reações pró coagulantes são localizados e concentrados sobre a superfície das plaquetas: durante a ativação das plaquetas ocorre uma alteração na disposição dos fosfolípidos nas camadas membranárias, especificamente da FS (anteriormente conhecida como fator plaquetário 3 - FP3 - ou atividade pró coagulante) que se movimenta para a membrana mais externa, transformando a plaqueta numa célula pró coagulante. A FS providencia uma superfície de ligação para os fatores de coagulação ativados, principalmente dos complexos tenase e protrombinase⁵, permitindo a sua ação catalítica e potenciando a propagação da cascata de coagulação (Boudreaux, 2010; Stokol, 2000; Jurk & Kehrel, 2005).

Tradicionalmente, considerou-se um esquema que dividia a cascata de coagulação em vias intrínseca, extrínseca e comum. De acordo com este esquema, o evento ativador determina a

⁵ Associados à activação do factor X e protrombina, elementos essenciais na cascata de coagulação e formação de fibrina (Boudreaux, 2010; Stokol, 2000; Jurk & Kehrel, 2005)

Figura 3. Cascata de coagulação: interação dos FC na hemostase (continuação).



A: Cascata de coagulação tradicional. B: Atual teoria sobre a coagulação. Figura adaptada de Dailey (1998) e McConnell (2000b).

A ativação inapropriada da cascata de coagulação, para além da região da lesão, é controlada pela ação de proteínas anticoagulantes que inibem as proteínas pró coagulantes da cascata de coagulação. Existe um equilíbrio entre a ação das proteínas pró coagulantes e as proteínas anticoagulantes, essencial para que não se formem coágulos inapropriados pela vasculatura (trombose) (Baker, 2012; Dailey, 1998). A principal proteína anticoagulante (70% da atividade anticoagulante) é a antitrombina (AT), anteriormente conhecida como antitrombina III. A AT inativa a trombina e outros fatores de coagulação (IXa, Xa). Outros exemplos de proteínas anticoagulantes são as proteínas C e S, responsáveis pela inibição dos fatores Va e VIII:Ca; a α_2 - Macroglobulina (α_2M) que inibe a trombina, plasmina e calicreína e o inibidor da via extrínseca que, como o nome sugere, controla a ativação da via extrínseca, inativando a tromboplastina e o fator VIIa (Baker, 2012; McConnell, 2000b).

A manutenção da integridade vascular e da perfusão tecidual resulta dum equilíbrio dinâmico entre a formação do coágulo de fibrina (cascata de coagulação) e a sua destruição (lise do coágulo ou fibrinólise). À medida que o vaso cicatriza, o coágulo de fibrina é gradualmente destruído pela plasmina, uma enzima proteolítica formada pela ativação do plasminogénio (Baker, 2012; Voigt, 2000). O plasminogénio é principalmente ativado pelo fator XII ativado e pelo ativador do plasminogénio tecidual (AP-t) das células endoteliais (Baker, 2012). O

plasminogénio é também ativado pelo fator XI, complemento e quininas e por outros ativadores como a uroquinase e estreptoquinase que, no entanto, são pouco importantes para a coagulação *in vivo*. (Baker, 2012; Dailey, 1998; McConnell, 2000b). A plasmina dissolve o coágulo degradando o fibrinogénio e a fibrina entrecruzada em pequenos produtos de degradação de fibrina/fibrinogénio (PDF) (Baker, 2012). O coágulo é completamente removido quando o vaso cicatriza (Voigt, 2000), sendo a fibrinólise controlada por inibidores plasmáticos presentes no plasma que inativam diretamente a produção de plasmina (α 2M e inibidor da α 2-Plasmina - α 2 - PI) ou, indiretamente, através da inibição dos ativadores de plasminogénio (inibidor-1 do ativador do plasminogénio -IAP- 1) (Dailey, 1998; McConnell, 2000b).

1.3.2. As plaquetas na reparação de tecido

A reparação dos tecidos é um processo complexo composto por três fases principais que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelação. A primeira resposta à lesão é a inflamação, através da qual é desencadeada uma resposta hemostática rápida e iniciada a sequência de eventos que conduzem à reparação celular. À medida que o sangue flui do vaso lesionado é criado um coágulo com plaquetas que, desempenham funções fulcrais na reparação tecidular; durante a ativação plaquetária libertam dos grânulos alfa várias proteínas bioativas que direta ou indiretamente controlam o processo de reparação, e no final da hemostase promovem a retração do coágulo através do encurtamento de fibras proteicas e microtúbulos da membrana. A retração do coágulo permite a aproximação das bordas da lesão e a diminuição do defeito vascular, facilitando a reparação do vaso (Dailey, 1998; Pietrzak & Eppley, 2005; Voigt, 2000). Muitos autores associam a capacidade reparadora das plaquetas à libertação de proteínas específicas, os fatores de crescimento (FC) (De La Mata, 2013; Freymiller & Aghaloo, 2004; Klein, Wagner & Silva, 2011). À medida que as plaquetas são ativadas, os grânulos alfa fundem-se com a membrana celular completando a ativação bioativa da maioria dos FC. (Marx et al., 1998) . Este fato reflete a importância da viabilidade das plaquetas, pois plaquetas danificadas poderão libertar FC cuja bioatividade está comprometida (Pietrzak & Eppley, 2005). Os FC libertados e ativos ligam-se a recetores transmembranares de células com capacidades regenerativas, tais como células estaminais mesenquimatosas (MSCs), osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e epidermais. Esta interação resulta na expressão de uma sequência genética normal e consequente produção de proteínas que promovem e modulam uma grande variedade de funções celulares (quimiotaxia, angiogénese, proliferação e diferenciação celular e formação de MEC) integrantes das distintas fases reparação de tecidos (Marx, 2004; Vendruscolo, Watanabe, Maia, Carvalho, & Alves, 2012b).

Durante a fase inflamatória os FC mobilizam leucócitos em circulação para a lesão de forma a estabelecer uma linha de defesa rápida contra infecções e remover detritos celulares. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a invadir a lesão, seguidos de um influxo de linfócitos T e monócitos. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos que passam a ser os leucócitos predominantes. Estes assistem os neutrófilos na sua função e após a morte das plaquetas assumem o controlo da reparação tecidual através da secreção de fatores (De La Mata, 2013; Pietrzak & Eppley, 2005).

A rede de fibrina que compõe o coágulo sanguíneo providencia uma matriz provisória que facilita a migração de fibroblastos e MSCs à lesão. Simultaneamente, permite a libertação lenta de FC enquanto expõe outros mediadores biológicos, que durante a fase proliferativa regulam a proliferação e diferenciação de quase todo o tipo de células mesenquimatosas (como osteoblastos, fibroblastos ou condrócitos) e de MSCs nas necessárias para criar o tipo de tecido apropriado (De La Mata, 2013; Pietrzak & Eppley, 2005; Sánchez-González et al., 2012). As células endoteliais dos vasos sanguíneos iniciam a angiogénese, os osteoblastos promovem a osteossíntese e os fibroblastos produzem MEC. Por fim, o tecido lesionado necrótico é removido e substituído por tecido vivo específico, de acordo com o tecido local envolvente (Pietrzak & Eppley, 2005; Sánchez-González et al., 2012).

Na fase de remodelação, o tecido recém-formado é reorganizado para se assemelhar ao tecido original através de um processo que se prolonga ao longo dos anos. Os FC intervêm na fase final da remodelação, facilitando a maturação de colagénio recém-formado e a apoptose de células em excesso (De La Mata, 2013; Pietrzak & Eppley, 2005).

A totalidade das funções dos FC é ainda desconhecida. No entanto, é reconhecido que a atuação sinérgica dos vários FC é necessária para a regulação da reparação tecidual e, é concebível que cada um se destaque individualmente, dependendo do tipo de lesão (ratura, inflamação, degeneração, etc.) e do tecido (tendão, músculo, osso, etc.) (De La Mata, 2013; Foster, Puskas, Mandelbaum, Gerhardt, & Rodeo, 2009). Na tabela 2 estão descritos os principais FC referenciados na literatura e respetivas funções na reparação de tecidos.

É importante referir que existem outras moléculas libertadas pelos grânulos alfa, como as citocinas que também participam na regulação de vários processos da reparação tecidual, através da ligação a recetores transmembranares de células locais ou circulantes (Wroblewski, Mejia, & Wright, 2010); estimulam a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, a síntese e degradação de proteínas da MEC, a quimiotaxia de fibroblastos e a regulação da resposta imunitária (Werner & Grose, 2003). Os grânulos densos das plaquetas também contêm moléculas importantes nas diferentes fases da reparação tecidual, nomeadamente, a histamina,

serotonina, adenosina e cálcio, cuja atuação sinérgica exibe efeitos na modulação da resposta inflamatória e no aumento da permeabilidade vascular, o que permite maior afluxo de células inflamatórias e de células do sistema imunitário à lesão (Wroblewski et al., 2010).

Tabela 2. Principais FC contidos nos grânulos alfa das plaquetas e respectivas funções.

Fator de crescimento	Função
Fator de crescimento transformador beta (TGF-β)	Estimula a proliferação de MSCs Controla a síntese e secreção de colagénio Controla o efeito mitogénico de outros FC Estimula a quimiotaxia de células endoteliais e a angiogénese Inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos
Fator de crescimento fibroblástico (FGF)	Promove o crescimento e diferenciação de osteoblastos e condrócitos Mitogénico para células mesenquimatosas, osteoblastos e condrócitos
Fatores de crescimento derivados da plaqueta a e b (PDGF)	Mitogénico para células mesenquimatosas, osteoblastos e fibroblastos Estimula a quimiotaxia de fibroblastos, células da glia ou do músculo liso, macrófagos e neutrófilos Controla a síntese e secreção de colagénio
Fator de crescimento epitelial (ou epidérmico) (EGF)	Estimula a quimiotaxia de células endoteliais e a angiogénese Controla a secreção de colagénio Estimula a mitogénese de células epiteliais e mesenquimatosas
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Aumenta a angiogénese e aumenta a permeabilidade vascular Estimula a mitogénese de células endoteliais
Fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF)	Promove a angiogénese, a regeneração de cartilagem, fibrose e a adesão de plaquetas
Fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF -II)	Quimiotático para fibroblastos e estimula a síntese de proteínas Fomenta a formação de osso

Tabela adaptada de Dhillon, Schwarz e Maloney (2012).

2. GENERALIDADES SOBRE O PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

2.1.História: do desenvolvimento à aplicação atual do PRP

A bioterapia é uma ciência relativamente recente que recorre a materiais naturais encontrados em fontes biológicas. O reconhecimento da participação de diversos componentes do sangue no processo natural de cicatrização conduziu assim ao desenvolvimento de produtos derivados do mesmo, sobretudo no sentido de controlar a inflamação e acelerar a cicatrização de lesões ou feridas cirúrgicas (Prakash & Thakur, 2011; Sánchez-González et al., 2012).

Os selantes de fibrina, também denominados “colas de fibrina” ou adesivos tecidulares de fibrina (Prakash & Thakur, 2011), foram os primeiros produtos hemoderivados descritos (1970) e consistem em fibrinogénio concentrado (após polimerização induzida por trombina ou cálcio) que mimetiza a formação do coágulo de fibrina obtido na fase final da hemostase (Matras, 1970, citado por Ehrenfest, Rasmusson, & Albrektsson, 2009). Inicialmente produzidos a partir de plasma de dadores, os selantes de fibrina tornaram-se amplamente utilizados como hemostáticos tópicos, selantes de tecidos e como agentes para a fixação de determinados enxertos ósseos (Matras, 1982, citado por Pereira, 2012). Por forma a diminuir o risco de contaminação cruzada, os selantes de fibrina passaram a ser preparados a partir de plasma do próprio paciente (autólogo) (Tabélé et al., 2012), no entanto, o custo e a complexidade da preparação tornaram a sua produção menos reprodutível, limitando a sua utilização (Sunitha Raja & Munirathnam Naidu, 2008). Consequentemente, através da modificação dos selantes de fibrina são desenvolvidos concentrados de plaquetas, generalizadamente denominados PRP. O PRP alia as propriedades das plaquetas e da fibrina permitindo desenvolver um sistema de entrega ideal de FC à lesão e estimular a cicatrização.

Originalmente, o PRP resultava de um método aplicado na Medicina Transfusional que separava os glóbulos vermelhos e plasma do sangue total (Flatow & Freireich, 1966), sendo usado para prevenir e tratar hemorragias associadas a cirurgias e a alterações trombocitopénicas (Boldt et al., 1990). A aplicação terapêutica para acelerar a cicatrização e a regeneração de tecidos foi introduzida por Whitman, Berry e Green (1997) na área da cirurgia oral e maxilofacial. Apesar da controvérsia em torno da sua eficácia, a mediatização do sucesso terapêutico em atletas de alta competição e o crescimento das suas indicações clínicas têm favorecido a aceitação da aplicação de PRP (De La Mata, 2013; Dhillon et al., 2012). Atualmente as suas aplicações terapêuticas abrangem diferentes áreas da medicina, incluindo: oftalmologia (Alio, Arnalich-Montiel, & Rodriguez, 2012; Gimeno, Gatto, Ferro, Croxatto, & Gallo, 2006), reumatologia (De La Mata, 2013), cirurgia ortopédica (Gandhi et al., 2006),

cirurgia cardiovascular (Okamura, Koh, & Yokoyama, 2001), cosmética (Man, Plosker, & Winland-Brown, 2001), cirurgia oral e maxilofacial (Marx et al., 1998; Suvarna, Sahoo, Gupta & Kuma, 2013), cirurgia plástica (Eppley, Pietrzak, & Blanton, 2006) e medicina desportiva (Foster et al., 2009).

Em Medicina Veterinária, a aplicação clínica de PRP é mais recente e tem sido focada na clínica e cirurgia de Equinos, nomeadamente, no tratamento regenerativo de doenças músculo-esqueléticas e de lesões cutâneas (Silva et al., 2012b; Vendruscolo et al., 2012b). Diferentes ensaios clínicos em animais aplicam o PRP como uma substância coadjuvante (sozinho ou em combinação com materiais) em diferentes situações clínicas, tais como a regeneração e a integração óssea em coelhos e em porcos miniatura (Aghaloo, Moy, & Freymiller, 2002; Pieri et al., 2009), transplantes da córnea em coelhos (Gimeno et al., 2006) e transplantes de flaps cutâneos em cães (Cavalcanti, 2010). Na literatura revista foram encontrados vários estudos relativamente a protocolos para a preparação de PRP em diferentes espécies (Nagata et al., 2010; Perazzi et al., 2013; Vendruscolo et al., 2012b). Porém, tal como Silva *et al.* (2012b) referem, não estão disponíveis na literatura protocolos de métodos manuais para a preparação de PRP em gatos, além do descrito pelo autor. Por outro lado, embora variados estudos tenham sido realizados em animais, a falta de standardização dos ensaios clínicos e os resultados controversos refletem a necessidade de realizar mais experiências nas diferentes espécies para otimizar e legitimizar a aplicação do PRP (Pereira, 2012; Smith, Gassmann & Campbell, 2007).

2.2. PRP, o que é?

Como o próprio nome indica, o PRP deve o seu interesse terapêutico ao papel biológico das plaquetas na cicatrização de feridas e no processo de reparação tecidual. Este papel não está estritamente relacionado com a capacidade reparadora das próprias plaquetas mas sobretudo com os FC libertados dos seus grânulos alfa que possuem múltiplas propriedades regenerativas (De La Mata, 2013).

O princípio do tratamento com PRP assenta na inversão do rácio hemácias/plaquetas (diminuindo o conteúdo de hemácias a 5% por serem menos importantes no processo de cicatrização) e, sobretudo, na concentração de plaquetas num pequeno volume de plasma autólogo, aumentando a concentração de FC até 94% (Dhillon et al., 2012). Uma vez que existe uma relação proporcional entre a concentração de plaquetas e a concentração de FC, é expectável que o número de plaquetas no coágulo determine a rapidez da cicatrização. O PRP aumenta o número de plaquetas e logo os FC junto à lesão (Marx, 2004; Vendramin et al., 2009). *In vitro*, existe uma relação dose-resposta entre a concentração de plaquetas e a

proliferação/diferenciação de MSCs e de fibroblastos (Haynesworth, Kadiyala, Liang & Bruder, 2002; Liu, Kalén, Risto & Wahlström, 2012, citados por Marx, 2004). No entanto, o intervalo ótimo de plaquetas no PRP para atingir fins terapêuticos está ainda por estabelecer. Nos vários trabalhos consultados, poucos autores estão de acordo com a concentração ideal de plaquetas, propondo concentrações plaquetárias abaixo das quais o número de plaquetas poderá ser subótimo (Pietrzak & Eppley, 2005). Em Medicina Veterinária, existem relatos de diferentes concentrações de plaquetas no PRP nas diferentes espécies, o que dificulta a definição da concentração ótima (Maia & Souza, 2009).

Estudos experimentais *in vitro*, em osso e tecido mole, revelaram efeitos biológicos vantajosos (proliferação e diferenciação celular) quando a aplicação de PRP continha aproximadamente 1 milhão de plaquetas/ μ l (Haynesworth et al., 2002; Weibrich, Hansen, Kleis, Buch, & Hitzler, 2004). Uma vez que a concentração de plaquetas em indivíduos saudáveis varia entre 150.000 a 350.000 no sangue (média 200.000 ± 75.000 plaquetas/ μ l), 1 milhão de plaquetas corresponde a um aumento de 4 a 5 vezes acima do nível fisiológico (Marx, 2001; Marx, 2004). Já outros autores constataram que concentrações de plaquetas menores (2.5 superiores aos níveis sanguíneos) são suficientes para estimular a proliferação de fibroblastos *in vitro* (de Mos et al., 2008; Graziani et al., 2006).

Nos seus trabalhos, Haynesworth *et al.* (2002) e Graziani *et al.* (2006) observaram adicionalmente que a relação dose-resposta não é linear para a maioria dos FC. Atingido determinado nível, o aumento da concentração de FC não reflete efeitos adicionais, pois os recetores celulares para determinados FC estão ocupados na totalidade (Arnoczky, Delos, & Rodeo, 2011; Marx, 2001). Alcançada uma concentração suficientemente elevada poderão inclusivamente exercer efeitos inibitórios nas funções celulares, devido à dessensibilização ou inibição retrógrada dos recetores ou à indução da apoptose celular (DeLong, Russell, & Mazzocca, 2012).

Noutro estudo recente foi observada a diminuição da expressão de recetores para FC em fibroblastos em função da idade, indicando que não é apenas a concentração de FC que dita a resposta celular, mas também a capacidade das células alvo usarem estes FC (Vavken, Saad, & Murray, 2010). Porque a relação dose-resposta depende igualmente dos FC e do tipo celular, a concentração precisa de plaquetas necessária para otimizar a miríade de células envolvidas na reparação tecidual *in vivo* não é clara (Arnoczky et al., 2011). No entanto, é possível que os diferentes resultados possam também ser explicados pela insuficiente informação e pelas variações entre os protocolos dos estudos experimentais (como o conteúdo de leucócitos e de

fibrina nas preparações, espécies e sensibilidade aos FC individuais) (Arnoczky et al., 2011; Ehrenfest et al., 2009).

No entanto, porque as plaquetas estão suspensas em plasma, o PRP é mais do que apenas um concentrado de plaquetas; para além de células sanguíneas, o plasma contém proteínas envolvidas no mecanismo de coagulação, bem como outras moléculas bioativas que desempenham funções importantes na reparação dos tecidos (Arnoczky et al., 2011).

O efeito da concentração de leucócitos na eficácia do PRP não é ainda completamente conhecido e logo, os potenciais benefícios e desvantagens da sua inclusão nas preparações de PRP têm sido controversamente debatidos (Arnoczky et al., 2011). Alguns autores consideram que a preparação de PRP beneficia a nível terapêutico se contiver estas células, pois estas aumentam a concentração de FC no PRP, intervêm na regulação imunitária e possuem efeitos antimicrobianos (McLellan & Plevin, 2011). Ehrenfest *et al.* (2009) referem que a aplicação de PRP com leucócitos não parece induzir efeitos negativos ou prejudicar os potenciais efeitos benéficos do PRP, e que pelo contrário, contribuirá significativamente para diminuir as necessidades analgésicas dos pacientes e para potenciar a recuperação funcional. Apesar destes resultados, outros autores recomendam a eliminação de leucócitos das preparações de PRP porque estas células libertam mediadores pró-inflamatórios que podem exacerbar a lesão inicial, tais como citocinas, metaloproteinases ou radicais de oxigénio (McLellan & Plevin, 2011). Consequentemente, existe a preocupação de que os leucócitos possam inibir a cicatrização em determinados tecidos e/ou em certas fases da recuperação (Arnoczky et al., 2011). Para além disto, alguns autores sugerem que o PRP rico em leucócitos poderá provocar mais dor local que as preparações puras de PRP (Mei-Dan, Mann, & Maffulli, 2010, citado por Arnoczky et al., 2011).

Não existem portanto evidências conclusivas acerca da inclusão ou exclusão de leucócitos no PRP (McLellan & Plevin, 2011). Porém é possível que um efeito negativo ou positivo não possa ser generalizado para todos os tecidos e todas as condições clínicas, e que as preparações puras de PRP sejam mais benéficas em determinadas situações enquanto preparações PRP com leucócitos são mais benéficas para outras (Arnoczky et al., 2011).

As proteínas do plasma, muitas das quais também encontradas nas plaquetas, são reconhecidas como elementos críticos no mecanismo de reparação tecidual. São exemplos a fibrina, a fibronectina e a vitronectina, proteínas que atuam como moléculas de adesão celular em processos como a osteocondução e servem como matriz para a migração epitelial, a formação óssea e a de tecido conjuntivo (Arnoczky et al., 2011; Foster et al., 2009; Robert E Marx, 2004). Citocinas pró-inflamatórias atuam juntamente com os FC para desempenhar funções

importantes na regulação da reparação tecidular (Sánchez-González et al., 2012). O próprio coágulo obtido no PRP participa na reparação tecidular atuando como barreira contra microorganismos invasores e como matriz condutora, na qual as células podem aderir e desempenhar funções no processo de reparação tecidular (Foster et al., 2009; Werner & Grose, 2003). Em suma, o PRP assemelha-se a um coágulo de sangue, passível de ser identificado numa ferida comum, mas contendo um número maior de plaquetas e FC, potenciando a natural capacidade de reparação e de regeneração do organismo (Dhillon et al., 2012; Marx, 2001).

2.3.Potencial e limitações terapêuticas

A maioria das publicações relatam uma melhoria significativa da cicatrização do osso e/ou do tecido mole quando o PRP é usado (Camargo et al., 2002; Man et al., 2001; Marx et al., 1998; Marx, 2004). Não obstante, existem também publicações que concluem haver pouco ou nenhum benefício na utilização do PRP (Aghaloo et al., 2002; Froum, Wallace, Tarnow, & Cho, 2002; Shanaman, Filstein, & Danesh-Meyer, 2001). No trabalho “Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use” de Marx (2004) são comparados trabalhos com resultados controversos e conclui-se que os estudos que sugerem poucos benefícios no uso de PRP frequentemente usam técnicas inadequadas, não sendo possível retirar conclusões válidas.

Porque o PRP não é osteoindutivo, isto é, não possui proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs⁷), o valor do PRP está maioritariamente relacionado com a melhoria da cicatrização de tecidos moles. Todavia, os FC estimulam a diferenciação de MSCs e de células da sua linhagem em células osteogênicas, acelerando a formação de osso (Marx, 2004). Consequentemente, Marx (2001) acredita que não são esperados benefícios provenientes da associação de PRP com substitutos ósseos ou com outros enxertos não celulares. Porém, trabalhos sobre a associação de PRP a osso bovino inorgânico (Bio-Oss; Osteohealth, Shirley, NY) mostraram, mais uma vez, resultados contraditórios. Atualmente o PRP tem aplicação clínica quando associado a enxertos ósseos totalmente autólogos, a misturas de enxertos ósseos (com uma variedade de substitutos ósseos e um mínimo de 20% de osso autólogo) e a fatores de crescimento recombinantes, como BMP recombinantes. O PRP permite também a aplicação precoce de implantes, facilita a manipulação de enxertos ósseos ao atuar como adesivo e beneficia a osteointegração quando aplicado num osso comprometido, como um osso osteoporótico ou um osso após tratamento de radioterapia (Arnoczky et al., 2011; Freymiller & Aghaloo, 2004;

⁷ As proteínas ósseas morfogenéticas são até então, as únicas usadas para induzir neoformação óssea.

Marx, 2001). Além disto, o fato do PRP melhorar a cicatrização dos tecidos moles que envolvem os defeitos ósseos, sustenta uma reparação do osso mais rápida, pois possibilita uma melhor cobertura do microambiente ósseo em cicatrização (Pardo, Sacco, Surian & Landim - Alvarenga, 2012).

A administração conjunta de PRP e de outros fatores biológicos tem sido explorada com o intuito de amplificar o seu poder regenerativo. Apesar de ser um conceito relativamente recente, a estratégia é apelativa pelo fato da matriz regenerativa resultante entregar uma potente trilogia de células regenerativas, matriz de fibrina e FC (Sánchez-González et al., 2012). A aplicação concomitante de MCSs derivadas do tecido adiposo (ASC) e da medula óssea (BMSC) é considerada uma das terapias mais promissoras. Trabalhos experimentais comprovam as potencialidades terapêuticas desta terapia no tratamento de lesões ósseas, tendinosas e articulares e na cirurgia reconstrutiva de tecidos moles (Coppi, 2012; Gentile et al., 2012b; Pham et al., 2013; Pieri et al., 2009). Outras possibilidades incluem a adição de fatores à terapia combinada de PRP e MSCs, tais como a fluorhidroxiapatita e a insulina recombinante, aplicados respetivamente para promover a regeneração óssea e a integração de transplantes de tecido adiposo (Gentile et al., 2012a; Pieri et al., 2009). Gimeno *et al.* (2006) referem ainda a aplicação do PRP como vetor de substâncias químicas, tais como agentes antiangiogénicos.

2.4.Segurança

Teoricamente, porque o PRP é desenvolvido a partir de sangue autólogo, os riscos associados à transmissão de doenças e ao desenvolvimento de reações imunológicas ou de cancro são mínimos (Everts et al., 2006). Adicionalmente, o PRP é considerado seguro com base na sua aplicação clínica pioneira na área da cirurgia maxilofacial durante anos e na sua crescente aplicação com raros efeitos adversos relatados. Quando injetado, à semelhança de qualquer injeção, acarreta algum risco implícito (morbilidade do local de injeção, infeção ou lesão de nervos ou vasos sanguíneos), sendo raros os casos relatados de reações inflamatórias no local de injeção, calcificação ou de formação de tecido cicatricial (De La Mata, 2013; Dhillon et al., 2012). Não obstante, De La Mata (2013) salienta o facto de tolerância terapêutica não implicar segurança terapêutica e aponta a inexistência de estudos neste âmbito.

Alguns autores sugerem empiricamente que o PRP poderá favorecer infeções, pois é um coágulo de sangue e nos laboratórios de microbiologia é usado agar sangue no cultivo de bactérias. Todavia esta lógica é invalidada pelo facto da composição do PRP não diferir relativamente ao coágulo sanguíneo que se forma nas feridas e, por isso, não promover o desenvolvimento de infeção bacteriana mais que qualquer outro coágulo. O PRP tem um pH

que varia entre 6.5 e 6.7 em comparação com o pH de 7 a 7.2 do coágulo sanguíneo maduro (Marx, 2004). Trabalhos recentes propõem que o PRP poderá mostrar relevantes efeitos antimicrobianos (Bielecki et al., 2007; Drago, Bortolin, Vassena, Taschieri, & Del Fabbro, 2013). No trabalho realizado por Marx (2004), em que são comparados enxertos ósseos e feridas cutâneas semelhantes com e sem PRP, o autor aborda esta questão e descreve que no seu estudo não se observou o desenvolvimento ou inibição de infecção.

Como os FC promovem múltiplas funções celulares que estimulam a proliferação celular, existe também a preocupação de que o PRP possa ser carcinogénico (Everts et al., 2006; Marx, 2001). A capacidade de geração e de perpetuação de tumores está associada ao potencial angiogénico de determinados FC (VEGF, bFGF, HGF e IGF) ou mesmo à capacidade intrínseca oncogénica de outros. Recentemente, foi demonstrado que determinados FC favorecem a proliferação ou ativação (*in situ* e perifericamente) das “células COP”⁸. Perante estes factos, parece razoável que a sobre exposição celular ao PRP possa limitar a diferenciação das células em linhas apropriadas. Contudo, estas reflexões são meras especulações, pois estas propriedades estão apenas descritas em animais de experimentação e, até ao momento, não existe qualquer associação à utilização de PRP em Humanos com a transformação cancerígena (De La Mata, 2013; Foster et al., 2009).

Efetivamente, uma vez que os FC não atuam a nível nuclear mas na membrana citoplasmática da célula, estes não alteram a expressão génica. Por este motivo, Marx (2001) considera que os FC não são mutagénicos e que o PRP é incapaz de induzir a formação de tumores. Pelo contrário, os FC do PRP são comuns proteínas do organismo que atuam no processo normal de cicatrização, mas mais rapidamente.

3. PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

3.1. Como se obtém?

O PRP pode resultar de diferentes protocolos que almejam concentrar o maior número possível de plaquetas viáveis num pequeno volume de plasma (Pereira et al., 2013). Na literatura, os protocolos estão agrupados em diferentes métodos que caracterizam as técnicas de obtenção do PRP. Vendruscolo *et al.* (2012b) descrevem métodos automáticos (aférese), semiautomáticos

⁸ “Células COP”⁸ ou precursoras osteogénicas circulantes são células indiferenciadas osteo-condro-progenitoras envolvidas na formação de osso extra esquelético

(centrifugação) e manuais (coagulação no tubo) enquanto Ehrenfest *et al.* (2009) referem-se apenas a métodos automáticos (aférese) e manuais (centrifugação).

Os métodos descritos variam entre si quanto ao custo, facilidade de preparação, volume de sangue necessário e concentração de plaquetas obtida. Uma vez que a concentração ótima de plaquetas no PRP continua por definir, não existem evidências que estabeleçam a superioridade de um protocolo relativamente a outro (Foster *et al.*, 2009). O método de aférese é dispendioso pois requer equipamento específico e pessoal qualificado no manuseamento do material. Comparativamente aos demais métodos, este necessita de um elevado volume de sangue (>450ml), porém é eficiente na concentração plaquetária e obtém um volume maior de PRP (Pereira, 2012; Vendruscolo *et al.*, 2012b). A maior vantagem deste método baseia-se na diminuição da ocorrência de contaminação bacteriana. Apesar disso, os fatores apontados acima limitam a sua utilização a institutos de transfusão de sangue e hospitais em Humanos, não sendo conveniente o seu uso em ambiente de clínicas pequenas (Pereira, 2012).

O método de centrifugação possui algumas vantagens relativamente aos outros métodos descritos; utilizando-se um pequeno volume de sangue, consegue-se obter uma concentração de plaquetas superior. Para a sua execução, este método requer algum investimento na aquisição de uma centrifugadora e na otimização do procedimento. Relativamente ao método de colheita em tubo, o risco de contaminação da preparação é menor, podendo ser facilmente usado em pequenas clínicas (Pereira, 2012; Vendramin *et al.*, 2009; Vendruscolo *et al.*, 2012b). É, no entanto, um método trabalhoso e sujeito a erros de preparação por parte de quem realiza o procedimento, prejudicando a qualidade do PRP (Vendramin *et al.*, 2009).

O método dos tubos constitui a técnica mais simples e com menor custo associado, pois contrariamente à aférese pode ser realizada em ambiente laboratorial, necessitando apenas de um pequeno volume de sangue. Contudo, e comparativamente aos restantes métodos, concentra menos plaquetas e exige que a preparação do produto seja rigorosamente asséptica, uma vez que é um método mais suscetível à contaminação bacteriana, especialmente se a preparação do produto envolver várias fases e, conseqüentemente, maior manipulação pelo operador (McLellan & Plevin, 2011; Pereira, 2012).

Os protocolos disponíveis podem ser divididos em três fases (colheita do sangue, preparação e aplicação na lesão), nas quais coincidem em alguns pontos (Ehrenfest *et al.*, 2009). Os protocolos desenvolvidos em Humanos têm sido adaptados para a produção de PRP em animais (Maia & Souza, 2009). Uma vez que na literatura consultada os métodos de centrifugação manual são os mais utilizados em Medicina Veterinária (Nagata *et al.*, 2010; Perazzi *et al.*,

2013; Silva, Álvarez, et al., 2012; Vendruscolo et al., 2012b), a descrição das fases que se segue tem por base este método de produção de PRP.

3.1.1. Colheita

A colheita do sangue autólogo é o primeiro passo para a preparação de PRP e pode ser realizada imediatamente antes ou durante a intervenção cirúrgica (Ehrenfest et al., 2009). O PRP é beneficiado se a colheita ocorrer o mais próximo possível do início da cirurgia, pois as plaquetas irão acumulando-se no local da intervenção para iniciar a coagulação e a cicatrização e, de alguma forma, a sua contagem no sangue diminui. Além disso, durante a cirurgia os fluidos intravenosos vão diluir o sangue, reduzindo ainda mais o número de plaquetas por volume (Marx, 2001). Na maioria dos protocolos, o sangue venoso é colhido na presença de um anticoagulante que previne o início da cascata de coagulação (Arnoczky et al., 2011; Prakash & Thakur, 2011). No protocolo mais recentemente desenvolvido (o protocolo de fibrina rica em plaquetas (PRF) de Choukroun), o sangue é colhido sem qualquer anticoagulante e, conseqüentemente, o processo de coagulação é despoletado, formando um coágulo com uma densa rede de fibrina (Choukroun et al, 2001, citado por Dohan et al., 2006).

3.1.2. Preparação

Após a colheita, o sangue é imediatamente processado para concentrar as plaquetas (Ehrenfest et al., 2009). A separação seletiva dos componentes sólidos e líquidos do sangue é fundamentada na lei de Stoke's. Este princípio físico descreve que quando sob a ação de forças gravitacionais, a velocidade de sedimentação das partículas em ambiente líquido será aproximadamente proporcional ao seu diâmetro. Logo, quando sujeitas a uma força gravitacional, as plaquetas (aproximadamente 2 μm de diâmetro) sedimentam proporcionalmente mais lentamente que as hemácias (aproximadamente 7 μm de diâmetro) ou que os leucócitos (7-15 μm de diâmetro). Este fenômeno permite assim que, através de uma ou duas centrifugações, as plaquetas permaneçam seletivamente suspensas na componente líquida do sangue (plasma), enquanto outras partículas sólidas (hemácias e leucócitos) sedimentam mais rapidamente, separando-se as plaquetas por ação da gravidade (Arnoczky et al., 2011; Foster et al., 2009). Alguns autores consideram necessária apenas uma centrifugação para concentrar plaquetas (Silva et al., 2012b), enquanto outros defendem ser necessário um protocolo com duas centrifugações (Marx, 2001).

A primeira centrifugação (“rotação branda”⁹) é lenta para evitar que as plaquetas se depositem no fundo do tubo, dividindo o sangue em três camadas de acordo com o gradiente de densidade dos seus constituintes: as hemácias encontram-se depositadas no fundo do tubo, o plasma acelular contendo algumas plaquetas (plasma pobre em plaquetas (PPP)) no sobrenadante e entre estas camadas a camada flogística (CF) (também denominada por PRP por alguns autores), uma camada intermediária fina e esbranquiçada, na qual estão concentrados leucócitos e algumas plaquetas maiores (Araki et al., 2012; Dohan Ehrenfest et al., 2009; Prakash & Thakur, 2011; Vendramin et al., 2009).

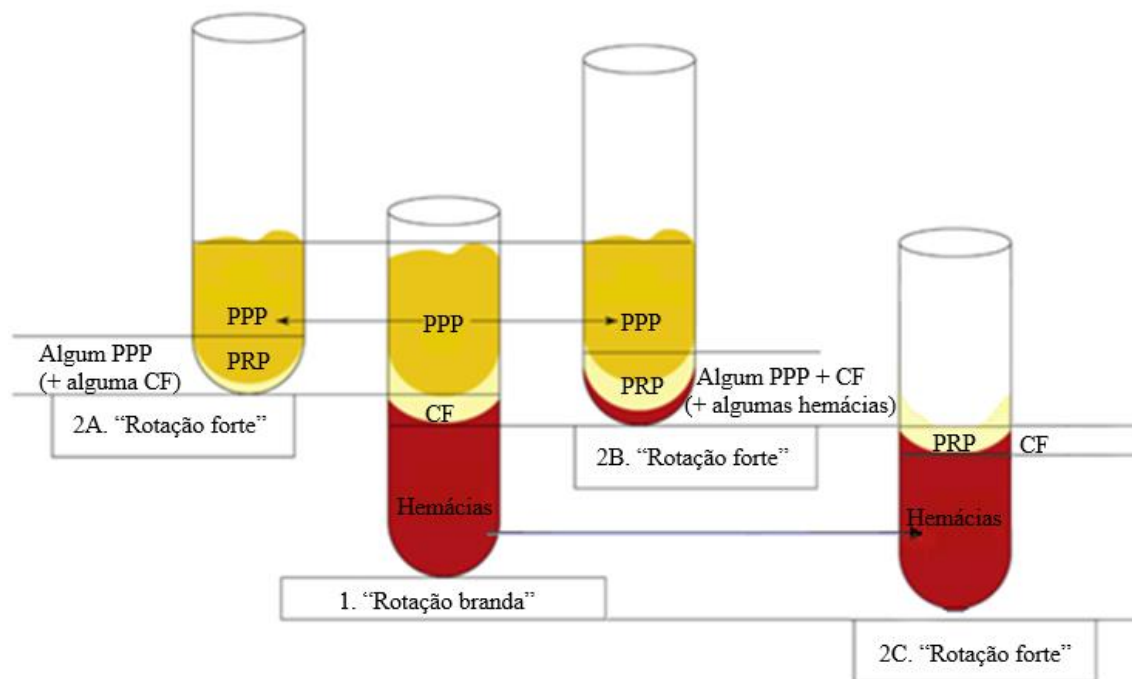
Os seguintes procedimentos variam entre os protocolos, mas têm em comum, o objetivo de concentrar ainda mais as plaquetas: o plasma sobrenadante (PPP) e, em alguns protocolos uma porção ou a totalidade da CF (podendo conter algumas hemácias), são recolhidos para serem diretamente usados ou sujeitos a uma segunda centrifugação (Araki et al., 2012; Arnoczky et al., 2011; Vanat, Medeiros, Balarin, Pereira & Biasi, 2012; Vendramin et al., 2009). Alguns autores descrevem ainda protocolos em que para a segunda centrifugação são recolhidas a CF e as hemácias (Choi, Im, Huh, Suh & Lee, 2004, citados por Vanat et al., 2012; Marx et al., 1998). No seu trabalho Marx *et al.* (1998) demonstraram, tal como os autores por si citados Reeder *et al.* (1993), que as plaquetas recentemente diferenciadas e, portanto, mais ativas, por serem maiores podem ocupar até 1mm acima da camada de hemácias e, por isso, sugerem que essa porção seja também recolhida para formar o PRP.

Nos protocolos de centrifugação dupla, a segunda centrifugação (“rotação forte”¹⁰), por ser mais longa e mais rápida, permite a sedimentação das plaquetas, separando-as juntamente com leucócitos e algumas hemácias no fundo do tubo, do restante plasma (Marx, 2001; Prakash & Thakur, 2011). O plasma obtido é assim dividido em PRP (plaquetas e +/- leucócitos) e PPP (Arnoczky et al., 2011).

⁹ Tradução livre de “soft spin”

¹⁰ Tradução livre de “hard spin”

Figura 4. Método manual de preparação do PRP



A preparação do PRP utilizando o método manual pode ser realizada através de uma ou duas centrifugações (1 e 2). 1: O sangue colhido é brevemente centrifugado com forças baixas (“rotação branda”), sendo obtidas três camadas: hemácias, camada flogística (CF) e plasma sobrenadante (PPP). O plasma sobrenadante (podendo conter parte ou a totalidade da CF) pode ser recolhido e diretamente usado ou submetido a outra centrifugação, mais longa e com forças superiores (2A e 2B). 2A: A centrifugação do plasma sobrenadante (podendo conter algumas células da CF) divide-o em PPP e PRP. 2B: O plasma sobrenadante e a CF (podendo conter algumas hemácias) centrifugados são separados em PPP e PRP. Alternativamente, alguns autores recolhem a CF e as hemácias para uma centrifugação “rotação forte” de forma a separar o PRP (2C). Após a centrifugação parte do PPP é descartado. O remanescente corresponde ao PRP que é gentilmente homogeneizado e, opcionalmente ativado antes da sua aplicação. Figura adaptada de Ehrenfest *et al.* (2009).

Após a centrifugação, o PRP deve ser recolhido rapidamente porque as plaquetas começam lentamente a difundir-se para o PPP, diminuindo a sua contagem na preparação final de PRP (Marx, 2001). Com auxílio de uma seringa, grande parte do PPP é descartada, deixando apenas plasma suficiente para as plaquetas concentradas permanecerem em suspensão. O remanescente é então gentilmente misturado para obter o PRP pronto a usar, sendo referido como PRP concentrado (cPRP) ou plasma concentrado em plaquetas (PCP) por alguns autores (Araki et al., 2012; Prakash & Thakur, 2011).

Segundo Marx (2004), uma vez preparado, o PRP mantém-se estéril e no estado anticoagulado concentra plaquetas viáveis por um período de oito horas. Já Bausset *et al.* (2012) demonstrou

que a preservação da atividade das plaquetas e da capacidade de libertar FC mantêm-se até seis horas após a preparação. O processo de centrifugação deve ser asséptico para evitar a contaminação e executado com precisão para separar e concentrar um elevado número de plaquetas íntegras. A lise e a libertação precoce de FC reduzem a eficácia terapêutica da preparação (Alves, Monteiro, Pires & Santos, 2012).

3.1.3. Aplicação

Por fim, o concentrado de plaquetas obtido é aplicado no local cirúrgico sob a forma de coágulo, gel, líquido, ou *spray*, de acordo com o tipo de procedimento (aberto ou fechado, como uma artroscopia) (DeLong et al., 2012; Ehrenfest et al., 2009). Em função da aplicação terapêutica podem-se adicionar agentes gelificantes para ativar as plaquetas e solidificar a solução obtida (Arnoczky et al., 2011; Ehrenfest et al., 2009). A ativação plaquetária pode também ser induzida na segunda centrifugação e a densidade da rede de fibrina precipitada pode ser manipulada variando, proporcionalmente, com o aumento da duração e com a força-g da centrifugação (Arnoczky et al., 2011).

Quando o PRP se destina a tratar lesões dos tecidos moles, a maioria dos autores não considera necessária a ativação prévia, uma vez que será despoletada *in situ* pelo contacto com o colagénio, trombina, membrana basal das células ou em situações de força de cisalhamento causadas pelo fluxo de fluido. Alguma ativação é desejada se a aplicação cirúrgica do PRP beneficiar de uma consistência mais gelatinosa para que este se fixe na área de interesse como, por exemplo, na ortopedia para facilitar a integração de implantes ósseos ou o tratamento de osteoartrites (Arnoczky et al., 2011; De La Mata, 2013; Marx, 2001).

Outros autores, no entanto, defendem que ativação deve ser o mais próxima possível do momento da aplicação, pois assim que são ativadas, as plaquetas libertam imediatamente fatores de crescimento. Nos primeiros dez minutos após a sua ativação, as plaquetas já secretaram 70% dos FC armazenados e cerca de 100% na primeira hora. Adicionalmente, sintetizam FC nos 8 a 10 dias seguintes, até ficarem esgotadas e morrerem (Sánchez-González et al., 2012). Porque o tempo de semi-vida da maioria dos FC é medido em minutos ou horas, a ativação precoce pode diminuir a exposição das células alvo aos FC (Arnoczky et al., 2011). Consequentemente, por forma a garantir uma concentração adequada de FC no local da lesão, o PRP deve ser ativado imediatamente antes de ser usado e não previamente (Marx, 2001; Pereira et al., 2013).

3.2.Fatores que influenciam a obtenção do PRP

A força, o tempo de centrifugação e a redução do volume plasmático são variáveis que influenciam a qualidade do PRP e, como tal, são estudadas no sentido de otimizar uma metodologia capaz de concentrar plaquetas, sem prolongar o tempo de preparação e através da qual se consiga prever o volume final de PRP (Vendramin et al., 2009). A interpretação de variáveis não só relacionadas com a preparação do PRP mas também as que influenciam as características hematológicas do PRP e até do sangue colhido fornece informação que possibilitará prever as características do PRP final (Andrade, de Freitas Brandão, Sá, de Bittencourt & Sadigursky, 2008).

3.2.1. Aparelhos e material

Segundo alguns autores, as centrifugadoras utilizadas deverão ser específicas para a preparação de PRP, pois outros aparelhos inadequados poderão produzir PRP de fraca qualidade, sem potenciais benefícios terapêuticos (Weibrich & Klies, 2002, citados por Marx, 2004). Andrade *et al.* (2008) faz referência a centrifugadoras com rotores que controlam a aceleração e a travagem, evitando forças abruptas sobre as plaquetas e a sua ativação precoce. Os diferentes aparelhos de preparação de PRP disponíveis usam protocolos distintos e logo não produzem PRP idênticos (DeLong et al., 2012). Contudo, mesmo utilizando protocolos específicos para a obtenção de PRP, a concentração de plaquetas pode diferir não só entre protocolos, como dentro de determinado protocolo (Arnoczky et al., 2011).

A qualidade do material da centrífuga, bem como dos instrumentos médicos ou implantes pode alterar o PRP, uma vez que a adesão e a agregação de plaquetas pode ser inibida ou induzida por diferentes metais (Tanaka et al., 2009). O material usado na manipulação do sangue e no armazenamento do PRP também são importantes (Andrade et al., 2008; DeLong et al., 2012). Todo o material que contacte com o sangue deve ser de plástico, preferencialmente de polipropileno, pois os instrumentos ou recipientes de vidro despoletam a ativação das plaquetas ou diminuem o seu número devido às plaquetas aderirem à sílica (Andrade et al., 2008; Michelson, 2007, citado por DeLong et al., 2012). No entanto, Vendramin *et al.* (2009) mostraram obter um PRP com boa qualidade e reproduzível utilizando centrifugadoras, seringas e tubos de ensaios comumente encontrados em hospitais. Contudo observou-se também que os tubos de ensaio partiam quando aplicava forças de centrifugação elevadas, limitando o intervalo de forças na preparação de PRP.

3.2.2. Parâmetros do sangue

Os parâmetros do sangue são importantes variáveis na preparação de PRP. A variabilidade individual quanto à composição e número de elementos celulares influenciam a preparação de PRP entre indivíduos e logo, é importante estudar os diferentes parâmetros do sangue (Andrade et al., 2008; Araki et al., 2012). Variações significativas do hematócrito (htc) influenciam tanto a quantidade de células e do PPP removido, como a contagem de plaquetas no PRP e, conseqüentemente, o valor do htc deve ser considerado na escolha do protocolo a utilizar (uma ou duas centrifugações) (Andrade et al., 2008; Nagata et al., 2010). Andrade *et al.* (2008) mostraram que quanto maior for o seu valor, maior é a quantidade de hemácias e menor a quantidade de PPP obtidos. Outros componentes celulares do sangue, como as plaquetas e os leucócitos não mostraram interferir neste processo. No seu trabalho, Nagata *et al.* (2010) referem que dois indivíduos obtiveram pouco PPP quando foi usado um protocolo com uma só centrifugação, não sendo possível produzir PRP. No entanto, a aplicação de um protocolo com duas centrifugações foi capaz de produzir PRP para os mesmos indivíduos.

Quanto ao PRP, Andrade *et al.* (2008) concluiu que o htc inicial e o volume de PPP removido não provocavam alterações no seu htc e que existia uma relação inversamente proporcional à quantidade de hemácias inicialmente removidas. Porém, esta observação não está de acordo com alguns autores que afirmam que remover mais PPP é benéfico na concentração de plaquetas (Araki et al., 2012). Andrade *et al.* (2008) justifica a sua observação através das variações mínimas na quantidade de PPP que podem dificultar a correlação com parâmetros do PRP. O autor refere ainda que o aumento do htc no PRP não modificou a contagem de plaquetas e que este aumento poderá ser uma consequência da tentativa de concentrar mais plaquetas, através da remoção da porção mais superficial da camada de hemácias. No entanto, variações no htc modificaram o tempo de coagulação, sendo que quanto maior o htc mais tempo era necessário para o PRP coagular. A contagem de plaquetas no PRP apresentava uma correlação negativa com o htc inicial (Andrade et al., 2008) e uma correlação positiva com a contagem de plaquetas no sangue (Andrade et al., 2008; Nagata et al., 2010). Nenhuma correlação foi demonstrada entre a contagem de leucócitos no sangue e a contagem de plaquetas no PRP. A concentração de leucócitos no PRP não parece ser influenciada pela quantidade de PPP ou de hemácias removidos mas apenas pela contagem de leucócitos no sangue (Andrade et al., 2008). O método de preparação de Andrade *et al.* (2008) aqui referido mostrou não só concentrar plaquetas como concentrou leucócitos e eritrócitos. Nos seus trabalhos, também Silva, Carmona e Rezende (2012a) e Silva *et al.* (2012b) observaram que o PRP que concentrava mais plaquetas era o que concentrava mais leucócitos. Já Pereira (2012) observou que os protocolos por si

testados que obtinham maior concentração de leucócitos, apresentavam também maior concentração de eritrócitos, mas não eram os mais eficientes a concentrar plaquetas.

3.2.3. O anticoagulante

O anticoagulante usado deve manter a integridade da membrana celular por forma a não comprometer a contagem final de plaquetas. Assim sendo, e embora existam diferentes anticoagulantes disponíveis, muitos autores preferem anticoagulantes formulados com citrato e dextrose, como o ácido citrato dextrose -A (ACD -A) e o citrato fosfato dextrose (CPD) (Andrade et al., 2008; Marx, 2001). A adição de íões citrato ao sangue forma citrato de cálcio, uma substância solúvel não ionizada que mantém a fluidez do sangue. Porque o cálcio é necessário em vários passos da cascada de coagulação, a adição de citrato é a responsável pela ação anticoagulante do ACD -A e do CPD que, adicionalmente, incluem dextrose, tampões e outras substâncias que mantêm o metabolismo das plaquetas (Marx, 2001; Pietrzak & Eppley, 2005).

Segundo Marx (2001), o ACD-A é o anticoagulante mais usado na preparação de PRP pois é o melhor a manter a viabilidade das plaquetas. O ACD-A é também frequentemente usado em transfusões sanguíneas devido aos efeitos protetores da dextrose nas hemácias (Araki et al., 2012). Uma vez que adicionando cálcio é possível reverter o efeito anticoagulante do ACD-A, este é ainda utilizado noutras aplicações clínicas como nos géis de PRP (Vendruscolo et al., 2012a). O CPD é semelhante ao ACD-A mas possui menos agentes conservantes e, por isso, é 10% menos eficaz na manutenção da viabilidade das plaquetas (Marx, 2001).

O EDTA é um anticoagulante com poder quelante mais forte que o ACD-A amplamente usado na contagem de células sanguíneas, mas que foi considerado nocivo para as plaquetas, pois pode provocar danos na sua membrana (Andrade et al., 2008; Araki et al., 2012). Não obstante, num estudo recente a utilização de EDTA para a preparação de PRP mostrou ser vantajosa na prevenção da coagulação e na agregação plaquetária, ao concentrar mais plaquetas e FC que o ACD-A (Araki et al., 2012).

3.2.4. Número de centrifugações: protocolos de uma ou duas centrifugações

Na bibliografia revista foram encontradas diferentes considerações quanto a serem necessárias uma ou duas centrifugações para concentrar plaquetas no PRP. Protocolos com dupla centrifugação foram descritos em trabalhos realizados nas diferentes espécies, tais como, em cavalos (Vendruscolo et al., 2012a), cães, (Perazzi et al., 2013), coelhos (Gimeno et al., 2006) e humanos (Bausset et al., 2012). Segundo Marx (2001), a segunda centrifugação permite uma

melhor separação das plaquetas pela ausência de um grande número de hemácias. O autor considera que uma só centrifugação não consegue produzir um “verdadeiro” PRP pois, independentemente das variáveis força ou do tempo de centrifugação, o resultado será uma mistura de PRP e de PPP com uma baixa concentração de plaquetas. Nagata *et al.* (2010) demonstraram no seu trabalho, que um protocolo de centrifugação dupla resulta em concentrações plaquetárias superiores às conseguidas pelo protocolo de uma centrifugação. Todavia, referem que o protocolo de centrifugação dupla provocou alterações morfológicas nas plaquetas concentradas e que se tornava mais sensível a pequenos erros de processamento. Silva *et al.* (2012b) e Silva *et al.* (2012a) aplicaram protocolos de uma centrifugação nos seus trabalhos e obtiveram concentrações de plaquetas potencialmente adequadas para aplicação terapêutica em gatos e cães, respetivamente. Silva *et al.* (2012b) justificam que, no caso dos gatos, a concentração de plaquetas pode ser conseguida com uma “rotação simples” por causa das suas características morfológicas, tais como o diâmetro e o MPV superiores, relativamente às plaquetas de outras espécies. No cão, Silva *et al.* (2012a) observaram que apesar da concentração plaquetária ser ligeiramente inferior à conseguida por um protocolo de centrifugação dupla, a realização de uma única centrifugação tem a vantagem de não necessitar de grandes quantidades de sangue e, assim é passível de ser aplicado em cães de raça pequena ou pacientes pediátricos. Também Nagata *et al.* (2010) demonstraram que o protocolo de uma centrifugação obtém uma concentração plaquetária inferior ao protocolo de centrifugação dupla e associaram a maior concentração de plaquetas obtida na sequência das duas centrifugações com um volume de PRP obtido inferior. Nagata *et al.* (2010) corroboraram estes resultados no seu estudo, uma vez que o seu protocolo de centrifugação dupla conduziu a um volume menor de PRP e a uma quantidade de plaquetas significativamente superior à obtida no protocolo de uma centrifugação.

3.2.5. Força de centrifugação e tempo de centrifugação

A força de centrifugação é importante na separação dos componentes sanguíneos e pode promover a ativação precoce das plaquetas sendo, por isso, uma variável fulcral na preparação do PRP (Andrade *et al.*, 2008; Vendramin *et al.*, 2009). Esta força depende da velocidade de centrifugação e do raio do rotor da centrifugadora, sendo designada de força centrífuga relativa (FCR) e apresentando como unidade de medida a força de gravidade (g) (Vendramin *et al.*, 2009). Vários autores relatam obter maior volume plasmático e maior concentração de plaquetas quando ocorre aumento da força (g) (Araki *et al.*, 2012; Bausset *et al.*, 2012; Nagata *et al.*, 2010; Vendramin *et al.*, 2009). Porém, Bausset *et al.* (2012) e Nagata *et al.* (2010)

observaram a ocorrência de alterações morfológicas nas plaquetas consistentes com o estado ativado com o aumento da força g. Observaram uma diminuição da resposta plaquetária à ativação e a ocorrência de auto agregação. Também Araki *et al.* (2012) referem que forças centrífugas muito altas provocam maior aglomeração de plaquetas no fundo do tubo. Vendruscolo *et al.* (2012a) também associam a formação de aglomerados de plaquetas à sua deformação ou ativação provocadas por centrifugações com forças altas. Em conjunto, estas observações indicam que velocidades de centrifugação menores foram melhores para a manutenção da morfologia de repouso das plaquetas e que velocidades maiores poderão ser deletérias para a função plaquetária e, logo menos desejáveis na preparação de PRP (Araki et al., 2012; Bausset et al., 2012). Por fim, concluem que a velocidade mais eficaz será aquela capaz de concentrar o máximo de plaquetas sem indicadores de ativação precoce (Bausset et al., 2012; Nagata et al., 2010).

Relativamente ao tempo de centrifugação, Vendruscolo *et al.* (2012a) e Vendramin *et al.* (2009) não observaram influência na concentração de plaquetas, sugerindo que o tempo de preparação deverá ser o mais rápido possível. Clemmons (1983) relatou que independentemente do tempo de centrifugação, consegue obter uma boa concentração de plaquetas aplicando forças altas, quando a diferença entre as dimensões das plaquetas e eritrócitos é maior (Clemmons, 1983, citado por Perazzi et al., 2013). Já Pereira (2012) mostrou que força e tempo maiores resultaram numa maior concentração plaquetária.

Quanto à contaminação das amostras de PRP com hemácias e leucócitos os resultados dos autores convergem; Vendruscolo *et al.* (2012a) refere a diminuição de leucócitos no PRP com o aumento do tempo e força de centrifugação e Pereira (2012) associa maiores concentrações de leucócitos e hemácias no PRP à aplicação de força e tempo de centrifugação menores. Vendruscolo *et al.* (2012a) referem também que forças de centrifugação altas diminuem a concentração de leucócitos no PRP porque provocam a sua aglomeração e deposição no fim do tubo. Simultaneamente, afirmam que forças centrífugas menores soltam facilmente tanto leucócitos como plaquetas do fundo do tubo, aumentando a sua concentração no PRP.

3.2.6. Redução do volume plasmático

A redução do volume plasmático após centrifugação varia entre os protocolos revistos, tal como a eficiência da concentração de plaquetas (Araki et al., 2012; Silva et al., 2012a; Vendruscolo et al., 2012a). No protocolo de uma centrifugação e usando amostras de cão, Silva *et al.* (2012a) dividiram arbitrariamente o plasma resultante em duas porções iguais e observaram que na metade inferior a concentração de plaquetas e de um FC específico foi mais eficiente.

Vendruscolo *et al.* (2012a) avaliaram diferentes protocolos de dupla centrifugação em cavalos, e também dividiram o plasma resultante em duas partes: PPP e PRP. Os autores consideraram que o PPP correspondia à metade superior do plasma e descartaram-na. A análise do plasma remanescente (PRP) demonstrou um aumento da concentração de plaquetas 1,30 a 2,36 vezes superior à concentração de plaquetas no sangue colhido.

Outros trabalhos comparam a concentração de plaquetas no PRP correspondente a 1/10 ou 1/3 da porção inferior do plasma obtido após a segunda centrifugação (Araki *et al.*, 2012; Vendramin *et al.*, 2009) com o plasma obtido na primeira centrifugação e com o sangue colhido (Araki *et al.*, 2012). No trabalho de Araki *et al.* (2012), a maior concentração de plaquetas foi observada no 1/10 inferior do plasma resultante da segunda centrifugação, correspondendo a um aumento de 7.4 vezes relativamente à concentração de plaquetas no plasma da primeira centrifugação. Observaram também um aumento da concentração de FC nesta fração após a ativação das plaquetas. Vendramin *et al.* (2009), observaram que, apesar de conseguirem uma concentração de plaquetas satisfatória retirando os 2/3 superiores do PPP, conseguiam concentrar aproximadamente mais 30% das plaquetas se o PRP final correspondesse a 10% do volume de sangue inicial. Os autores referem que através deste último procedimento conseguem fixar a quantidade de PRP final obtida que, apesar de menor, apresenta uma elevada concentração de plaquetas (média de 6,7 vezes superior à amostra de sangue).

3.2.7. O agente ativador e a matriz de fibrina

A maioria dos protocolos usa trombina (de origem bovina ou autóloga) e/ou cloreto de cálcio (ou fatores semelhantes) para desencadear a ativação das plaquetas e a polimerização da fibrina (Arnoczky *et al.*, 2011; Ehrenfest *et al.*, 2009). O cloreto de cálcio ativa a cascata de coagulação, permitindo a formação de trombina (Arnoczky *et al.*, 2011). O gluconato de cálcio constitui um exemplo de um fator semelhante ao cloreto de cálcio, que leva 10 (ou 5 minutos se em banho-maria) a gelificar o PRP, um tempo demasiado longo para determinadas aplicações (Vendramin *et al.*, 2009). Já a trombina promove a ativação rápida das plaquetas e a conversão de fibrinogénio em fibrina, obtendo-se um gel entre 5 e 60 segundos após a sua mistura com o PRP (Andrade *et al.*, 2008; Arnoczky *et al.*, 2011). O uso de gluconato de cálcio e de trombina bovina mostraram, recentemente, efeitos semelhantes na libertação e concentração de FC no PRP (Silva *et al.*, 2012b).

Na década de 90, a utilização de trombina bovina foi associada a reações imunológicas desencadeadas pelo fator V bovino. Os métodos de preparação de PRP atuais diminuem significativamente a possibilidade de contaminação com este fator ou, em alternativa, usam

outros ativadores como o cloreto de cálcio (Arnoczky et al., 2011; Pietrzak & Eppley, 2005). Contudo, a adição de níveis elevados de trombina e de cálcio ao PRP promove a rápida ativação plaquetária e a polimerização e, em consequência, a formação de um gel constituído por uma rede de fibrina mais rígida. Este gel pode não ser injetável, limitando a sua aplicação terapêutica a determinados procedimentos cirúrgicos. Relativamente à rede de fibrina, quando esta polimeriza a uma velocidade fisiológica, mostra-se menos eficaz na captura de citocinas e no suporte à migração de células.

O colagénio tipo I tem sido avaliado como uma alternativa para a ativação das plaquetas (Arnoczky et al., 2011; Wroblewski et al., 2010). Estes autores referem que a utilização recente de colagénio tipo I *in vitro* mostrou induzir uma libertação mais sustentada de FC ao longo do tempo, comparativamente à trombina. Desta forma, o clínico possui mais tempo para efetuar a aplicação localizada. Do mesmo modo, poderá utilizar agulhas de menor calibre pois a preparação obtida é menos viscosa. A utilização de colagénio tipo I também permite a ativação plaquetária *in vivo*, o que resulta na remoção de uma etapa do protocolo de produção de PRP, diminuindo o erro associado à manipulação pelo operador (Arnoczky et al., 2011; Wroblewski et al., 2010).

Enquanto os protocolos anteriormente referidos utilizam ativadores, no protocolo de PRF descrito Choukroun a gelificação é conseguida pela ativação das plaquetas e pela polimerização da fibrina na ausência de anticoagulantes. O sangue colhido é centrifugado a velocidades baixas para formar um coágulo com uma forte matriz de fibrina, na qual são concentrados leucócitos e plaquetas (Choukroun et al, 2001, citado por Dohan et al., 2006). Estas matrizes possuem a vantagem de criarem uma estrutura bioativa na qual a rede de fibrina provisória não só serve de matriz de suporte para a migração de células envolvidas na cicatrização, mas que também funciona como reservatório de FC e citocinas, prolongando a sua entrega por períodos de tempo mais alargados e em maior concentração, relativamente aos coágulos de sangue. Estas matrizes, ao contrário dos restantes PRP, não se dissolvem rapidamente após aplicação e vão sofrendo remodelação de forma semelhante a um coágulo sanguíneo natural. A realização de uma segunda centrifugação “forte” condensa ainda mais a fibrina, e dependendo das variáveis força e duração de centrifugação, pode variar em consistência, desde um gel a densas membranas de fibrina (Arnoczky et al., 2011). Adicionalmente, as plaquetas são ativadas durante o processo de preparação, o que se traduz na libertação precoce de FC na matriz de fibrina (Ehrenfest et al., 2009).

Ainda relativamente ao gel formado pela ativação plaquetária, Araki *et al.* (2012) sugerem que retém parte substancial dos FC, diminuindo a sua concentração no PRP. Os autores associam a

presença de fibrinogênio à coagulação e ativação descontrolada de plaquetas e consideram que, apesar do gel de fibrina resultante ser um bom vetor para a liberação controlada de FC, este reduz o volume final do produto e impede a injeção fácil do PRP não sendo, por isso, usado em muitas situações clínicas. Já Hood e Arm (2003) sugerem que concentrações elevadas de fibrinogênio estão associadas à formação de géis mais densos, mais estáveis e que aumentam a liberação sustentável dos FC (Hood & Arm, 2003, citados por Pietrzak & Eppley, 2005).

3.3. Classificação

O conceito de acelerar a cicatrização através da aplicação de PRP, aliado ao aparente sucesso terapêutico mediatizado pelos *media*, incentivou a sua exploração comercial e o desenvolvimento de uma miríade de centrifugas, kits e protocolos de preparação com o objetivo de concentrar plaquetas em plasma ou numa estrutura de fibrina de diferentes densidades (De La Mata, 2013; Ehrenfest et al., 2009). As distintas abordagens à preparação de PRP têm resultado numa miríade de produtos finais que podem variar consideravelmente não só na concentração final de plaquetas bem com na quantidade de glóbulos brancos incluídos na preparação final. O enriquecimento do PRP em componentes sanguíneos pode afetar as suas potenciais indicações e benefícios clínicos, como já foi referido. Contudo, os diferentes métodos de preparação e os produtos obtidos têm sido genericamente englobados no termo “plasma rico em plaquetas”, o mesmo usado para o concentrado de plaquetas empregue em transfusões, o que não permite a distinção clara entre os diferentes sistemas de obtenção e a constituição dos produtos (Arnoczky et al., 2011; Ehrenfest et al., 2009). Paralelamente, podem também ser encontrados na literatura diferentes termos (“menos corretos”) para o PRP, tais como plasma autógeno de plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, plasma enriquecido em plaquetas, concentrado de plaquetas, ou ainda gel de plaquetas (Pereira Filho et al., 2004).

Desde o início deste século vários autores têm publicado artigos que tentam caracterizar e classificar as diferentes preparações (parâmetros da centrifugação e uso de anticoagulante), o seu conteúdo (plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento) e suas aplicações. Estes parâmetros continuam a ser alvo de discussão, sendo evidente a falta de uniformização dos protocolos de preparação e de aplicação de PRP (Bausset et al., 2012).

Em 2009, Ehrenfest *et al.*, sugeriram dividir os produtos disponíveis no mercado classificando-os relativamente às suas características farmacológicas, materiais usados e à aplicabilidade prática da sua preparação manual ou automatizada/automática. Recorrendo aos parâmetros descritos na tabela 4, os autores propõem quatro categorias de produtos relativamente ao seu

conteúdo em leucócitos, à matriz de fibrina do produto e espelham a sua relevância e os seus potenciais usos: Plasma Rico em Plaquetas Puro (P-PRP), Plasma Rico em Plaquetas e Leucócitos (L-PRP), Fibrina Rica em Plaquetas Pura (P-PRF) e Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF). Segundo os autores, a densa matriz de fibrina obtida nos PRF confere-lhes propriedades biomecânicas únicas e distingue-os dos restantes PRP (Ehrenfest et al., 2009). Ehrenfest *et al.* (2009) refere ainda que o L-PRF, também conhecido como PRF de Choukroun, pode ser considerado um concentrado de segunda geração pois a sua preparação simplificada não requer quaisquer alterações bioquímicas do sangue, ou seja, não são necessários anticoagulantes na colheita ou agentes gelificantes. Relativamente ao conteúdo em leucócitos, Ehrenfest *et al.* (2009) mencionam que as preparações de L-PRP diferem das preparações P-PRP não só no conteúdo celular mas também nos potenciais efeitos dos leucócitos na proliferação, diferenciação, imunidade e infeção.

Embora a classificação dos produtos em categorias tenha contribuído para a distinção dos “múltiplos PRP disponíveis”, descuida os potenciais benefícios clínicos de cada um (Arnoczky et al., 2011). Adicionalmente, a maioria dos estudos publicados peca na medição e documentação exatas dos componentes do produto em estudo e dos métodos usados, tornando a comparação dos resultados entre artigos pouco útil.

Em 2012 e, em consequência deste cenário, surge o sistema de classificação PAW¹¹ que pretende não só contribuir para acelerar o processo de identificação da preparação de PRP ótima para cada indicação clínica, como permitir a outros investigadores reproduzir informações publicadas ou realizar meta-análises. Este sistema de classificação sugere a organização e a comparação de resultados publicados através da análise de três variáveis: (1) o número absoluto de plaquetas, (2) a forma como a ativação plaquetária ocorre, e (3) a presença/ausência de leucócitos (DeLong et al., 2012) (Tabela 3).

¹¹ Cada letra da sigla corresponde às variáveis usadas pelo sistema de classificação: plaquetas, ativação e leucócitos (em inglês, “platelets, activation and white cells”).

Tabela 3. Classificação "PAW".

Plaquetas	Concentração (plaquetas/uL)	\leq basal	P1
		basal - 750.000	P2
		750.000 - 1.250.000	P3
		$>$ 1.250.000	P4
Ativação	Método	exógeno	x
Leucócitos	Contagem total	$>$ basal	A
		\leq basal	B
	Neutrófilos	$>$ basal	α
		\leq basal	β

A classificação PAW pressupõe a atribuição de uma sigla para cada variável que categoriza o PRP obtido quanto à concentração de plaquetas, método de ativação e a presença de leucócitos. Tabela adaptada de DeLong *et al.* (2012)

Tabela 4. Definição dos parâmetros a ser avaliados em cada protocolo de PRP, segundo Ehrenfest *et al.* (2009).

Parâmetros	Subparâmetros	Definição
A: Centrifugadora e kits de preparação (para o processamento de 50 mL de sangue)	A1: Tamanho e peso do tipo de centrifugadora requerida para o método	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pesada (e complexa¹²) ▪ Leve (e compacta) ▪ Pesada mas potencialmente leve (ex.: o sistema comercializado é pesado, mas a técnica poderia ser realizada com uma centrifugadora mais pequena)
	A2: Duração do procedimento (desde a colheita do sangue à aplicação cirúrgica)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rápida (inferior a 20 minutos (min.)) ▪ Longa (entre 20 a 60 min.) ▪ Muito longa (superior a 1 hora)
	A3: Custo (custo inicial do equipamento e custos de manutenção para kits e reagentes)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Muito barata (inferior a 5 euros) ▪ Barata (entre 5 a 50 euros) ▪ Cara (superior a 50 euros) ▪ Muito complexa (- -)
	A4: Ergonomia do kit (incluindo manipulações necessárias) e complexidade do procedimento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Muito simples (+ +) ▪ Simples (+) ▪ Complexa (-) ▪ Muito complexa (- -)
B: Plaquetas e leucócitos	B1: Volume final da preparação do gel de plaquetas (em relação ao sangue inicialmente colhido)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Grande (mais de 25% da amostra de sangue) ▪ Pequeno (menos de 25%) ▪ Variável (se PPP rico em fibrina adicional for conservado para aumentar o volume acima de 25%)
	B2: Eficácia da recolha de plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Excelente (mais de 80%)
	B3: Eficácia da recolha de leucócitos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Boa (entre 40 a 80%) ▪ Baixa (menos de 40%) ▪ Por vezes desconhecida ▪ Sem leucócitos (quando a técnica elimina a maioria dos leucócitos)
	B4: Preservação das plaquetas e leucócitos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Íntegras¹³ ▪ Danificadas ▪ Desconhecida ▪ Ativadas (quando a coagulação é induzida durante o processo de centrifugação)
C: Fibrina	C1: Concentração de fibrinogénio e densidade da fibrina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta densidade ▪ Baixa densidade
	C2: Tipo de polimerização de fibrina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forte (maioritariamente junções equilaterais e trimoleculares) ▪ Fraca (maioritariamente junções bilaterais e tetramoleculares)

Tabela adaptada de Ehrenfest *et al.*, (2009)

¹² Tradução livre de “cumbersome”

¹³ Tradução livre de “healthy”

PARTE II – OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO GATO

1. OBJETIVOS

O presente estudo teve como finalidade concretizar o conhecimento sobre o PRP e conhecer globalmente como o método manual contribui para a produção de PRP em gatos, através da avaliação de diferentes variáveis relacionadas com a preparação deste produto biológico. Com o intuito final de otimizar o método de preparação de PRP em gatos, pretendeu-se estimar a relevância dos seguintes parâmetros:

- **Parâmetros da centrifugação**

- Conhecer a contribuição dos parâmetros de centrifugação (força, tempo e número de centrifugações) na concentração de plaquetas;
- Observar a ausência/presença de leucócitos e hemácias no PRP e relacionar a sua contagem com os parâmetros de centrifugação.

- **Capacidade de concentrar plaquetas**

- Determinar se é possível concentrar plaquetas através dos protocolos em estudo;
- Identificar quais os níveis dos parâmetros de centrifugação (força, tempo e número de centrifugações) que promovem a maior concentração de plaquetas íntegras;
- Estimar a concentração de plaquetas obtida no protocolo otimizado e classificá-lo quanto aos seus componentes.

- **Execução do método manual em ambiente de clínica de pequenos animais**

- Apreciar a exequibilidade do método manual;
- Relacionar pontos críticos nos protocolos desenhados e associá-los aos resultados obtidos, considerando a bibliografia disponível.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenho experimental

Para atingir os objetivos propostos, foram conduzidos dois estudos independentes, designados “estudo força” e “estudo tempo”, nos quais foram avaliados conjuntos de protocolos de duas centrifugações com associações de força (g) e tempo (min.) distintas (protocolos nos ANEXOS

II e III). No “estudo força”, o tempo foi fixado para a primeira e segunda centrifugação de cada protocolo (5 e 10 minutos respectivamente) e a força foi gradualmente aumentada nos três protocolos testados na primeira (100, 200 e 400g) e na segunda centrifugação (200, 400 e 800g) (Tabela 5). De seguida, foi escolhido o protocolo que concentrou mais plaquetas para aplicar as suas forças no segundo estudo, independentemente da força mais eficaz corresponder à primeira ou segunda centrifugação do protocolo. Deste modo, no “estudo tempo” a força foi fixada para a primeira e segunda centrifugação e foram avaliadas diferentes associações de tempo de centrifugação (igual ou superior a 5 min.) em quatro protocolos (Tabela 6).

Tabela 5. Variações da força de centrifugação no conjunto de protocolos que constituem o "estudo força".

Protocolos	1ª centrifugação		2ª centrifugação	
	Força (g)	Tempo (min.)	Força (g)	Tempo (min.)
A	100	5	200	10
B	200	5	400	10
C	400	5	800	10

Tabela 6. Variações do tempo de centrifugação nos grupos de protocolos que constituem o "estudo tempo".

Protocolos	1ª centrifugação		2ª centrifugação	
	Força (g)	Tempo (min.)	Força (g)	Tempo (min.)
A	100	5	200	10
B	100	5	200	15
C	100	5	200	5
D	100	10	200	10

A eficácia dos diferentes protocolos na produção de PRP foi avaliada através da capacidade de concentrar plaquetas íntegras não agregadas. Para tal foram contabilizadas as plaquetas de cada amostra de PRP e comparou-se a sua concentração com a concentração de plaquetas no sangue (não centrifugado). Para avaliar a constituição e classificar o produto obtido procedeu-se também à contagem de leucócitos e de hemácias em cada amostra e no sangue. Para todas as

amostras a contagem de plaquetas, leucócitos e eritrócitos no PRP foi realizada após cada centrifugação e, no final de cada experiência, no sangue colhido.

2.1.1. Recolha dos dados e dimensão da amostra

Para os “estudos força e tempo” foram registados os casos e recolhidas amostras de gatos saudáveis recebidos no HVSB nos períodos de 28 de maio a 17 de junho e entre 18 de junho a 24 de julho de 2013 e que, cumulativamente, foram submetidos a intervenções cirúrgicas que necessitavam de anestesia geral. Adicionalmente, de modo a poderem ser incluídos neste estudo, os animais deveriam cumprir os seguintes critérios: serem clinicamente saudáveis no momento da colheita de sangue; não possuírem história de doença sistémica ou de tratamento com drogas que alteram a função das plaquetas (como anticoagulantes e imunossuppressores) durante as duas semanas anteriores à colheita e terem uma contagem de plaquetas no sangue superior a 200×10^3 plaquetas (PLT)/ μL de sangue¹⁴.

Assim, para cada caso foram recolhidos os dados relativos aos seguintes parâmetros:

- Paciente (raça, género, idade e peso);
- História de tratamento com anticoagulantes e/ou corticosteroides;
- História clínica e registo de doença;
- Resultados de análises hematológicas e bioquímicas, quando realizados;
- Motivo da intervenção cirúrgica;
- Anestesia ou sedação utilizada durante a intervenção;

Com base nos critérios acima referidos foram pré-selecionados onze animais para o “estudo força” e quinze gatos para o “estudo tempo”. Dos universos de onze e quinze animais selecionados foram respetivamente excluídos dois e quatro candidatos por erros associados ao desenvolvimento da técnica: dois porque não sobrou sangue suficiente para testar o último protocolo do “estudo tempo”; um em cada estudo por erro na contagem dos elementos celulares; um no “estudo força” por remoção de um volume variável de soro ao longo do protocolo e um animal “no estudo tempo” devido à formação de um coágulo durante a colheita de sangue e não ter cumprido o número mínimo de plaquetas requerido. Deste modo, o “estudo força” foi realizado num universo de nove indivíduos saudáveis, enquanto o “estudo tempo” foi conduzido num universo de onze animais saudáveis.

¹⁴ Apesar da contagem fisiológica mínima referida por Silva *et al.* (2012b) ser 300×10^3 plaquetas (PLT) / μL de sangue, vários autores (Weiss & Tvedten, 2012; Rizzi, Clinkenbeard & Meinkoth, 2010) referem que a contagem de plaquetas em felinos é normalmente subestimada, podendo apresentar valores inferiores a 200×10^3 plaquetas (PLT) / μL , tomando-se este valor como o limite mínimo, referenciado por alguns autores como por exemplo Baker (2012).

2.1.2. Recolha de amostras: sedação/ anestesia

Consoante o motivo da intervenção cirúrgica os animais foram submetidos a uma anestesia leve a moderada ou mais profunda, através da administração simples ou de uma associação de anestésicos/sedantes. A anestesia leve a moderada foi induzida em animais submetidos a orquiectomias, na contenção de um animal agitado e agressivo para desparasitação e vacinação e num animal para limpeza cirúrgica de feridas, através da injeção intramuscular de Zoletil® (10mg/kg). Aos animais submetidos a cirurgias que necessitaram de anestésias mais profundas (ovariohisteretomia eletiva, cirurgia oral, cirurgia ortopédica e reavaliações oftalmológicas) foi administrada por via endovenosa uma combinação de drogas para a pré-medicação (Butorfanol e Diazepam) e realizada a indução anestésica com Propofol (5mg/kg), mantida com o anestésico volátil Isoflurano (2 ou 2.5%, com oxigénio a 0.8).

2.1.3. Desenvolvimento dos estudos: produção de PRP

Os estudos desenvolvidos seguiram a mesma metodologia sequencial para que as etapas programadas fossem cumpridas de forma idêntica em todas as amostras analisadas. A descrição que se faz seguidamente das etapas é, por isso, comum aos dois estudos, diferenciando-se nas grandezas das variáveis e no número de protocolos testados, sendo que se estudaram 3 e 4 conjuntos de protocolos respetivamente para o “estudo força” e para o “estudo tempo” (tabelas 5 e 6).

1) Colheita de sangue e determinação do hematócrito: imediatamente antes da intervenção cirúrgica foi colhido um volume de 4,5ml de sangue venoso em cada animal, previamente anestesiado, através da punção asséptica da veia jugular. Nos primeiros doze animais (9 para o “estudo força” e 3 a ser testados no “estudo tempo”), a colheita do sangue foi realizada com recurso a um sistema de colheita estéril a vácuo com uma agulha de 21G, ao qual se acoplou, por intermédio de um adaptador, um tubo de vidro com citrato de sódio tamponado de 0,105 M (3,2%), na proporção de nove partes de sangue para uma parte de solução de citrato (Sistema de colheita de sangue *BD Vacutainer® Safety-Lok™* com adaptador e tubo *BD Vacutainer®* de citrato de sódio 0.105 M; 3,2 %; 4,5 ml). Nos restantes animais 8 gatos do “estudo tempo”), o sangue foi recolhido utilizando agulhas de 23G ou 21G e seringas estéreis de 5 ou 2 ml (agulhas *B.Braun's Sterican®* de bisel longo e seringas *B.Braun's Injekt®Solo* com conexão *luer slip*) e de imediato transferido para os tubos a vácuo, acima referidos. No tubo *BD Vacutainer®*, o sangue colhido foi gentilmente homogeneizado e, na maioria dos casos, foi removido o suficiente para encher um tubo capilar e determinar o microhematócrito.

2) Preparação do PRP: para cada animal, à medida que se iniciou um protocolo, foi removida uma alíquota de 1mL de sangue para um *eppendorf* de plástico, utilizando micropipetas Gilson® de 1000 µL e pontas de plástico descartáveis. Usando uma centrifugadora digital (Centro 4-BL, J.P.SELECTA®), o *eppendorf* foi imediatamente submetido à primeira centrifugação, variando-se a força (100, 200 ou 400g) ou o tempo de centrifugação (5 ou 10 min.), respetivamente para o “estudo força e tempo” (Tabelas 5 e 6). Desta centrifugação resultaram três camadas: uma vermelha no fundo do *eppendorf* (camada de hemácias), outra superior de cor variando entre translúcida a amarelada (PPP) e, por fim, numa posição intermédia, uma camada menor esbranquiçada (CF) (Figura 5).

Figura 5. Separação do sangue em camadas após a primeira centrifugação.



Após a primeira centrifugação o sangue foi dividido em três camadas: plasma, CF e camada de hemácias, respetivamente a camada superior translúcida, a fina camada esbranquiçada e no fundo do tubo a camada vermelha. Figura original.

Inclinando o *eppendorf*, e com auxílio de micropipetas Gilson® de 200 µL e pontas de plástico descartáveis, procedeu-se então à aspiração da maior quantidade possível de PPP e CF (ocasionalmente com algumas células da porção superior da camada de hemácias), ao acondicionamento do conteúdo aspirado num *eppendorf* idêntico e à determinação do seu volume total. Nos estudos realizados foi considerado que, após homogeneizado, o conteúdo aspirado correspondia ao PRP resultante de uma centrifugação, o qual foi designado PRP1. Deste foram retirados 50 µL para análise e o restante foi submetido à segunda

centrifugação, na qual se testou uma força (200, 400 ou 800g) ou tempo de centrifugação (5, 10 ou 15 min.), de acordo com o estudo e com o protocolo seguido. Desta centrifugação obteve-se uma coluna de líquido translúcido ou de cor amarelada onde, frequentemente, se encontravam algumas hemácias depositadas no fundo do *ependorf*. Foi considerado que os 2/3 superiores do líquido correspondiam ao PPP, o qual foi descartado com auxílio de uma pipeta. O plasma remanescente foi levemente agitado para dispersar as plaquetas e homogeneizar a amostra, formando um produto obtido a partir de um protocolo de dupla centrifugação, denominado PRP2. Seguidamente, 50 µL foram retirados de cada amostra PRP2 para proceder à análise celular por microscopia ótica. Com o mesmo objetivo foi removido o mesmo volume de amostra do sangue colhido após terem sido testados todos os protocolos.

2.1.4. Análise das amostras de PRP e sangue colhido: contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias

Neste estudo foi empregue um método manual para a contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias. Para tal, foram utilizadas pequenas amostras do PRP obtido após cada centrifugação e amostras do sangue colhido que foram diluídas e colocadas num instrumento de contagem calibrado (hemacitómetro) denominado câmara de Neubauer modificada e, posteriormente, observadas ao microscópio.

2.1.4.1. Diluição das amostras

Para cada protocolo executado, pequenas frações do PRP/sangue foram sequencialmente pipetadas para 3 tubos previamente identificados, contendo reagentes específicos para a contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas. Para a diluição de hemácias são utilizadas soluções isotónicas e neste caso, como a contagem foi imediata à diluição, utilizou-se soro fisiológico (0.9% NaCl). A solução de Türk foi o reagente escolhido para contabilizar leucócitos pois possui um agente que provoca a lise das membranas celulares e inibe que as hemácias interfiram na contagem de leucócitos, pois não são visualizadas ou surgem apenas como ténues silhuetas, em oposição aos núcleos corados dos leucócitos (Stockham & Scott, 2008; Voigt, 2000). Permitiu-se que os reagentes atuassem, esperando-se dois minutos, após os quais se voltou a homogeneizar as amostras para carregar a câmara de contagem. Para a contagem das plaquetas, as amostras foram diluídas com oxalato de amónia a 1% de forma a provocar a lise das hemácias. Após a hemólise estar completa (aproximadamente 10 minutos), a amostra foi homogeneizada para ser analisada na câmara de Neubauer previamente preparada.

2.1.4.2. Preparação e observação das amostras diluídas na câmara de Neubauer

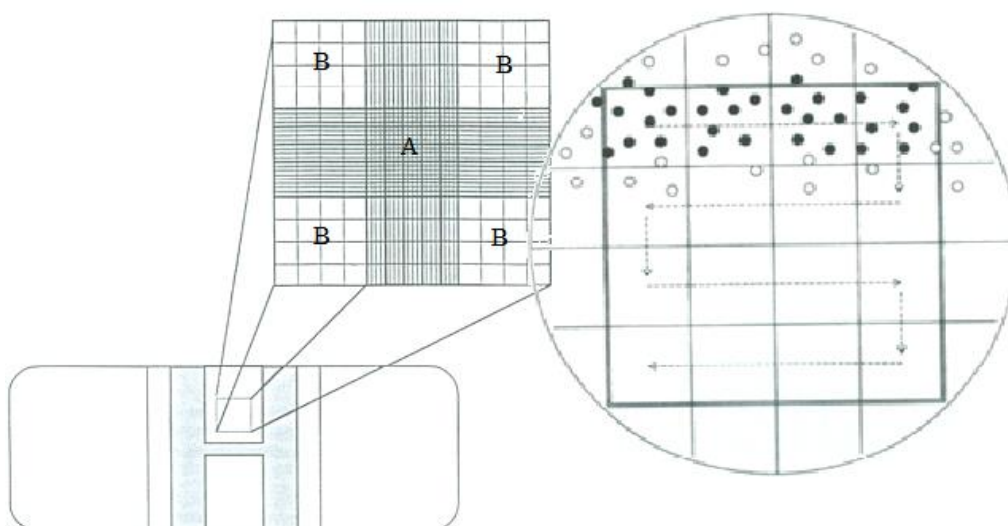
A preparação da câmara pressupõe a sua limpeza e secagem, o que foi realizado pulverizando álcool a 70% e secando com lenços suaves, por forma a não riscar as grelhas de contagem. Após secagem, foi colocada uma pequena lamela humidificando a câmara e deslizando a lamela da extremidade inferior à extremidade superior da câmara, até ficar aderente na região central da mesma. As amostras para a contagem de hemácias e leucócitos foram pipetadas respetivamente na plataforma superior e inferior, colocando a ponta da pipeta no espaço entre a lamela e a plataforma e deixando o líquido fluir lentamente e uniformemente sem deixar transbordar. Quando tal sucedeu, a câmara foi limpa, secada e novamente preenchida com amostra (Voigt, 2000).

Para permitir a sedimentação dos elementos sanguíneos após o preenchimento das grelhas, a câmara de Neubauer foi colocada durante 2 minutos numa caixa de Petri com algodão humedecido com água quente, por forma a simular uma câmara húmida. De seguida a câmara foi colocada na platina e a área da grelha de contagem colocada sob baixa intensidade e iluminação reduzida. Para todas as amostras foi realizada uma sequência de contagem em que primeiro foram contabilizadas as hemácias na grelha superior e depois os leucócitos na grelha inferior. A primeira observação da câmara foi feita com a objetiva de 10X, destinando-se a identificar bolhas de ar, preenchimento incompleto ou a distribuição heterogénea dos elementos sanguíneos. Estas ocorrências alteram a contagem e logo, quando verificadas a câmara foi limpa, secada e novamente preenchida.

Com a ampliação de 10X foi possível observar que a grelha de contagem está dividida em 9 quadrados de 1mmx1mm que constituem diferentes áreas para a contagem de células (Voigt, 2000) (figura 7). A contagem das hemácias foi realizada colocando o quadrado central no centro do campo de observação. Este quadrado contém 25 quadrados menores, cada um dos quais divididos em 16 caixas. Sob uma ampliação de 400X (objetiva de 40) foram observados 5 conjuntos não consecutivos de 16 caixas (Voigt, 2000), sendo que neste estudo se escolheu observar para todas as amostras, os 4 conjuntos dos cantos e o do meio. A observação de cada um foi realizada de forma estandardizada para evitar contar a mesma célula duas vezes ou falhar a contagem de outras: começando no canto superior esquerdo foram contadas as hemácias da primeira caixa, depois da segunda, terceira e quarta caixas, seguindo-se para a caixa imediatamente abaixo e continuando para as caixas da mesma fila, como ilustrado na figura 6. Dentro de cada caixa foi estabelecido que as hemácias que tocavam na linha superior e direita

eram contabilizadas, enquanto qualquer hemácia que tocasse na linha inferior ou esquerda era excluída da contagem. Quando existiam linhas triplas a linha intermédia foi considerada a linha limite. Após as dezasseis caixas serem analisadas, o mesmo processo de contagem foi executado para contabilizar as hemácias nos outros quatro conjuntos de dezasseis caixas. A anotação da quantidade de hemácias observadas foi realizada separadamente para cada conjunto, por forma a evitar que toda a contagem tivesse de ser refeita na ocorrência de um erro. Desta forma foi também possível determinar se existia uma grande discrepância entre as contagens de cada conjunto (quando verificada uma diferença superior a 25 hemácias a câmara foi limpa e novamente preenchida para nova contagem).

Figura 6. Câmara de Neubauer e representação da contagem de elementos sanguíneos nas suas grelhas de contagem.



A contagem de plaquetas e de eritrócitos foi realizada na grelha de contagem assinalada com **A** e a de leucócitos com **B**. As setas indicam a direção do movimento do microscópio. Os círculos preenchidos representam as células contadas nas primeiras quatro caixas enquanto as vazias representam as que não foram contabilizadas. Adaptado de Voigt (2000).

A contagem dos leucócitos começou com a observação geral da câmara para deteção de defeitos de preenchimento, como foi realizado para a contagem de eritrócitos. Sob baixa intensidade foram contabilizados os quatro quadrados maiores dos cantos da câmara (1 mm X 1 mm), seguindo a mesma metodologia e regras aplicadas para a contagem das hemácias. A observação foi realizada com fraca iluminação e fechando o condensador do diafragma do microscópio por

forma a tornar os núcleos dos leucócitos mais distintos, diferenciando-os de resíduos e de outros artefactos no campo de observação (Voigt, 2000) (figuras 6 e 7).

Para a contagem das plaquetas, a câmara de Neubauer previamente preparada foi carregada por capilaridade com a amostra diluída, tendo-se o cuidado para não encher em demasiado a câmara de contagem. A câmara de Neubauer foi de seguida colocada numa câmara húmida (prato de Petri contendo algodão humidificado com água quente) durante 5 a 10 minutos para que as plaquetas sedimentassem (McConnell. 2000a). A contagem das plaquetas foi em seguida realizada segundo a mesma metodologia e regras usadas na contagem de eritrócitos (Voigt, 2000), usando uma lente seca elevada e o condensador descido (McConnell. 2000a) (figuras 6 e 7).

Figura 7. Imagens da observação de plaquetas, leucócitos e hemácias na câmara de Neubauer.



Da esquerda para a direita, com ampliações de 400X na primeira imagem e 100X nas restantes: os pontos negros correspondem respetivamente a plaquetas, a núcleos de leucócitos e a hemácias. Figura original.

2.1.4.3. Cálculo da quantidade total de plaquetas, leucócitos e hemácias nas amostras e no sangue colhido

A fim de determinar o número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas presentes nas amostras de PRP e de sangue, foi necessário considerar em conjunto o número de células observadas, os fatores de diluição empregues e o tamanho das câmaras usadas para a contagem.

a) Cálculo de hemácias e plaquetas:

Uma vez que a contagem de hemácias (GV) e de plaquetas foi realizada na mesma área da câmara, os cálculos para determinar a sua quantidade na amostra podem ser resumidos pela seguinte equação:

$$n^{\circ} \text{ de GV ou PLT} \times n^{\circ} \text{ de quadrados} \times \text{profundidade da câmara} \times \text{diluição}$$

Sendo que o quadrado central usado para a contagem de hemácias e plaquetas tem 1 mm^2 , mas apenas 5 dos 25 quadrados que o constituem são contados, ou seja $1/5$ do mesmo ($\times 5^a$); que o espaço entre a câmara e a lamela é $0,1 \text{ mm}$ ($\times 10^b$) e que o rácio de diluição foi $1:200$ ($\times 200^c$). Tendo em conta estas variáveis e a equação acima referida, efetuaram-se os seguintes cálculos, sendo que n° de hemácias ou de plaquetas variava consoante a sua contagem:

$$n^{\circ} \text{ de GV ou PLT} \times (5^a \times 10^b \times 200^c) =$$

$$n^{\circ} \text{ de GV ou PLT} \times (1000) =$$

$$n^{\circ} \text{ de GV ou PLT} / \mu\text{L}$$

b) Cálculo de leucócitos

A quantidade de leucócitos (GB) nas amostras foi calculado por intermédio da seguinte equação:

$$n^{\circ} \text{ de núcleos} \times n^{\circ} \text{ de quadrados} \times \text{profundidade da câmara} \times \text{diluição}$$

Sendo que foram contados os núcleos celulares nos 4 quadrados maiores de 1 mm^2 ($\times 1/4^a$), a distância entre a câmara e a lamela é $0,1 \text{ mm}$ ($\times 10^b$) e a diluição foi de $1:20$ ($\times 20^c$), temos:

$$\text{GB} = n \times 50 = \text{cél}/\mu\text{l} (\text{mm}^3)$$

$$n^{\circ} \text{ de núcleos} \times (1/4^a \times 10^b \times 20^c) =$$

$$n^{\circ} \text{ de núcleos} \times \frac{10 \times 20}{4} =$$

$$n^{\circ} \text{ de núcleos} \times 50 =$$

$$n^{\circ} \text{ de leucócitos} / \mu\text{L}$$

2.2. Análise dos dados

2.2.1. Organização dos dados das amostras

Cada indivíduo apresenta uma amostra de sangue que foi submetida a um dos estudos, sendo que os primeiros nove animais foram usados na “estudo força” e os restantes 11 no “estudo tempo”. Os dados dos gatos bem como os resultados obtidos nos estudos foram organizados em duas bases de dados criadas no programa Microsoft Office Excel[®] 2007, uma para cada estudo.

2.2.2. Dados relativos ao protocolo de preparação de PRP

Quando necessário, para facilitar a leitura e descrição dos resultados, foram atribuídas letras e números a cada amostra analisada, com base no protocolo (A, B C e D – no “estudo tempo”) e na centrifugação (1 – primeira centrifugação, 2 – segunda centrifugação) testados, tendo a amostra de sangue apenas sido identificada com a letra S.

2.2.3. Dados relativos à contagem de células

Em cada estudo, os resultados obtidos respeitantes à contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias de cada amostra estão distribuídos por três grupos principais (apresentados em seguida), tendo sido estabelecidas observações entre si (ver Resultados):

- Sangue: Amostra de sangue não centrifugada (controlo do estudo);
- PRP1: PRP constituído pelo PPP e CF (e ocasionalmente com algumas células da camada mais superior de hemácias), resultantes da (primeira) centrifugação do sangue;
- PRP2: PRP obtido pela centrifugação do PRP1 (segunda centrifugação da amostra de sangue), após descarte de 2/3 de PPP e homogeneização do conteúdo remanescente.

2.2.4. Análise estatística

Para a realização deste trabalho recorreu-se a métodos de estatística descritiva e a testes de hipóteses para a comparação de contagens médias de plaquetas, leucócitos e hemácias. No que respeita à estatística descritiva, foram calculadas medidas de descrição e de localização, bem como a média e o desvio-padrão (dp) para as variáveis quantitativas. Para a comparação de contagens e proporções foi realizada a análise de variância (ANOVA) com o intuito de testar se as médias dos elementos sanguíneos obtidas no sangue e nos PRP foi idêntica (hipótese nula - H_0) ou não. O teste paramétrico adotado foi a ANOVA de medições repetidas a um fator (*one-way ANOVA with repeated measures*) uma vez que para cada indivíduo foram feitas medições

em todos os níveis (grupos de força ou de tempos) da variável em estudo (variável força (g) ou tempo (min.)). Esta análise foi seguida do teste *post hoc* de Tukey, quando a ANOVA sugeria uma diferença significativa entre grupos. Para a comparação das contagens médias nos PRP1 e nos PRP2 foi aplicado o teste estatístico não-paramétrico de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test*), pois os resultados estão relacionados, no sentido em que a amostra estudada após a primeira centrifugação é avaliada para a mesma variável (força ou tempo) após a segunda centrifugação.

Estes testes de hipóteses foram realizados utilizando o *software* de estatística e a linguagem de programação R, tendo-se estabelecido existirem evidências estatísticas suficientes para rejeitar a hipótese nula quando o valor de p (probabilidade de significância) resultante foi <0.05 (nível de significância). Ou seja, nesses casos rejeitou-se a H_0 , pois existia uma pequena possibilidade dos resultados observados se deverem ao acaso, considerando-se estatisticamente significativos. Pelo contrário, quando o valor de p foi superior a 0.05 não se consideraram existir evidências estatísticas suficientes para rejeitar a hipótese nula o que, no entanto, não significa que seja verdadeira (Maroco, 2007; Petrie & Watson, 1999).

3. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

3.1. “Estudo força”

3.1.1. Caracterização dos animais

A população utilizada no “estudo força” foi composta por nove gatos de raça indeterminada clinicamente saudáveis, dos quais 7 eram machos e 2 eram fêmeas. O peso médio foi $3.8 \text{ kg} \pm 0.59 \text{ kg}$ e a idade média foi $2.7 \text{ anos} \pm 2 \text{ anos}$, sendo a mínima de 5 meses e a máxima de 5 anos.

3.1.2. Caracterização das amostras de sangue (não centrifugado)

A contagem basal de plaquetas no sangue colhido aos 9 gatos variou de 200 a $470 \times 10^3/\mu\text{L}$, sendo a média de $291.11 \times 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{L} \pm 83.732 \times 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{L}$. A média da contagem basal de hemácias e leucócitos no sangue foi respetivamente $7061.11 \times 10^3 \text{ GV}/\mu\text{L} \pm 1850.962 \times 10^3 \text{ GV}/\mu\text{L}$ e de $9.42 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 4.64865 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$ (Tabela 7).

Tabela 7. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão das contagens de plaquetas, leucócitos e hemácias nas amostras de sangue colhidas aos 9 gatos em estudo.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DOS ELEMENTOS SANGUÍNEOS			
Elementos Sanguíneos	Valor mínimo (x 10 ³ /μL)	Valor máximo (x 10 ³ /μL)	Média ± dp (x 10 ³ /μL)
Plaquetas	200	470	291.11 ± 83.732
Leucócitos	2.9	19.85	9.42 ± 4.64865
Hemácias	5050	10800	7061.111 ± 1850.962

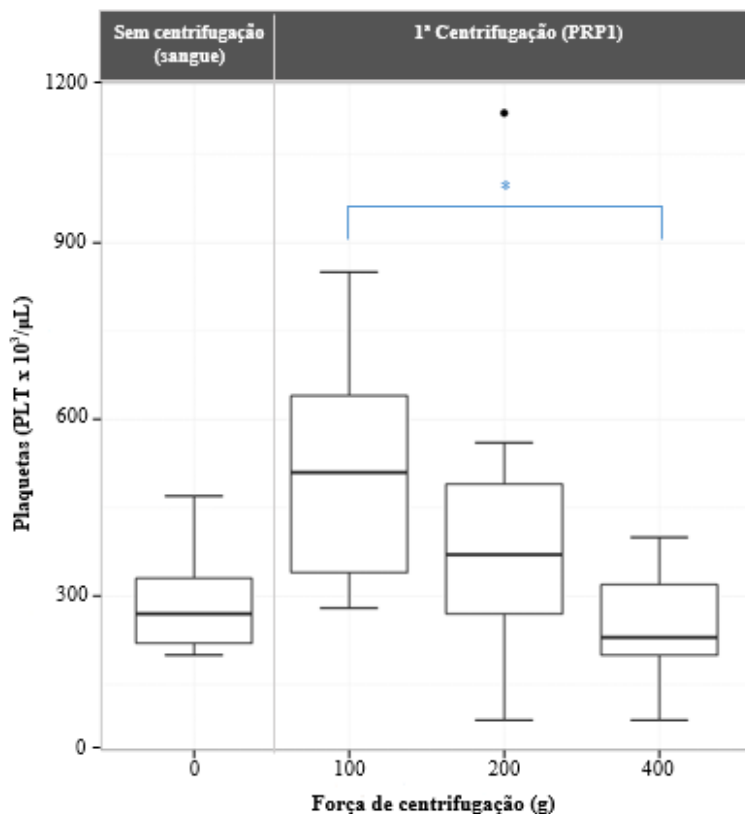
3.1.3. Caracterização das amostras PRP1

3.1.3.1. Contagem de plaquetas

O gráfico 2 apresenta a distribuição do total das contagens de plaquetas no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes da primeira centrifugação (A, B e C), consoante a força g aplicada (respetivamente 100, 200 e 400g). É possível observar que, à exceção do grupo C, os PRP resultantes da primeira centrifugação apresentam maior contagem de plaquetas relativamente ao sangue (caixas e medianas – linha horizontal negra- superiores em A e B), sendo que A regista a maior contagem média de plaquetas ($503.33 \times 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{L} \pm 192.483 \times 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{L}$), seguida de B ($425.56 \times 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{L} \pm 295.851 \times 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{L}$) no qual se observa um *outlier* ($1120 \times 10^3 \text{ plaquetas}/\mu\text{L}$). É também possível observar que o valor mínimo de plaquetas contabilizadas é igual para os grupos B e C ($90 \times 10^3 \text{ plaquetas}/\mu\text{L}$), tendo o último contabilizado em média menos plaquetas ($246.67 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 100.499 \times 10^3/\mu\text{L}$) (tabela 8).

Quanto à comparação entre as médias das contagens de plaquetas nos diferentes grupos, o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas conduz à rejeição da hipótese nula ($p < 0.05$), sendo consideradas significativas as diferenças entre as médias obtidas pelo menos entre dois dos grupos. Segundo os resultados dos testes *post-hoc* de Tukey, apenas existe diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos A e C ($p < 0.05$), não existindo relação significativa entre os restantes grupos (tabela 24 do ANEXO IV). Da análise dos resultados estatísticos conclui-se que existe diferença significativa entre a menor e maior força de centrifugação, correspondendo respetivamente aos grupos em que se observa a maior e menor contagem média de plaquetas. No entanto, os resultados indicam também que a concentração de plaquetas em A não é significativa, pois a contagem média de plaquetas em A é apenas significativamente superior à do sangue para um valor de p superior ao considerado neste estudo ($p = 0.1$) por diminuir a “segurança” com que se rejeita a H_0 , falhando desta forma em refutar a H_0 que enuncia uma contagem média de plaquetas igual entre os grupos.

Gráfico 2. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (0 g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na primeira centrifugação (100, 200 e 400g).



Dados recolhidos a partir de uma população de 9 gatos. * Diferença significativa entre o grupo A (100g) e C (400g) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p < 0.05$). ● outlier

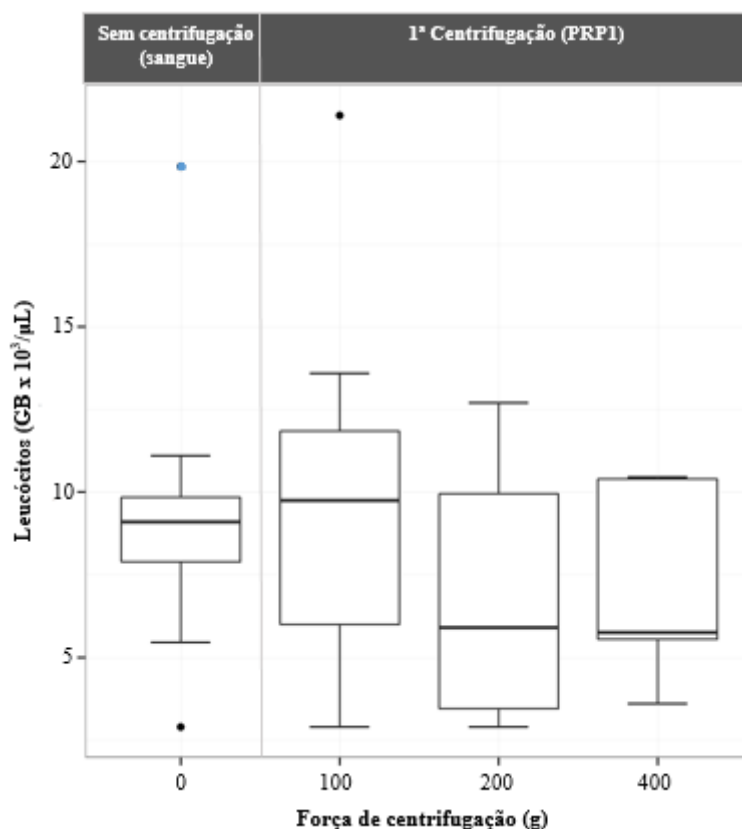
Tabela 8. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 3 PRP (A, B e C) resultantes da centrifugação de 3 amostras de sangue colhidas a cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (100, 200 e 400g).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS				
Grupo	n	Valor mínimo (PLT x 10 ³ /µL)	Valor máximo (PLT x 10 ³ /µL)	Média ± dp (PLT x 10 ³ /µL)
A (100g)	9	280	850	503.33 ± 192.484
B (200g)	9	90	1120	425.56 ± 295.851
C (400g)	9	90	400	246.67 ± 100.499

3.1.3.2. Caracterização da contagem de leucócitos

No que diz respeito às distribuições das contagens de leucócitos no sangue e nos grupos PRP2 resultantes das diferentes forças de centrifugação, é possível observar no gráfico 3 que, à parte dos valores atípicos, os grupos apresentam uma posição semelhante, contabilizando entre 0.29 a 21.40×10^3 GB/ μL (contagens mínima e máxima de GB, respetivamente observados nos grupos sangue, A e B e no grupo A - tabelas 7 e 9). É também possível observar que as medianas dos grupos B e C estão muito próximas, o que também se verifica relativamente às medianas do sangue e do grupo A nos quais se observam valores atípicos.

Gráfico 3. Diagrama de extremos e de quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na primeira centrifugação (100, 200 e 400g).



Dados recolhidos a partir de uma população de 9 gatos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p > 0.05$). • outliers • extremo

Resultados semelhantes foram obtidos relativamente às contagens médias dos grupos, sendo que, apesar das contagens médias dos grupos sangue e A serem superiores ($\bar{x}_S=9.42 \times 10^3$ GB/ $\mu\text{L} \pm 4.648 \times 10^3$ GB/ μL e $\bar{x}_A=9.77 \times 10^3$ GB/ $\mu\text{L} \pm 5.556 \times 10^3$ GB/ μL , respetivamente), não diferem em grande magnitude das contagens médias obtidas em B e C ($\bar{x}_B=6.81 \times 10^3$ GB/ $\mu\text{L} \pm 3.634 \times 10^3$ GB/ μL e $\bar{x}_C=6.99 \times 10^3$ GB/ $\mu\text{L} \pm 2.785 \times 10^3$ GB/ μL , respetivamente). Tal como a apreciação do gráfico sugere, o resultado do teste ANOVA com medições repetidas a um fator comprova não existir uma diferença significativa entre as médias obtidas ($p > 0.05$, tabela 25 do Anexo IV).

Tabela 9. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 3 PRP (A, B e C) resultantes da centrifugação das 3 amostras de sangue colhidas a cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (100, 200 e 300g).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS				
Grupo	n	Valor mínimo (PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$)	Valor máximo (PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$)	Média \pm dp (PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$)
A (100g)	9	2.9	21.40	9.77 \pm 5.556
B (200g)	9	2.9	12.70	6.81 \pm 3.634
C (400g)	9	3.6	10.45	6.99 \pm 2.785

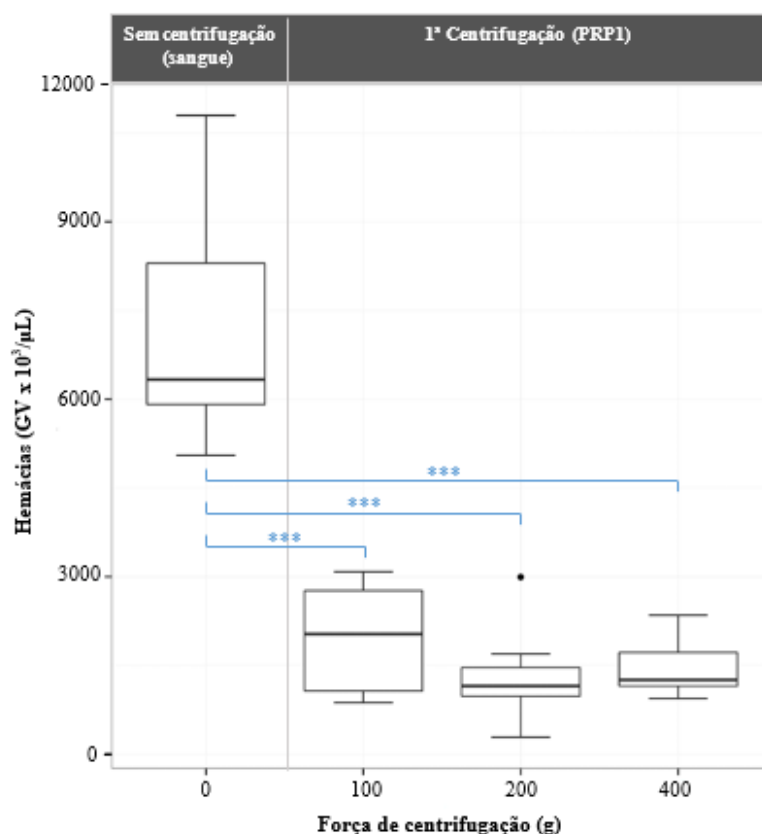
3.1.3.3. Caracterização da contagem de hemácias

O gráfico 4 ilustra a distribuição das frequências de hemácias observadas antes e após as 3 centrifugações do sangue (100, 200 e 400g). Neste é evidente a redução da contagem de hemácias nos PRP obtidos após centrifugação do sangue, que apresenta a distribuição de contagens mais variada. Relativamente aos grupos PRP1 é possível observar que A apresenta uma distribuição de contagens de hemácias superior aos grupos B e C, sendo que estes apresentam distribuições e medianas semelhantes. O único *outlier* é observado em B, porém a maior frequência de hemácias é observada em A.

O estudo estatístico da contagem média de hemácias (GV) no sangue e nos PRP resultantes da primeira centrifugação (tabela 26 do ANEXO IV), verificou que o sangue continha a maior contagem média de hemácias ($\bar{x}_S= 7061.11 \times 10^3$ GV/ $\mu\text{L} \pm 1850.962 \times 10^3$ GV/ μL) e que a sua centrifugação conduziu a uma diminuição significativa e de elevada magnitude na contagem de hemácias nos PRP, tal como evidenciada no gráfico 4. A maior diminuição da contagem média de hemácias relativamente ao sangue foi registada pelo grupo B, contabilizando 1264.44×10^3 GV/ $\mu\text{L} \pm 799.111 \times 10^3$ GV/ μL ($p < 0.01$), seguindo-se pelo grupo C com 1460×10^3 GV/ $\mu\text{L} \pm 480.729 \times 10^3$ GV/ μL ($p < 0.01$) e por fim, pelo grupo A com 1898.89×10^3 GV/ $\mu\text{L} \pm 896.402 \times 10^3$ GV/ μL ($p < 0.01$). Os resultados da comparação das contagens médias entre estes

três grupos PRP (tabela 10) revelam também não existir diferenças significativas entre as contagens médias de hemácias nos PRP resultantes de centrifugações com diferentes velocidades.

Gráfico 4. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GV) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na primeira centrifugação (100, 200 e 400g).



Dados recolhidos a partir de uma população de 9 gatos. *** Diferença significativa entre o sangue e os grupos de PRP (A, B e C) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p < 0.001$). • outlier

Tabela 10. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 3 PRP (A, B e C) resultantes da centrifugação das 3 amostras de sangue colhidas a cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (100, 200 e 400g).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE HEMÁCIAS				
Grupo	n	Valor mínimo (GVx10 ³ /μL)	Valor máximo (GVx10 ³ /μL)	Média ± dp (GVx10 ³ /μL)
A (100g)	9	870	3080	1898.89 ± 896.402
B (200g)	9	280	2990	1264.44 ± 799.111
C (400g)	9	940	2350	1460.00 ± 480.729

3.1.4. Caracterização das amostras PRP2

3.1.4.1. Caracterização da contagem de plaquetas

Avaliando as contagens de plaquetas nos três PRP2 obtidos pela centrifugação dos PRP1 a diferentes forças (A – 200g, B – 400g e C - 800g), obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 11. Da análise desta tabela verifica-se que a maior contagem média de plaquetas foi novamente obtida no grupo A, com 90.44×10^3 PLT +/- 128.883×10^3 PLT/uL, seguindo-se o grupo C e o grupo B respetivamente com 78.89×10^3 PLT/uL \pm 78.014×10^3 PLT/uL e 63.33×10^3 PLT/uL \pm 75.993×10^3 PLT/uL.

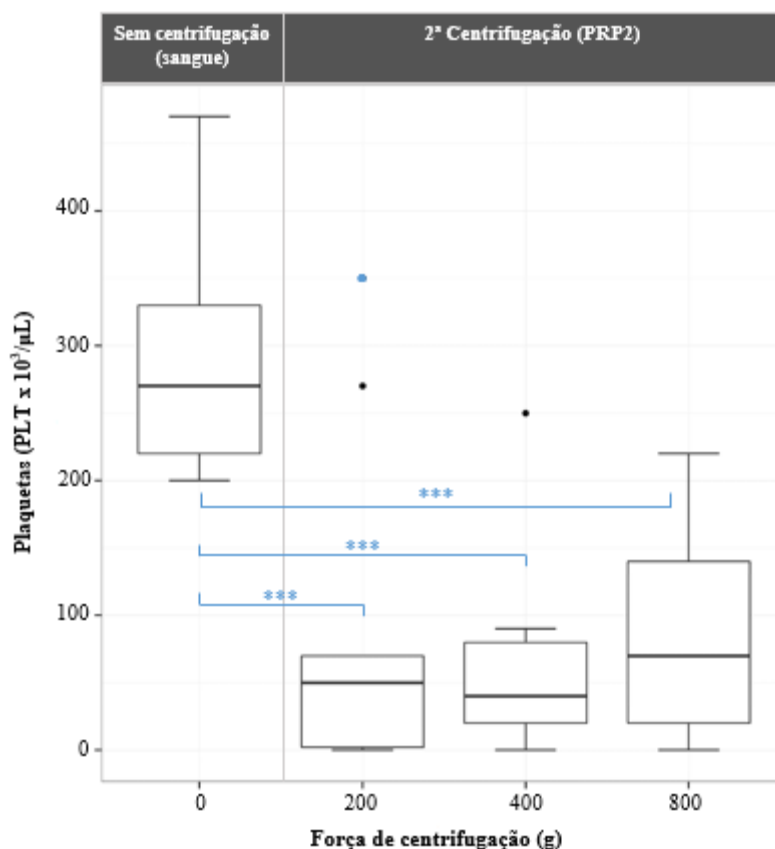
Tabela 11. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 3 PRP2 (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das 3 amostras PRP1 de cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (200, 400 e 800g).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS				
Grupo	n	Valor mínimo (PLT $\times 10^3/\mu$ L)	Valor máximo (PLT $\times 10^3/\mu$ L)	Média \pm dp (PLT $\times 10^3/\mu$ L)
A (200g)	9	0	350	90.44 ± 128.883
B (400g)	9	0	250	63.33 ± 75.993
C (800g)	9	0	220	78.89 ± 78.014

Analisando a distribuição das contagens de plaquetas consoante a aplicação (ou não) de diferentes forças de centrifugação (gráfico 5) observa-se que, apesar de apresentarem distribuições diferentes, as medianas dos grupos PRP2 apresentam posições semelhantes, sendo que A e B possuem as medianas mais próximas. Nestes grupos observam-se valores atípicos que assumem o valor máximo de plaquetas contabilizadas nos grupos PRP2. Observa-se também que a ausência de plaquetas nas contagens é o valor mínimo para todos os grupos de forças.

Relativamente ao grupo sangue, a interpretação do gráfico evidencia a distribuição de contagens de plaquetas superiores para a maioria das observações. Quando comparadas as contagens médias nos grupos PRP2 com a contagem média de plaquetas no sangue pelos testes estatísticos ANOVA e Tukey (tabela 27 do ANEXO IV), verifica-se que as médias dos grupos PRP2 são significativamente inferiores, obtendo-se um valor de $p < 0.01$. No entanto, os valores de p para as comparações das médias entre os grupos PRP2 sugerem não existir evidências suficientes para rejeitar a H_0 , sugerindo não existir diferença entre as médias obtidas por diferentes forças de centrifugação.

Gráfico 5. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na segunda centrifugação (200, 400 e 800g).



Dados recolhidos a partir dos mesmos 9 gatos. *** Diferença significativa entre o sangue e os grupos de PRP (A, B e C) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p < 0.001$). • outliers • extremo

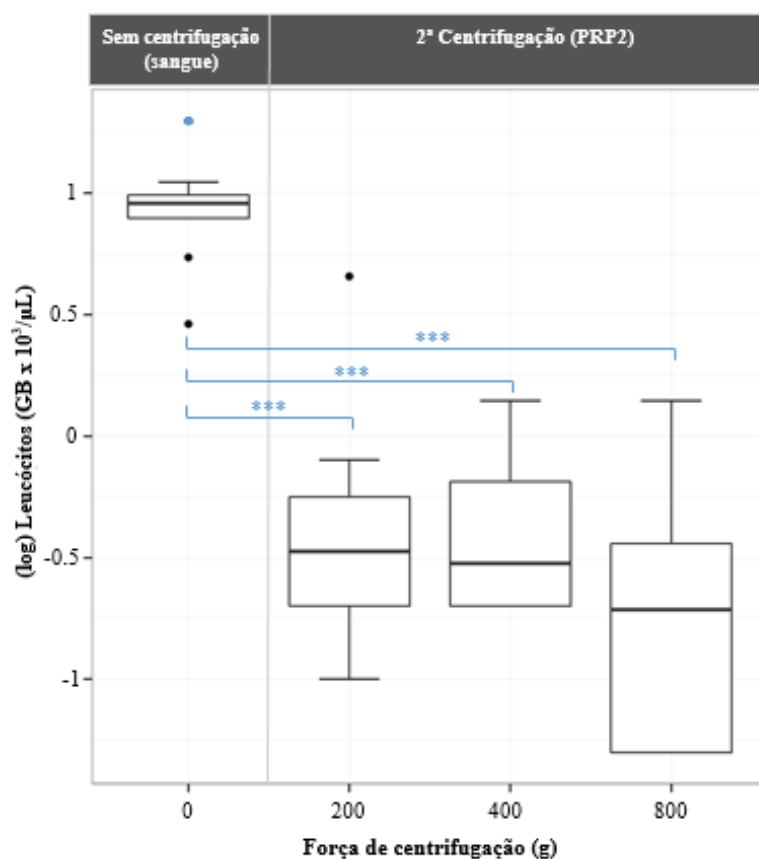
3.1.4.2. Caracterização da contagem de leucócitos

Analisando a distribuição das contagens de hemácias por grupos PRP2 (A – 100g, B – 200g e C- 400g) relativamente ao grupo sangue (não centrifugado) (gráfico 6), verifica-se que as suas medianas (linha horizontal a negrito) e quartis apresentam uma posição inferior, podendo indicar uma redução significativa de células nas contagens. Os resultados da comparação entre a contagem média de leucócitos no sangue ($\bar{x}S=9.42 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 4.648 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$) e nos grupos PRP, comprova existir uma diferença significativa entre as contagens de leucócitos antes e após a centrifugação do sangue ($p < 0.01$) (tabela 28 do ANEXO IV).

Comparando individualmente os grupos A e B, parece não existir diferença significativa entre si pois as suas medianas estão próximas. Em B observa-se uma distribuição de contagens de leucócitos superior à observada em A, no entanto o grupo A apresenta o único outlier (4.55×10^3

GB/ μL) nos grupos PRP. No grupo C observa-se a maior dispersão de contagens de leucócitos, mas quando é comparada a sua contagem média ($\bar{x}_C=0.367 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 0.514 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$) com as dos restantes grupos PRP2 ($\bar{x}_A=0.78 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 1.433 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$; $\bar{x}_B=0.31 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 0.463 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$) verifica-se não serem muito distintas, apresentando uma diferença ligeira relativamente à contagem média de B (tabela 12). Os resultados relativos à comparação das médias de contagens de hemácias comprovam que a diferença entre os grupos PRP2 não é significativa ($p > 0.05$, tabela 29 do ANEXO IV).

Gráfico 6. Diagrama de extremos e quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na segunda centrifugação (200, 400 e 800g).



Dados recolhidos a partir de uma população de 9 gatos. *** Diferença significativa entre o sangue e os grupos de PRP (A, B e C) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p < 0.001$). • outliers • extremo

Tabela 12. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 3 PRP2 (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das 3 amostras PRP1 de cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (200, 400 e 800g).

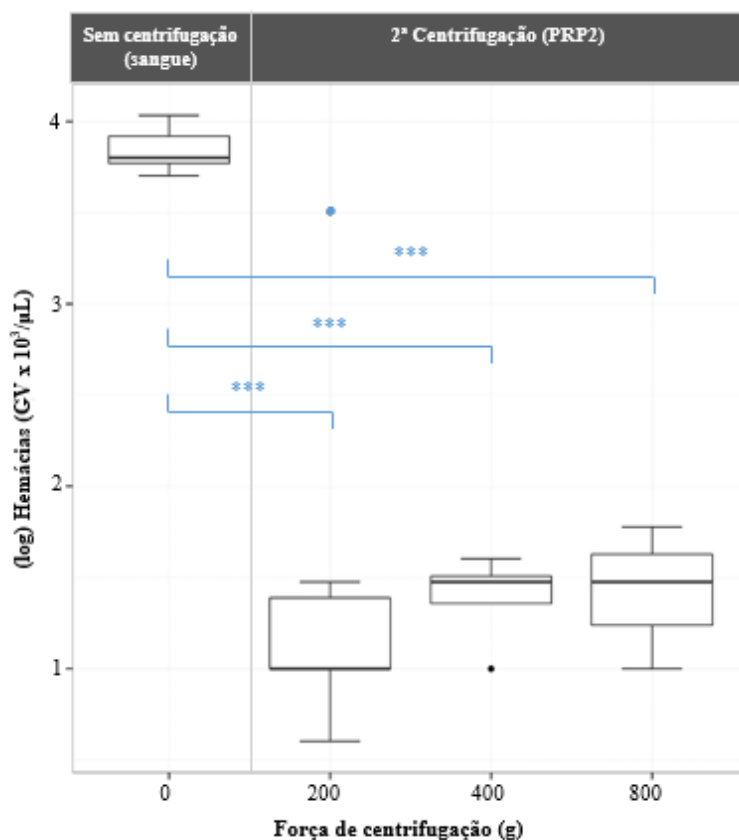
ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS				
Grupo	n	Valor mínimo (GBx10 ³ /μL)	Valor máximo (GBx10 ³ /μL)	Média ± dp (GBx10 ³ /μL)
A (200g)	9	0	4.55	0.78 ± 1.433
B (400g)	9	0	1.4	0.31 ± 0.463
C (800g)	9	0	1.4	0.37 ± 0.514

3.1.4.3. Caracterização da contagem de hemácias

Com base na distribuição das contagens de hemácias representadas no gráfico 7 é possível verificar que o grupo sangue apresenta contagens muito superiores às dos grupos PRP2, sugerindo, tal como a grande diferença entre a contagem média de hemácias no sangue ($\bar{x}_s=363.78 \times 10^3$ GV/μL ± 1059.87x10³ GB/μL) e nos grupos PRP2 (tabela 13), que a diminuição da contagem de hemácias após a centrifugação seja significativa. Os resultados da análise de variância e do teste *post-hoc* evidenciam que esta diferença é bastante significativa, obtendo-se um valor de $p < 0.01$ (tabela 29, ANEXO IV).

Quanto aos grupos PRP, o grupo A regista uma contagem média superior às contagens médias de B e C (tabela 13), cujas contagens médias aproximadas sugerem não existir diferença significativa entre si. Pela observação do gráfico é possível verificar que os grupos B e C têm uma mediana e um valor mínimo idênticos, o que mais uma vez sugere que a distribuição das suas contagens não seja significativamente diferente. No grupo A observa-se a maior distribuição de contagens de hemácias e um extremo. A avaliação dos valores p referentes às comparações de médias entre os grupos PRP2 mostram não existir evidências suficientes para considerar as diferenças entre as contagens médias de hemácias resultantes das diferentes forças de centrifugação, estatisticamente significativas ($p > 0.05$; tabela 30 do ANEXO IV).

Gráfico 7. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GV) no sangue não centrifugado (0g) e nos PRP resultantes das três diferentes forças testadas na segunda centrifugação (200, 400 e 800g).



Dados recolhidos a partir de uma população de 9 gatos. *** Diferença significativa entre o sangue e os grupos de PRP (A, B e C) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p < 0.001$). • outliers • extremo

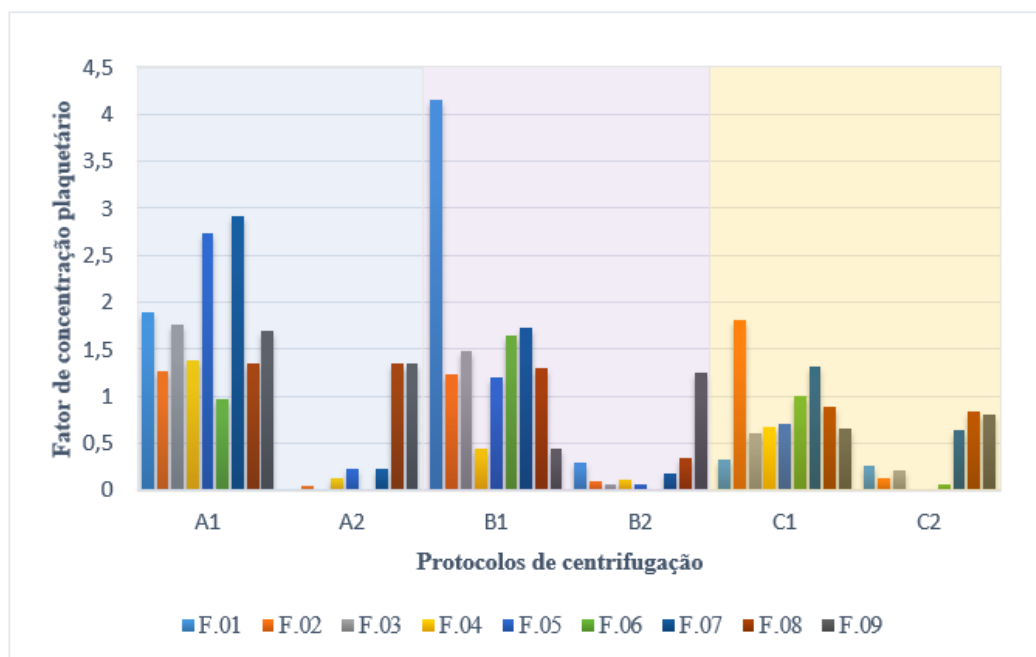
Tabela 13. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 3 PRP2 (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das 3 amostras PRP1 de cada um dos 9 gatos, submetidas a forças diferentes (200, 400 e 800g).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE HEMÁCIAS				
Grupo	n	Valor mínimo ($PLT \times 10^3/\mu L$)	Valor máximo ($PLT \times 10^3/\mu L$)	Média \pm dp ($PLT \times 10^3/\mu L$)
A (200g)	9	0	3190	363.78 ± 1059.888
B (400g)	9	0	40	12.22 ± 16.415
C (800g)	9	0	60	11.11 ± 20.883

3.1.5. Caracterização dos resultados dos PRP1 e PRP2

Comparando as contagens médias de plaquetas obtidas entre os PRP, verifica-se pelos resultados do teste de Wilcoxon (tabela 30 do ANEXO IV), que as contagens obtidas nos protocolos testados na segunda centrifugação (200, 400 e 800g) são significativamente inferiores às obtidas nos protocolos da primeira centrifugação (100, 200 e 400g), obtendo-se um valor de $p < 0.001$. Apesar das contagens da primeira centrifugação não serem significativamente diferentes das contagens no sangue, observou-se uma redução significativa entre a contagem média de A1 (100g) e C1 (400g) (tabela 24 do ANEXO IV), verificando-se que a força de centrifugação menor (100g) foi mais eficaz na concentração de plaquetas relativamente à maior força testada (400g) na primeira centrifugação, contabilizando em média 1,77 vezes mais plaquetas que no sangue. Adicionalmente, na força A1 observaram-se as maiores contagens de plaquetas, sendo que dos nove gatos do estudo, 6 (66.7%) contabilizaram entre 1.35 a 2.7 mais plaquetas que no sangue (fator de concentração plaquetária) (gráfico 8). Consequentemente, as forças 100 e 200g do protocolo A foram escolhidas para serem aplicadas respetivamente na primeira e na segunda centrifugação do “estudo tempo”.

Gráfico 8. Contagens de plaquetas no PRP relativamente à contagem no sangue (fator de concentração plaquetária) de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 correspondem respetivamente às forças 100, 200 e 400g da primeira centrifugação de 5 minutos e A2, B2 e C2 às forças 200, 400 e 800 da segunda centrifugação de 10 minutos.



Relativamente à contagem de leucócitos e hemácias, observa-se uma tendência semelhante à observada nas plaquetas: 5 dos 9 gatos (55,6%) registaram as maiores contagens no mesmo protocolo, 4 animais para o A1, e um animal para o B1 (gráficos 9 e 10). À exceção de uma contagem de plaquetas, todos os animais apresentaram contagens menores na segunda centrifugação, igualando em muitos dos protocolos, o valor mínimo de zero elementos sanguíneos. Quanto a valores atípicos, verificou-se também que o extremo observado nas contagens de leucócitos no sangue, foi registado no mesmo gato que apresenta *outliers* na primeira centrifugação, um na contagem de leucócitos em A1 e outro na contagem de plaquetas de B1, o qual corresponde ao maior fator de concentração plaquetária, contabilizando 4,5 vezes mais plaquetas que no sangue (gráficos 8 e 9). Contudo, a análise estatística não encontrou diferenças significativas entre o sangue e os PRP1 ou entre estes (tabelas 26, 29 e 31 do ANEXO IV), observando-se apenas uma redução significativa nas contagens de leucócitos após a segunda centrifugação ($p < 0.01$; tabela 28 do ANEXO IV). Já as contagens de hemácias foram significativamente inferiores às contagens após cada centrifugação, obtendo um valor de $p < 0.001$ (tabelas 26, 29 e 30 do ANEXO IV).

Gráfico 9. Contagens de leucócitos no sangue e PRPs em cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 correspondem respetivamente às forças 100, 200 e 400g da primeira centrifugação de 5 minutos e A2, B2 e C2 às forças 200, 400 e 800 da segunda centrifugação de 10 minutos.

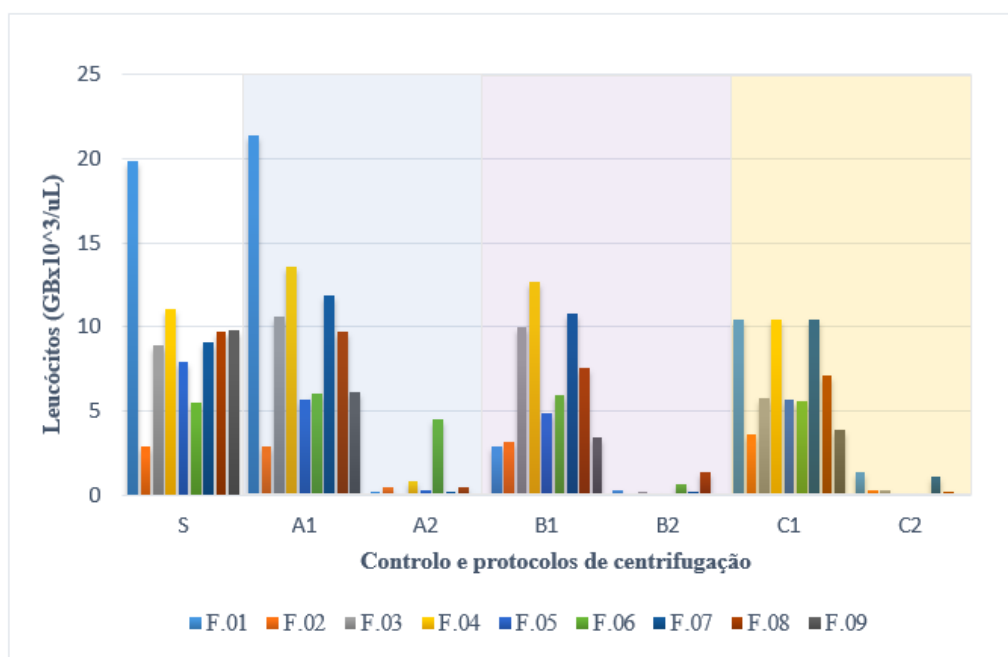
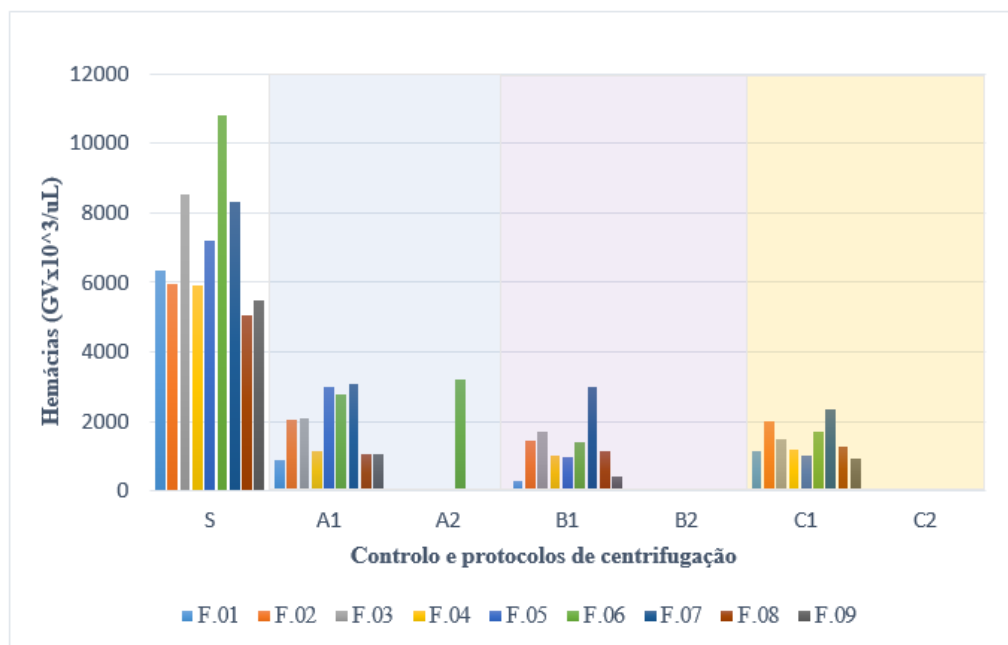


Gráfico 10. Contagens de hemácias no sangue e PRPs em cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 correspondem respectivamente às forças 100, 200 e 400g da primeira centrifugação de 5 minutos e A2, B2 e C2 às forças 200, 400 e 800 da segunda centrifugação de 10 minutos.



3.2. “Estudo tempo”

3.2.1. Caracterização dos pacientes

Do total dos 11 gatos clinicamente saudáveis que participaram no “estudo tempo”, a maioria era de raça indeterminada (81.8%), sendo 1 de raça Persa e 1 Siamês. Em relação ao gênero, 8 animais eram machos e 3 fêmeas. O peso médio foi $4.3kg \pm 1.12kg$ e a idade média foi 2.8 anos ± 3 anos, sendo a mínima de 5 meses e a máxima de 11 anos.

3.3.2. Caracterização das amostras de sangue (não centrifugado)

A contagem de plaquetas no “estudo tempo” variou entre $210 \times 10^3 PLT / \mu L$ e $630 \times 10^3 PLT / \mu L$, registrando uma contagem média de $407.27 \times 10^3 PLT / \mu L \pm 105.270 \times 10^3 PLT / \mu L$ nas 11 amostras de sangue colhidas aos gatos em estudo. Relativamente à contagem média de hemácias e de leucócitos, contabilizaram-se respectivamente $5952.36 \times 10^3 GV / \mu L \pm 1931.786 \times 10^3 GV / \mu L$ e $6.70 \times 10^3 GB / \mu L \pm 4.585 \times 10^3 GB / \mu L$ (tabela 14).

Tabela 14. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão das contagens de plaquetas, leucócitos e hemácias nas amostras de sangue colhidas aos 11 gatos em estudo.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DOS ELEMENTOS SANGUÍNEOS			
Elementos sanguíneos	Valor mínimo (x10 ³ /μL)	Valor máximo (x10 ³ /μL)	Média ± dp (x10 ³ /μL)
Plaquetas	210	630	407.2727 ± 105.270
Leucócitos	2.1	18.2	6.70 ± 4.585
Hemácias	1106	8830	5952.36 ± 1931.786

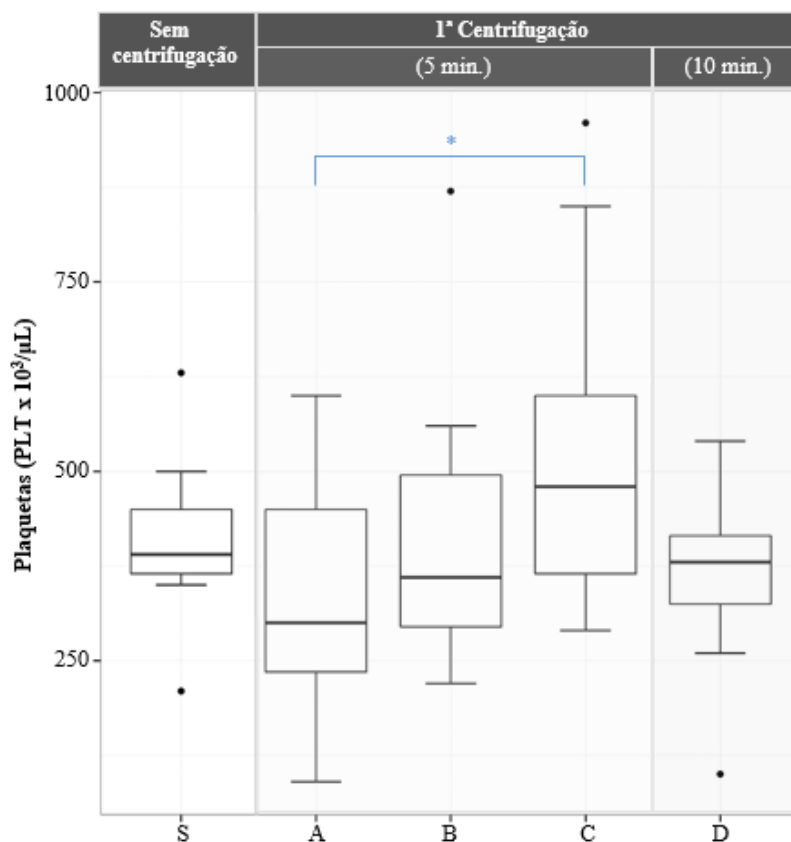
3.1.6. Caracterização das amostras PRP1

3.1.6.1. Caracterização da contagem de plaquetas

No gráfico 11 estão representadas todas as contagens de plaquetas dos 11 animais envolvidos no estudo, distribuídas consoante os diferentes tempos de centrifugação (0 – não centrifugado, 5 e 15 min.). Quanto à posição das caixas e medianas dos grupos PRP1 submetidos a centrifugações de 5 minutos (A, B e C), verifica-se uma subida de A (com contagens inferiores às do sangue) para C, o único grupo que apresenta uma mediana superior à do sangue e portanto, onde se observaram as maiores contagens plaquetárias. Relativamente ao grupo de amostras centrifugadas durante 10 minutos (D), as contagens obtidas voltam a ser menores, sendo que este grupo apresenta uma mediana aproximada à observada em B. Observam-se *outliers* em todos os grupos, excetuando o grupo A, no qual se observa a menor contagem de plaquetas (tabela 15). Também pela análise das contagens médias de plaquetas nos grupos PRP1, se verifica que de A para C se obtêm gradualmente contagens médias de plaquetas superiores e que em D diminuem (tabela 15).

Os resultados do teste ANOVA com medidas repetidas revelam existir uma diferença, embora pouco significativa, entre pelo menos duas contagens médias de plaquetas no sangue. Os resultados do teste de *Tukey* revelam não existir evidências suficientes para considerar significativas as diferenças entre as contagens médias de plaquetas no sangue e os PRP após uma centrifugação de 5 ou 10 minutos. No entanto, a análise estatística revela existir uma diferença significativa entre as contagens médias de plaquetas do grupo A e C, respetivamente, os grupos PRP1 resultantes de uma centrifugação de 5 minutos com menor e maiores contagens médias plaquetárias (tabela 31 do ANEXO V).

Gráfico 11. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (S) e nos PRP resultantes da centrifugação do sangue a 100g e a diferentes tempos (5 e 10 min.).



Dados recolhidos a partir de uma população de 11 gatos. * Diferença significativa entre A e C de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p < 0.05$). • outliers

Tabela 15. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (5, 5, 5 e 10 min., respetivamente).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS				
Grupo	n	Valor mínimo (PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$)	Valor máximo (PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$)	Média \pm dp (PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$)
A (5 min.)	11	90	600	328.18 \pm 154.261
B (5 min.)	11	220	870	418.18 \pm 185.570
C (5 min.)	11	290	960	532.73 \pm 213.312
D (10 min.)	11	100	540	359.09 \pm 112.823

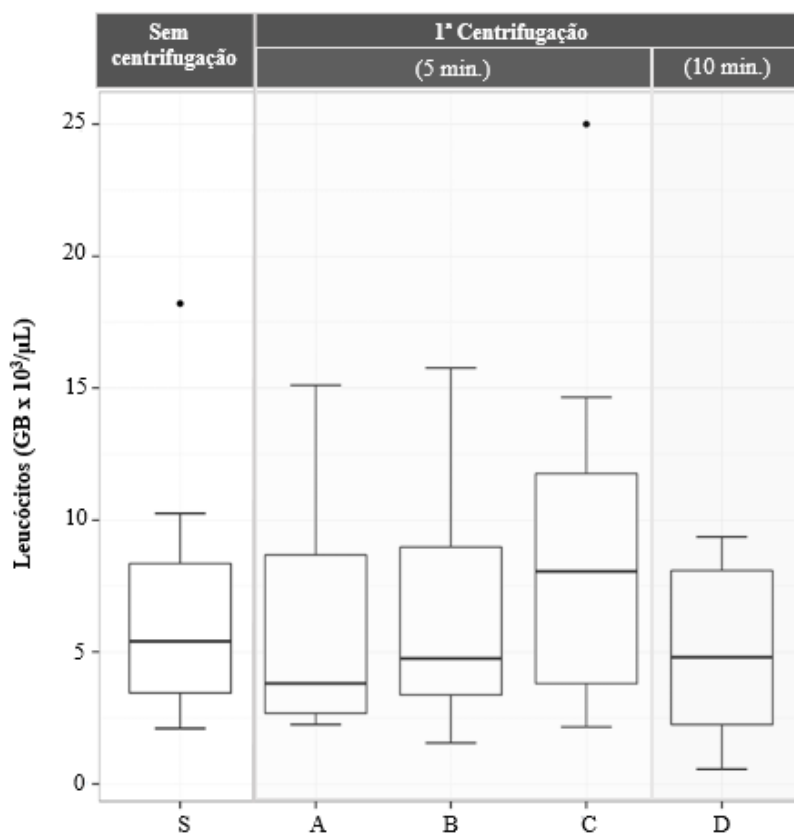
3.1.6.2. Caracterização da contagem de leucócitos

Em relação às contagens de leucócitos no sangue e nos PRP resultantes de uma centrifugação a 100g durante 5 ou 10 min., a apreciação do gráfico 12 sugere não existirem diferenças significativas entre as contagens obtidas pelas centrifugações de diferentes durações e entre estas e as contagens no sangue. Apesar de se verificarem dispersões diferentes nas contagens, as posições das caixas de bigodes e das suas medianas não são muito diferentes., sendo que nas amostras dos protocolos de 5 min. (A, B e C) se contabilizaram mais leucócitos.

Comparando as distribuições das contagens de leucócitos, verifica-se que as observações no percentil 75% (limite superior da caixa) são semelhantes entre S, A, B e D. Deste conjunto, A e B apresentam distribuições muito parecidas, concentrando as observações maiores e o máximo (excetuando *outliers*). A posição da mediana de B e D é muito aproximada, enquanto a mediana de C se destaca por estar mais acima das restantes, contabilizando contagens de leucócitos maiores.

Avaliando as contagens médias de leucócitos (GB) consoante a aplicação de diferentes tempos de centrifugação (5 ou 10 minutos) ou não (grupo sangue), obtiveram-se os resultados apresentados nas tabelas 16 e 14. Nestas é possível verificar-se que as contagens médias são semelhantes entre estes grupos, variando entre $5.02 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 3.417 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$ e $6.70 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 4.585 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$ (respetivamente o valor mínimo e máximo observados em D e em sangue), não sendo significativamente diferentes entre si ($p > 0.05$), como demonstrado pelo teste de ANOVA com medidas repetidas a um fator (tabela 32 do ANEXO V).

Gráfico 12. Diagrama de extremos e quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (S) e nos PRP resultantes da centrifugação do sangue a 100g e a diferentes tempos de centrifugação (5 e 10 min.).



Dados recolhidos a partir de uma população de 11 gatos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey ($p > 0.05$). • *outliers*

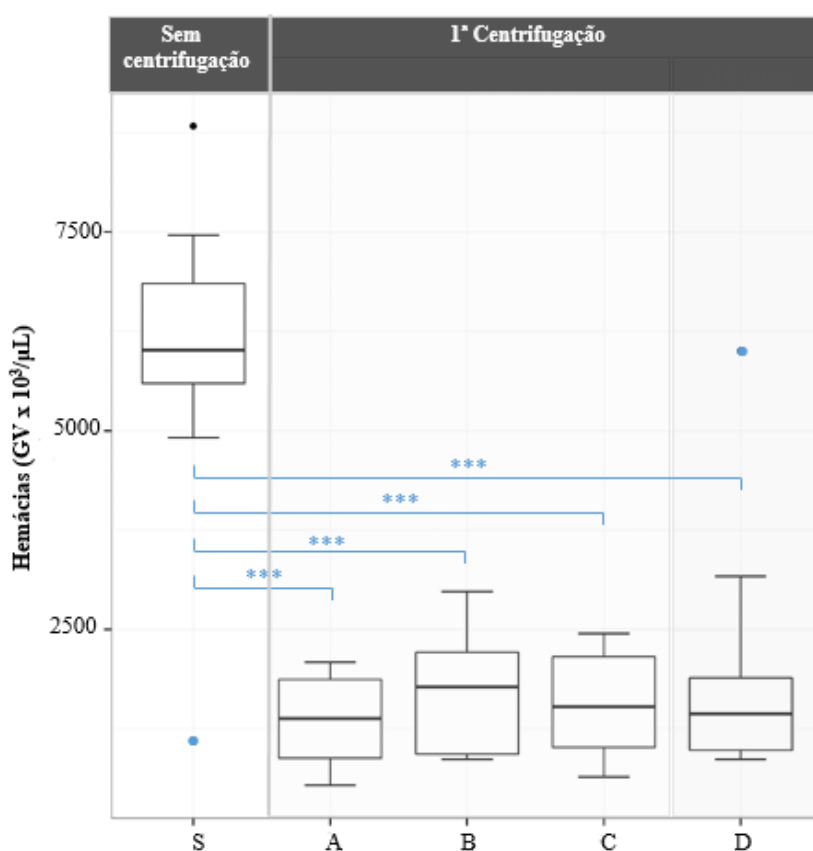
Tabela 16. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (5, 5, 5 e 10 min., respetivamente).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS				
Grupo	n	Valor mínimo (GBx10 ³ /µL)	Valor máximo (GBx10 ³ /µL)	Média ± dp (GBx10 ³ /µL)
A (5 min.)	11	2.25	15.10	5.97 ± 4.141
B (5 min.)	11	1.55	15.75	6.40 ± 4.295
C (5 min.)	11	2.15	25.00	8.92 ± 6.798
D (10 min.)	11	0.55	9.35	5.02 ± 3.417

3.1.6.3. Caracterização da contagem de hemácias

O gráfico 13 apresenta a distribuição das contagens de hemácias no sangue e nos PRP1, podendo-se observar maiores contagens no sangue, em oposição aos PRP1 que registam contagens bastante inferiores. Comparando a distribuição das contagens nos PRP1, verifica-se que concentram frequências semelhantes para 50% das suas contagens (limites superior e inferior da caixas aproximados). Neste gráfico são observados dois *outliers*, um no sangue e outro em D.

Gráfico 13. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GV) no sangue não centrifugado (S) e nos PRP resultantes da centrifugação do sangue a 100g e a diferentes tempos (5 e 10 min.).



Dados recolhidos a partir de uma população de 11 gatos. *** Diferença significativa entre o sangue e os grupos de PRP (A, B, C e D) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de *Tukey* ($p < 0.001$). • *outliers* • *extremos*

Relativamente à contagem média de hemácias foi 5952.36×10^3 GV/ μ L \pm 1931.786×10^3 x 10^3 GV/ μ L no sangue (tabela 14) e nos PRP1 variou entre 1375.46×10^3 GV/ μ L \pm 584.711×10^3 GV/ μ L e 1885.46×10^3 GV/ μ L \pm 1524.122×10^3 GV/ μ L (tabela 17).

Os testes estatísticos indicam que ocorreram diferenças significativas entre a contagem média de hemácias no sangue e após a centrifugação (PRP1) ($p < 0.001$), mas não entre os diferentes tempos de centrifugação ($p > 0.05$), sugerindo que 5 ou 10 minutos de centrifugação resultam numa redução de hemácias semelhante. Os resultados dos testes estatísticos ANOVA com medidas repetidas a um fator e teste de *Tukey* são apresentados na tabela 33 do anexo V.

Tabela 17. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (5, 5, 5 e 10 min., respetivamente).

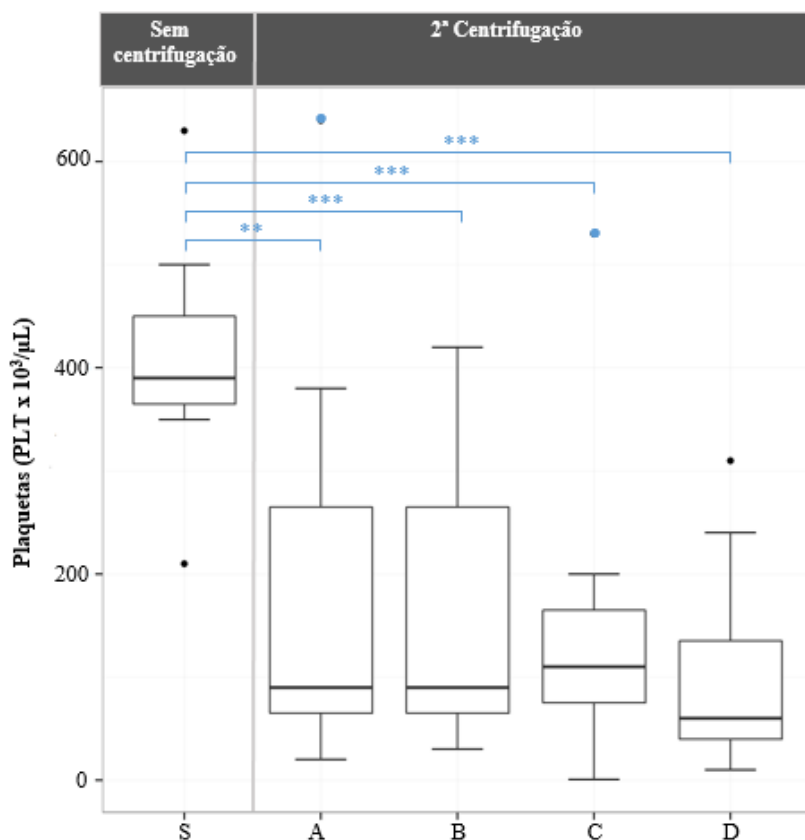
ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE HEMÁCIAS				
Grupo	n	Valor mínimo (GBx10 ³ /μL)	Valor máximo (GBx10 ³ /μL)	Média ± dp (GBx10 ³ /μL)
A (5 min.)	11	540	2090	1375.46 ± 584.711
B (5 min.)	11	870	2980	1675.46 ± 753.503
C (5 min.)	11	650	2450	1564.55 ± 639.506
D (10 min.)	11	870	6000	1885.46 ± 1524.122

3.1.7. Caracterização das amostras PRP2

3.1.7.1. Caracterização da contagem de plaquetas

O gráfico 14 ilustra as distribuições das contagens de plaquetas no sangue e após a segunda centrifugação das amostras A, B, C e D, respetivamente durante 10, 15, 5 e 10 minutos, com uma força de 200g. Observa-se uma menor contagem de plaquetas nos PRP2 relativamente ao sangue, sendo que neste são observadas contagens superiores para a maioria das amostras. Ainda neste gráfico pode observar-se que metade das contagens de plaquetas foram idênticas para A e B, divergindo apenas nos valores mínimos e máximos observados. Relativamente à distribuição destas contagens, verifica-se que existe maior variação no número de plaquetas contadas em cada amostra de A e B, contra a distribuição das contagens em C e D, nas quais se observam as menores contagens. Por fim, além das frequências de plaquetas atípicas observadas no sangue, observam-se extremos em A e C e um *outlier* em D.

Gráfico 14. Diagrama de extremos e quartis da contagem de plaquetas (PLT) no sangue não centrifugado (S) e nos quatro PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação do PRP1 a 200g e a diferentes tempos (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).



Dados recolhidos a partir de uma população de 11 gatos. *** Diferença significativa ($p < 0.001$) entre o sangue e os PRP2 B, C e D e ** diferença significativa ($p < 0.01$) entre o sangue e o PRP2 A, segundo o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de Tukey. • outliers • extremos.

Da avaliação dos resultados dos testes estatísticos, verifica-se que a média de plaquetas contadas no sangue é significativamente superior à dos PRP2, contabilizando 407.27×10^3 PLT/ $\mu\text{L} \pm 105.270 \times 10^3$ PLT/ μL ($p < 0.001-0.01$), em contraste com a menor média contabilizada de 100.91×10^3 PLT/ $\mu\text{L} \pm 97.104 \times 10^3$ PLT/ μL , observada em D. Relativamente aos PRP2, verifica-se que não existe diferença significativa entre as contagens obtidas após a centrifugação do PRP1 nos diferentes tempos testados ($p > 0.05$).

As médias, desvio-padrão, valores máximos e mínimos para as contagens de hemácias obtidas nos 3 PRP após a segunda centrifugação durante tempos distintos (10, 15, 5 e 10) estão representados na tabela 18. Os resultados dos testes estatísticos ANOVA com medidas repetidas a um fator e teste de *Tukey* são apresentados na tabela 34 do anexo V.

Tabela 18. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de plaquetas nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS				
Grupo	n	Valor mínimo (GBx10 ³ /μL)	Valor máximo (GBx10 ³ /μL)	Média ± dp (GBx10 ³ /μL)
A (10 min.)	11	20.00	640	181.82 ± 193.071
B (15 min.)	11	30.00	420	164.55 ± 133.144
C (5 min.)	11	0.57	530	144.60 ± 140.611
D (10 min.)	11	10.00	310	100.91 ± 97.104

3.1.7.2. Caracterização da contagem de leucócitos

No que diz respeito à contagem de leucócitos, verifica-se que a maior contagem média ocorreu no sangue ($\bar{x}_s = 6.70 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 4.585 \times 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{L}$ – tabela 14), destacando-se uma grande diferença relativamente à contagem média nos PRP2 (tabela 19). Estes apresentam valores muito semelhantes em A, B e C ($\bar{x}_A = 0.11 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 0.171 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$, $\bar{x}_B = 0.14 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 0.225 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$ e $\bar{x}_C = 0.10 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 0.144 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$), sendo que em D ($\bar{x}_D = 0.04 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L} \pm 0.060 \times 10^3 \text{ GB}/\mu\text{L}$), apesar de menor, a contagem média obtida não diverge muito das restantes.

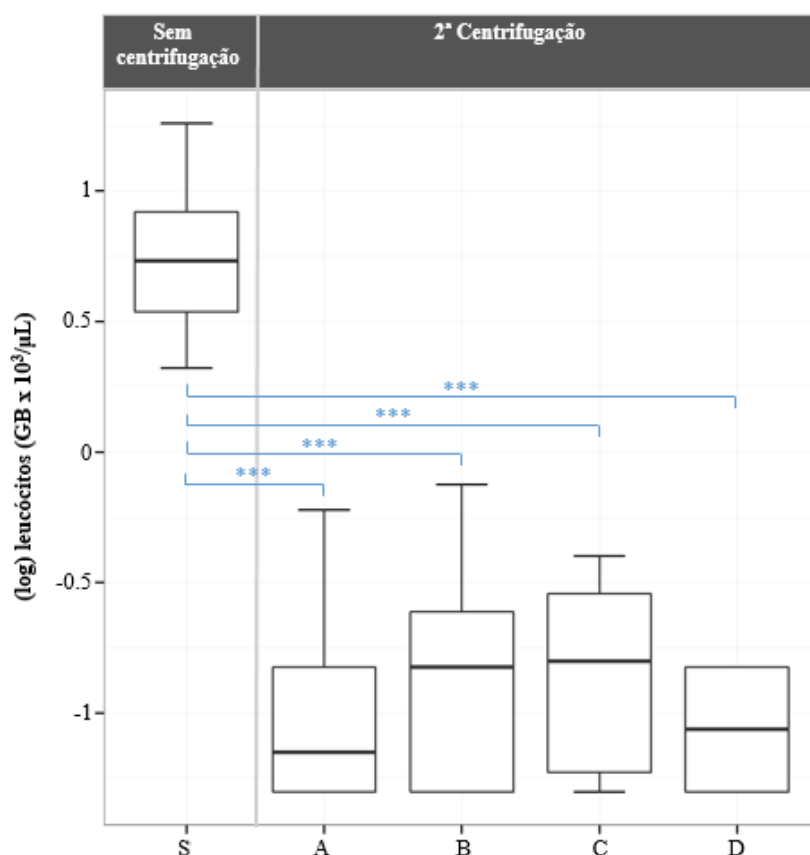
Tabela 19. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de leucócitos nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS				
Grupo	n	Valor mínimo (GBx10 ³ /μL)	Valor máximo (GBx10 ³ /μL)	Média ± dp (GBx10 ³ /μL)
A (10 min.)	11	0	0.60	0.11 ± 0.171
B (15 min.)	11	0	0.75	0.14 ± 0.225
C (5 min.)	11	0	0.40	0.10 ± 0.144
D (10 min.)	11	0	0.15	0.04 ± 0.60

Os resultados do teste ANOVA com medidas repetidas e do teste de *Tukey* verificam que as contagens de leucócitos no sangue e nos grupos PRP2 são significativamente diferentes ($p < 0.01$), tal como sugere a apreciação do gráfico 15 (posição elevada da caixa do sangue relativamente às caixas dos PRP2). Uma análise mais cuidada do gráfico 15 indicia que estes grupos poderão não apresentar diferenças significativas entre si, como se pode observar, por

exemplo pelas medianas semelhantes entre A e D e entre B e C. Os resultados relativos à comparação dos diferentes tempos confirmam não existir evidências suficientes para considerar as suas contagens significativamente diferentes ($p>0.05$). Os resultados dos testes estatísticos ANOVA com medidas repetidas a um fator e teste de *Tukey* são apresentados na tabela 35 do anexo V.

Gráfico 15. Diagrama de extremos e quartis da contagem de leucócitos (GB) no sangue não centrifugado (S) e nos quatro PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação do PRP1 a 200g e a diferentes tempos (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).



Dados recolhidos a partir de uma população de 11 gatos. *** Diferença significativa entre o sangue e os grupos de PRP (A, B, C e D) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de *Tukey* ($p<0.001$).

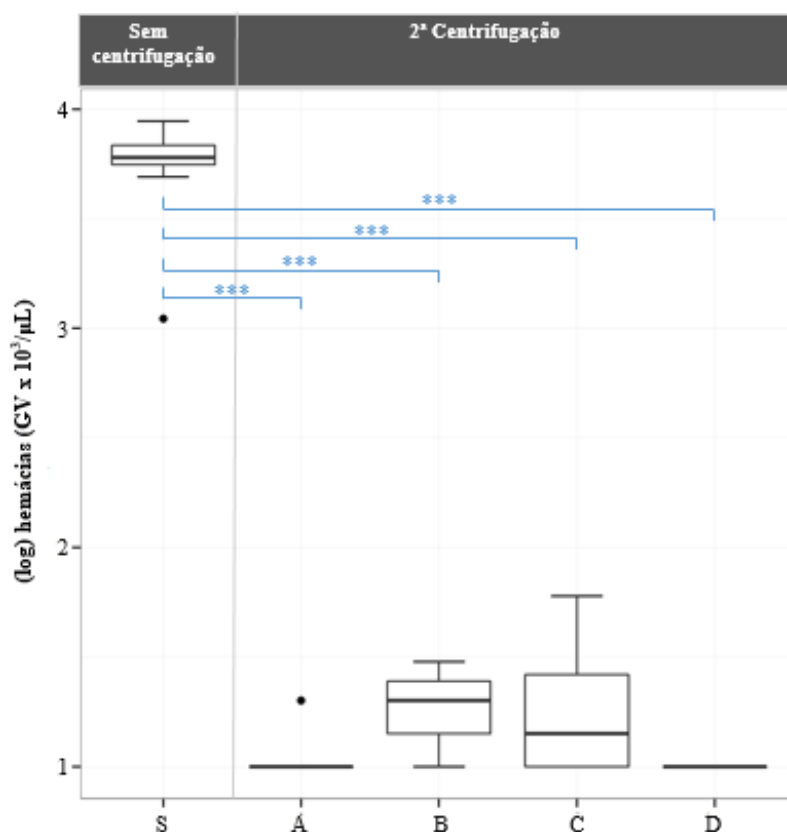
3.1.7.3. Caracterização da contagem de hemácias

No gráfico 16 estão distribuídas as contagens de hemácias no sangue e após realização dos protocolos com diferentes tempos de centrifugação. As contagens médias de hemácias no sangue e nos PRP2 estão respetivamente listadas nas tabelas 14 e 20; é evidente a diferença entre a contagem média de hemácias no sangue e nos PRP2, tal como observável no gráfico 16. No mesmo gráfico, é também possível verificar que em muitas das contagens dos PRP2 não se

observaram hemácias e que o máximo contabilizado foi observado no protocolo de menor duração (C – 5 min.), contabilizando 60×10^3 GV/ μ L.

Os resultados dos testes estatísticos confirmaram uma associação bastante significativa entre as contagens no sangue e nos PRP2, obtendo um valor de $p < 0,01$ (tabela 37 do anexo V). Estes resultados mostram também que nos quatro PRP2, nenhum dos grupos difere significativamente entre si ($p > 0,05$). Os resultados dos testes estatísticos ANOVA com medidas repetidas a um fator e teste de *Tukey* são apresentados na tabela 36 do anexo V.

Gráfico 16. Diagrama de extremos e quartis da contagem de hemácias (GB) no sangue não centrifugado (S) e nos quatro PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação do PRP1 a 200g e a diferentes tempos (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).



Dados recolhidos a partir de uma população de 11 gatos. *** Diferença significativa entre o sangue e os grupos de PRP (A, B, C e D) de acordo com o teste ANOVA uni-fatorial com medidas repetidas, seguido das comparações múltiplas de médias com o teste de *Tukey* ($p < 0,001$). • valor máximo que não é um outlier

Tabela 20. Estatística descritiva com mínimo, máximo, média e desvio-padrão da contagem de hemácias nos 4 PRP (A, B, C e D) resultantes da centrifugação das 4 amostras de sangue de cada um dos 11 gatos, submetidas a tempos de centrifugação diferentes (10, 15, 5 e 10 min., respetivamente).

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CONTAGENS DE HEMÁCIAS				
Grupo	n	Valor mínimo (GBx10 ³ /μL)	Valor máximo (GBx10 ³ /μL)	Média ± dp (GBx10 ³ /μL)
A (10 min.)	11	0	20	5.45 ± 6.88
B (15 min.)	11	0	30	5.45 ± 10.35
C (5 min.)	11	0	60	9.09 ± 18.14
D (10 min.)	11	0	10	0.90 ± 3.02

3.1.8. Caracterização dos resultados de PRP1 e PRP2

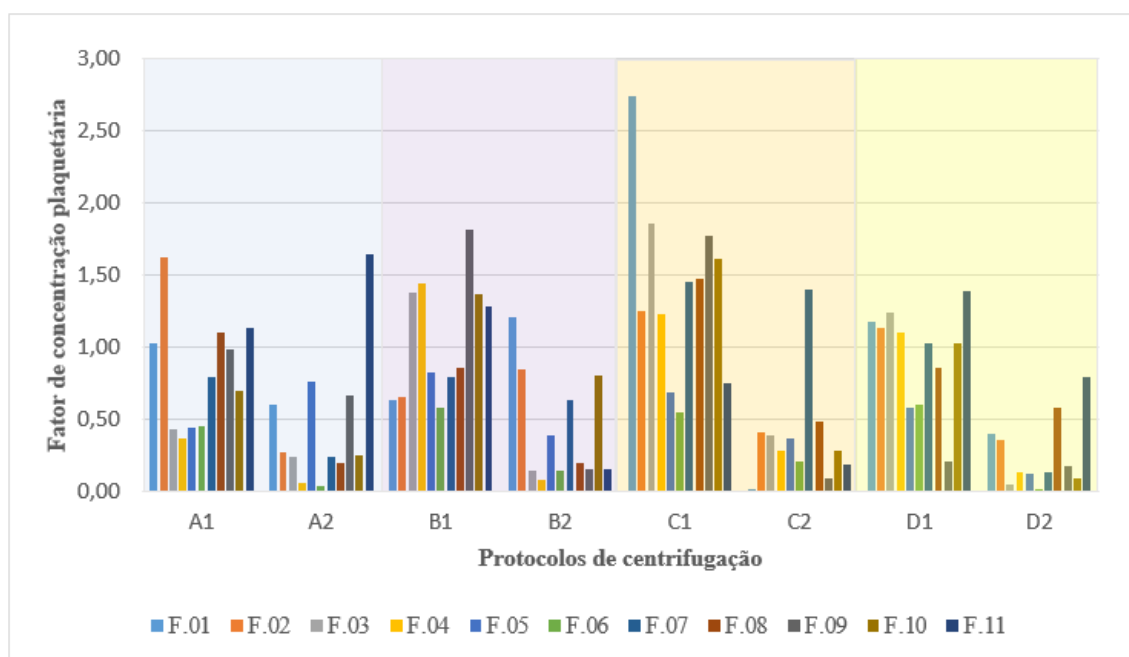
Analisando os resultados estatísticos referentes às contagens médias de plaquetas, verifica-se que os protocolos da segunda centrifugação obtiveram contagens significativamente inferiores às do controlo sangue, independentemente da sua duração, (tabela 34 do ANEXO V) e às dos protocolos da centrifugação única (tabela 37 do ANEXO V), os quais não diferem significativamente entre si (tabela 31 do ANEXO V). Não obstante, as maiores contagens de plaquetas foram contabilizadas nos protocolos da centrifugação única: em 10 dos 11 (90.9%) gatos foram observadas para os protocolos de 5 min., tendo 5 destes (45.5%) registado maiores contagens para o protocolo C1, 3 (27.3%) no protocolo B1, 2 (18.2) no protocolo A1. Apenas 1 (9.1%) gato registou as maiores contagens no protocolo de 10 minutos (D1) (gráfico 17). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os protocolos de diferentes durações, sugerindo obter-se resultados semelhantes em centrifugações de 5 ou 10 minutos. Os protocolos que diferiram significativamente entre si foram o A1 e o C1, respetivamente as menores e maiores contagens na centrifugação de 5 min (tabela 31 do ANEXO V).

Relativamente aos protocolos que concentraram plaquetas, os maiores fatores de concentração plaquetária variaram entre 1.44 e 2.74, respetivamente nos PRP dos protocolos B1 e C1, sendo que as amostras sanguíneas destes animais foram colhidas com o auxílio do sistema *Butterfly*. Comparando as contagens no sangue, os menores fatores de concentração foram obtidos respetivamente para nos protocolos C2 e B2 (0.01 e 0.38), em 2 animais cujas amostras foram colhidas com auxílio de agulha e seringa. Ainda relativamente ao método de colheita das amostras, verificou-se que era mais difícil usando a agulha e a seringa mas que, à exceção de 1 gato, se obtiveram contagens de plaquetas no sangue superiores, observando-se as maiores contagens (para os dois estudos) nos dois animais com menores fatores de concentração plaquetária, já mencionados. O reduzido número de animais usados por cada um dos métodos

de colheita prejudica a obtenção de resultados estatísticos mais fidedignos, tendo-se por isso optado por não avaliar a significância destas observações. Desta forma, a análise estatística foi realizada para o total dos 11 gatos, independentemente do método de colheita (ver “limitações do estudo”).

Apesar de nenhum protocolo concentrar significativamente plaquetas relativamente ao sangue, para efeitos da discussão do trabalho destaca-se o protocolo C1 como o que contabilizou maior contagem de plaquetas, obtendo um fator de concentração médio de 1,39.

Gráfico 17. Contagens de plaquetas no PRP relativamente à contagem no sangue (fator de concentração plaquetária) de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 e D1 correspondem respetivamente aos tempos 5, 5, 5 e 10 min. da primeira centrifugação a 100g e A2, B2, C2 e D2 aos tempos 10, 15, 5 e 10 min. da segunda centrifugação a 200g.



Relativamente às contagens de leucócitos e hemácias, em 6 dos 11 gatos (54.6%), os protocolos que contabilizaram mais plaquetas foram também os que registaram as maiores contagens de leucócitos, mas não as de hemácias (gráficos 18 e 19). A análise estatística das contagens médias destas células sanguíneas revela que, enquanto não se verificam diferenças significativas entre as contagens de leucócitos das duas centrifugações ($p > 0.05$; tabela 37 do ANEXO V), ocorrendo apenas uma redução significativa das contagens no sangue após a segunda centrifugação (tabela 35 do ANEXO V), verifica-se uma redução significativa das contagens de hemácias após cada centrifugação, independentemente da sua duração ($p < 0.01$; tabelas 33, 36 e 37 no ANEXO V).

Gráfico 18. Contagens de leucócitos no sangue e nos PRP de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 e D1 correspondem respectivamente aos tempos 5, 5, 5 e 10 min. da primeira centrifugação a 100g e A2, B2, C2 e D2 aos tempos 10, 15, 5 e 10 min. da segunda centrifugação a 200g.

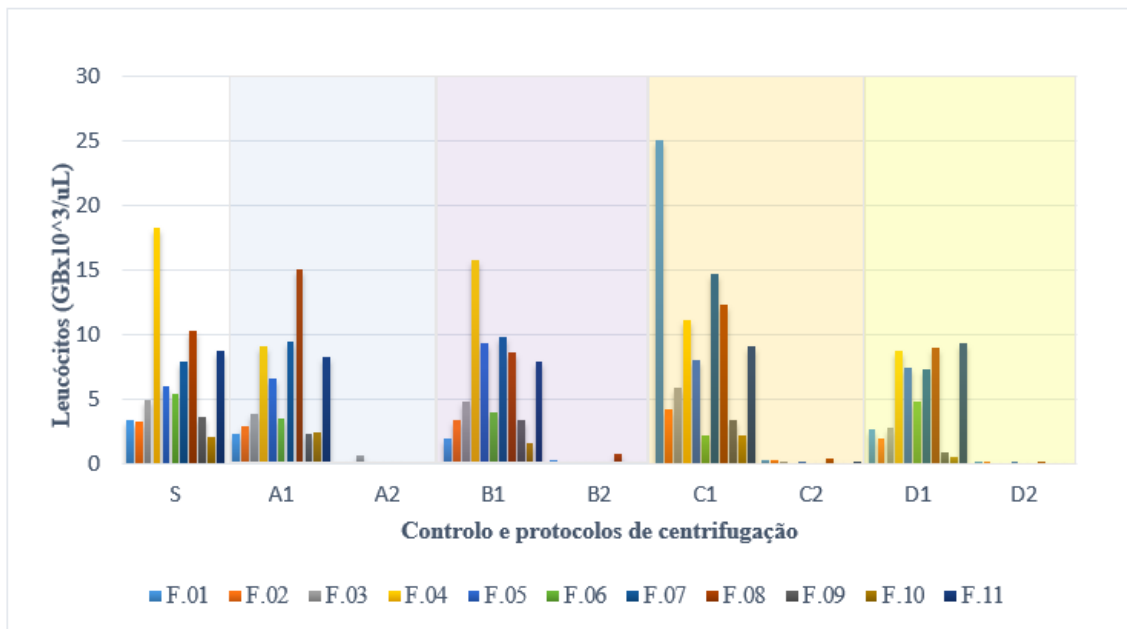
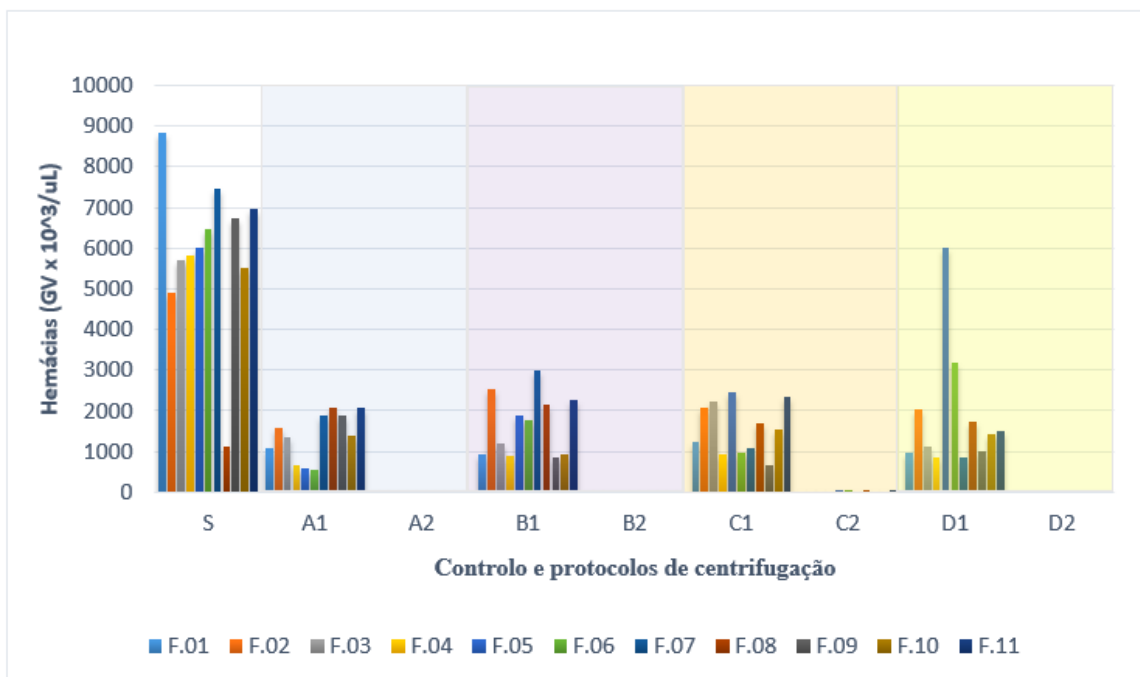


Gráfico 19. Contagens de hemácias no sangue e nos PRP de cada gato (F), distribuídas pelos protocolos testados, sendo que A1, B2, C1 e D1 correspondem respectivamente aos tempos 5, 5, 5 e 10 min. da primeira centrifugação a 100g e A2, B2, C2 e D2 aos tempos 10, 15, 5 e 10 min. da segunda centrifugação a 200g.



4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho, os animais apresentaram uma contagem média de plaquetas no sangue de 291.11×10^3 PLT/ μ L \pm 83.732×10^3 PLT/ μ L e 407.27×10^3 PLT/ μ L \pm 105.270×10^3 PLT/ μ L respectivamente no “estudo força” e no “estudo tempo”, o que, no caso do primeiro estudo, está um pouco abaixo do valor padrão para a espécie animal alvo deste estudo (300×10^3 PLT/ μ L), referido por Silva *et al.* (2012). Contudo, vários autores (Weiss & Tvedten, 2012; Rizzi, Clinkenbeard, & Meinkoth, 2010) referem que as contagens de plaquetas em gatos são com frequência imprecisas, obtendo-se muitas contagens baixas ($<200 \times 10^3$ PLT/ μ L), das quais poucas correspondem a uma redução verdadeira. Estas observações devem-se à combinação das grandes dimensões das plaquetas dos gatos e da sua propensão para formar aglomerados secundária à ativação de plaquetas quer por uma venipuntura pobre ou difícil, por uma exposição tardia ao anticoagulante ou por uma mistura inadequada do sangue e do anticoagulante, ocasionalmente observados no desenvolvimento dos estudos. É de referir a dificuldade com que a autora do presente trabalho frequentemente se deparou em colher as amostras de sangue dos gatos que, ironicamente, estavam anestesiados ou sedados, pois o seu pequeno porte e a resistência que estes oferecem à contenção sugeriam uma venipuntura difícil e a consequente ativação plaquetária *in vitro*. Num gato, observou-se inclusivamente a formação de um coágulo, por não se ter conseguido um fluxo contínuo de sangue e a sua mistura com o anticoagulante, tendo sido por isso excluído do estudo.

Na avaliação da eficiência dos protocolos em concentrar plaquetas verificou-se que nenhum dos protocolos obteve um rácio de concentração plaquetária significativo. Apesar disto, observou-se um aumento de 1.77 e 1.39 vezes mais plaquetas que no sangue, para a mesma força e tempo de centrifugação (100g x 5min.), respectivamente no “estudo força” e no “estudo tempo”. Estes resultados podem ser justificados pela grande dispersão de contagens observada nesses protocolos (diagramas de extremos e quartis nos “resultados”: gráficos 2, 5, 11 e 14), verificando-se, tal como no estudo de Araki *et al.* (2012), que a força e, neste trabalho, o tempo ótimo para a concentração máxima de plaquetas, variou entre indivíduos (gráficos de barras: 8 e 17). De acordo com o autor, uma vez que a separação das plaquetas dos restantes componentes sanguíneos se deve à gravidade específica, esta variabilidade dever-se-á à gravidade específica do sangue de cada indivíduo, resultante das diferentes composições e número de plaquetas, leucócitos e hemácias no sangue (gráficos de barras: 8-10 e 17-19).

Atualmente não existe consenso relativamente ao intervalo ótimo de plaquetas no PRP para fins terapêuticos. Vários estudos propõem diferentes rácios de concentração plaquetária nos PRP, dificultando a determinação da concentração acima da qual se observam efeitos terapêuticos.

Para Marx (2004), o PRP ideal deve conter entre 4 a 5 vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos, pois este intervalo de concentração define o PRP com capacidades terapêuticas e abaixo deste as concentrações de plaquetas poderão ser subótimas. Já outros autores (de Mos et al., 2008; Graziani et al., 2006) observaram que concentrações menores de plaquetas (2,5 superiores aos níveis sanguíneos) são suficientes para estimular a reparação celular. No presente estudo não foi possível obter essas concentrações usando uma centrifugadora, sendo que apenas três gatos obtiveram concentrações semelhantes (nomeadamente 2,74, 2,9 e 4,15). Weibrich, Kleis, Hafner e Hitzler (2002), citados por Pietrzak e Eppley (2005) sugerem no entanto que diferentes indivíduos poderão necessitar diferentes rácios de concentração plaquetária para atingir efeitos comparáveis, o que dificulta a definição do valor ideal.

Na literatura relativa ao estudo de protocolos para a preparação de PRP em diferentes espécies, observou-se uma grande variação nos rácios de concentração plaquetária, registando concentrações até 20 vezes às do sangue (Araki et al., 2012; Eppley, Woodell, & Higgins, 2004; Vendramin et al., 2009). É de salientar o trabalho de Vendruscolo *et al* (2012a), no qual o autor compara a eficácia de diferentes protocolos em concentrar plaquetas em Equinos, e obtém contagens significativamente superiores aos níveis fisiológicos, cujos rácios de concentração variam de 1.3 a 2.36; intervalo no qual os resultados obtidos no presente trabalho se encontram incluídos. Os diferentes rácios de concentração plaquetária podem ser atribuídos não só às variações dos parâmetros hematológicos que, tal como já foi observado, ocorrem entre indivíduos, e também diariamente para o mesmo indivíduo (Araki et al. 2012; Vendruscolo et al., 2012a), bem como à influência dos parâmetros relacionados com a preparação do PRP, em seguida discutidos (Arnoczky et al. 2011; Vendruscolo et al., 2012a).

Em relação ao número de centrifugações, os estudos encontrados verificaram concentrações de plaquetas superiores na segunda centrifugação (Araki et al., 2012; Nagata et al., 2010), obtendo concentrações até 7 vezes superiores às do PRP resultante da primeira centrifugação (Araki et al., 2012). No presente estudo, verificou-se surpreendentemente que, em ambos os estudos, as contagens médias de plaquetas nos PRP obtidos após a segunda centrifugação foram significativamente inferiores às obtidas no sangue e nos PRP centrifugados uma única vez. Estes resultados podem ser justificados, em parte, por possíveis erros de processamento, aos quais um protocolo com dupla centrifugação é mais suscetível por ter mais etapas de preparação. Nagata *et al.* (2010) observaram que apesar do protocolo de dupla centrifugação concentrar mais plaquetas, provocava alterações morfológicas nas plaquetas, enquanto Araki et al. (2012) verificaram uma pequena perda de plaquetas em cada etapa da preparação (com exceção da primeira centrifugação), devido à agregação plaquetária. A ativação e a agregação

plaquetária, além de erros de processamento, poderão justificar os resultados obtidos, uma vez que levam à redução da contagem de plaquetas, além da libertação dos FC na solução.

À exceção das contagens médias de leucócitos do “estudo tempo”, também se observaram contagens significativamente inferiores de leucócitos e de hemácias na segunda centrifugação, que podem ser justificadas pela metodologia de preparação dos PRP deste trabalho: enquanto o PRP da primeira centrifugação foi obtido pela centrifugação e divisão do sangue em 3 camadas (PPP, CF e camada de hemácias, do topo para o fim do tubo), das quais foi colhida a totalidade do soro e da CF e, em menor ou maior quantidade, a camada de hemácias em contacto com a CF; o PRP da segunda centrifugação resultou da centrifugação do PRP1, cujos leucócitos e eritrócitos depositados no fundo do tubo não são colhidos, contabilizando-se as células que estejam em suspensão no 1/3 inferior do plasma.

Seria expectável que após a centrifugação do sangue a concentração de plaquetas num menor volume de soro fosse superior à dos níveis fisiológicos. Porém, foi interessante verificar que, embora não fossem significativamente superiores às do sangue, as maiores contagens médias de plaquetas foram observadas nos PRP da primeira centrifugação. Esta observação poderá ser justificada pelas características morfológicas das plaquetas dos gatos, como o seu diâmetro e MPV superiores aos de outras espécies, que permitem a sua concentração no PRP através de uma única centrifugação, tal como proposto por Silva *et al.* (2012b).

O protocolo de uma centrifugação pode ser vantajoso uma vez que o PRP é facilmente obtido através de uma centrifugação única e necessita de uma quantidade de sangue menor. Esta última observação é importante, porque o volume de sangue pode ser um fator limitante para a produção de PRP não só em gatos, mas também noutras espécies com raças pequenas ou mesmo em animais muito jovens, como observado por Silva *et al.* (2012a). Marx (2001), no entanto, afirma serem necessárias duas centrifugações para a preparação de um “verdadeiro PRP”. De acordo com o autor, a presença de hemácias na primeira centrifugação não permite a melhor separação das plaquetas, produzindo-se uma mistura de PRP e PPP com baixa concentração plaquetária, o que é concordante com os resultados deste trabalho, uma vez que nenhum protocolo obteve concentrações de plaquetas significativas.

No “estudo força” observou-se que o protocolo da primeira centrifugação com a força mais baixa (100g) obteve contagens de plaquetas significativamente maiores às obtidas no protocolo com a maior força (400g). Embora estas contagens não sejam significativas relativamente às contagens do sangue, resultados concordantes foram observados no estudo de Vendruscolo *et al.* (2012a), no qual protocolos de dupla centrifugação com forças *g* que variam entre 90 a 120g nas duas centrifugações, obtiveram contagens de plaquetas superiores aos que utilizaram forças

g mais altas. Já Silva *et al.* (2012b) concentraram plaquetas de gatos aplicando uma “rotação branda” com uma força *g* menor (85g), atribuindo os seus resultados às características morfológicas das plaquetas destes animais.

Araki *et al.* (2012), Bausset *et al.* e Vendramin *et al.* (2009) contradizem os resultados obtidos ao observarem o aumento das contagens de plaquetas com o aumento da força *g*. Porém, enquanto Vendramin *et al.* (2009) obtiveram a contagem máxima de plaquetas com duas centrifugações de 400 e 800g, Bausset *et al.* (2012) observaram que uma força de 400g não concentrou significativamente mais plaquetas que 250g ($p>0.05$) e Araki *et al.* (2012) verificaram inclusivamente a diminuição das contagens a partir de 320g. Estas observações vão ao encontro dos resultados deste estudo e podem ser justificadas pela ativação precoce e aglomeração de plaquetas no fundo do tubo. Vendruscolo *et al.* (2012a) refere ainda que enquanto as forças de centrifugação mais baixas preservam a integridade das plaquetas, forças altas estão associadas a alterações da morfologia das plaquetas compatíveis com a lesão das mesmas e logo diminuindo o seu número no PRP, corroborando com os resultados obtidos.

Relativamente ao estudo do efeito das forças testadas na segunda centrifugação na concentração de plaquetas, os resultados obtidos indicam não existir diferenças significativas entre as contagens médias de plaquetas, confirmando que a aplicação de uma segunda força de centrifugação, independentemente da sua magnitude, leva à diminuição das contagens de plaquetas.

Relativamente à concentração de leucócitos e hemácias, observou-se uma redução significativa das contagens em todos os protocolos das duas centrifugações. A exceção observou-se nas contagens de leucócitos da primeira centrifugação em que, apesar de não revelarem contagens médias diferentes entre si ou entre o sangue, a menor força de centrifugação contabiliza mais plaquetas que nos níveis fisiológicos. É interessante reparar que foram as forças mais baixas (100 e 200g, respetivamente na primeira e segunda centrifugação) que contabilizaram mais plaquetas, leucócitos e hemácias. Embora não se tenha estudado a significância desta relação, estes resultados sugerem a colheita de PPP, de CF e das hemácias em contacto com o CF concentra mais plaquetas. Andrade *et al.* (2008) verificou também que a inclusão de hemácias no PRP é uma medida importante para concentrar mais FC. Marx *et al.* (1998), à semelhança de Reeder *et al.* (1993) por si citados, justifica estes resultados pela diferença de tamanho das plaquetas recentemente sintetizadas que, por serem maiores, podem ocupar até 1mm acima da camada de hemácias. Já Bausset *et al.* (2012) interpreta o aumento da contagem de plaquetas e leucócitos como uma potencial limitação da centrifugação do sangue com forças menores que não são tão eficazes em separar os componentes celulares da CF. De fato, embora quer as

contagens de leucócitos, quer as hemácias, não sejam significativamente diferentes entre os protocolos de centrifugação, observou-se a diminuição das contagens nas forças 200g e 400g, obtendo-se valores muito aproximados na primeira centrifugação, e na segunda centrifugação (400 e 800g). Estas observações refletem também os resultados de Vendruscolo *et al.* (2012a), já referidos para as plaquetas; com o aumento da força as células tendem a aglomerar e a depositar-se no fundo do tubo, formando *pellets* difíceis de quebrar e logo, diminuindo a sua contagem no PRP.

O envolvimento dos leucócitos nos efeitos secundários do PRP não é ainda claro e a sua inclusão no PRP é controversa. Enquanto alguns autores consideram que os leucócitos são contaminantes do PRP, podendo até ser deletérios para o tecido em tratamento, outros consideram que são importantes na reparação de tecidos e que o PRP beneficia a nível terapêutico com a sua inclusão (Bausset *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012a). É possível que um efeito negativo ou positivo não possa ser generalizado e que cada tipo de PRP (L-PRP e P-PRP) possa mostrar diferentes efeitos biológicos quando usado clinicamente sendo, por isso, importante determinar quais as situações clínicas que beneficiam da aplicação de um, em detrimento da aplicação do outro (Arnoczky *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012b). Ainda relativamente ao PRP ideal, Eppley *et al.* (2004) referem que não deve conter hemácias, uma vez que podem potencializar a resposta pró-inflamatória no local da lesão. Na bibliografia consultada não foram encontradas outras referências quanto à inclusão de hemácias no PRP, pelo que se conclui que os autores consideram a sua presença vestigial e/ou não produz efeitos potencialmente deletérios.

À semelhança do observado no “estudo força”, no “estudo tempo” não se observaram diferenças significativas em relação às contagens no sangue na primeira centrifugação, enquanto na segunda centrifugação verificou-se uma diminuição significativa da contagem de plaquetas, confirmando os resultados já discutidos. Quanto ao estudo da influência do tempo de centrifugação na concentração de plaquetas, Silva *et al.* (2012b) indicaram que, devido às características morfológicas das plaquetas dos gatos, uma “rotação simples” de 6 minutos pode concentrar plaquetas. No presente estudo observou-se não haver diferença significativa entre os diferentes tempos de centrifugação, sugerindo que a variação da duração das centrifugações, entre 5 a 10 minutos na primeira centrifugação, ou entre 5 a 15 minutos na segunda, não influencia a produção de PRP. Resultados concordantes são observados por Vendruscolo *et al.* (2012a) e Vendramin *et al.* (2009), sugerindo assim que o tempo de centrifugação deverá ser o mais rápido possível, pois uma vez que o PRP deve ser preparado o mais próximo possível da sua aplicação, a sua preparação deve ser o mais rápida possível. As contagens de leucócitos

apresentaram resultados idênticos aos das plaquetas, sendo que aos 10 minutos registam as menores contagens nas duas centrifugações, embora não significativas. Possivelmente estes resultados resultam da deposição das plaquetas e dos leucócitos no fundo do tubo com o aumento do tempo de centrifugação. Já as contagens de hemácias são significativamente inferiores às do sangue nas duas centrifugações, o que corresponde à eliminação de quase toda a totalidade da camada de hemácias na primeira centrifugação e à sua deposição no fundo do tubo na segunda centrifugação, tal como observado no “estudo força”.

Dentro dos diversos tipos de anticoagulantes foi escolhido para este estudo o ACDA-A por preservar a integridade da membrana das plaquetas e ser considerado o mais indicado na preparação de PRP (Marx, 2001). A utilização deste anticoagulante para colher o sangue constitui outro fator que poderá ter influenciado os resultados acima descritos, pois Araki *et al.* (2012) recentemente indicou que o EDTA tem menos efeitos desencadeadores da coagulação e agregação plaquetária que o ACD, concentrando melhor as plaquetas. Não obstante, vários trabalhos, incluindo o de Araki *et al.* (2012), obtiveram concentrações de plaquetas significativas utilizando ACD-A como anticoagulante (Silva, 2012a, Silva, 2012b, Vendruscolo, 2012a).

Embora não se tenha estudado a relação entre o método de colheita, verificaram-se contagens distintas entre a utilização do sistema *Butterfly* e a utilização da agulha e da seringa, sendo que os primeiros obtiveram maiores concentrações de plaquetas no PRP e os segundos, apesar de contabilizarem mais plaquetas no sangue, obtiveram os menores rácios de concentração. Na bibliografia é referida a importância do material de manipulação e de acondicionamento do PRP, bem como das centrifugadoras na produção de PRP, indicando que se devem evitar materiais de vidro, pois a contagem de plaquetas pode diminuir (Andrade et al., 2008; Michelson, 2007, citado por DeLong et al., 2012). Apesar de não terem sido encontradas considerações quanto ao material de colheita, o fato do método de colheita que colheu mais plaquetas ter contabilizado as menores concentrações sugere que o método usado não deverá ter interferido na preparação dos PRP.

A redução do volume plasmático varia entre os protocolos revistos, bem como os seus rácios de concentração plaquetária, sendo que estudos que concentram plaquetas no 1/10 inferior do plasma obtém maiores concentrações de plaquetas, concentrando até 7.4 vezes mais plaquetas que no sangue (Araki et al., 2012; Vendramin et al, 2012). Porém, no presente estudo estabeleceu-se que o PRP corresponderia ao 1/3 inferior do plasma obtido após a segunda centrifugação, enquanto na primeira centrifugação não se realizou nenhuma redução plasmática. Esta escolha foi baseada no fato do modelo animal em estudo não permitir a colheita

de um grande volume de sangue sem causar problemas sistêmicos, quando seria sujeito a uma intervenção cirúrgica. Deste modo, da amostra de 4mL, 1 mL teria de ser suficiente para produzir uma quantidade mínima de PRP que permitisse a sua avaliação nas duas centrifugações, apesar de reconhecida a influência desta escolha nos rácios de concentração plaquetária. Não obstante, protocolos que reduziram 2/3 ou mesmo 1/2 do volume plasmático sucederam em obter concentrações de plaquetas significativas (Silva et al., 2012a; Vendruscolo et al. 2012a). É interessante observar que as maiores contagens plaquetárias foram obtidas na primeira centrifugação, na qual não se concentraram plaquetas num menor volume plasmático, o que poderá justificar porque não se atingiram valores significativos.

Uma adequada suspensão das plaquetas no PRP e a apropriada preparação da amostra para a contagem parecem ser requeridas para uma contagem de plaquetas exata, pois a aglomeração de plaquetas ou a distribuição heterogénea podem resultar em contagens imprecisas. DeLong *et al.* (2012) citam o estudo de Woodell – May *et al.* (2005), no qual observaram que as contagens de plaquetas foram significativamente menores ($p<0.05$) quando as amostras foram analisadas imediatamente após a preparação do PRP, do que quando as amostras eram homogeneizadas num agitador de tubos. Referem ainda que a totalidade do PRP deve ser homogeneizada num agitador de tubos durante pelo menos 5 minutos antes da contagem de plaquetas e que as suas amostras também devem ser homogeneizadas, por forma a permitir uma distribuição homogénea das plaquetas antes da contagem. Tal como a bibliografia sugere, tanto o PRP obtido após a centrifugação como as suas amostras foram homogeneizadas quer após a sua diluição como antes da sua colocação na câmara de contagem, como referido nos métodos. Porém, não foi possível usar uma misturadora mecânica; alternativamente as amostras foram pipetadas sucessivamente, o que poderá ter conduzido às baixas contagens de plaquetas, pois de acordo com Nagata *et al.* (2010), pipetar excessivamente as amostras pode provocar a ativação prematura das plaquetas. Adicionalmente, a duração da homogeneização das amostras nunca atingiu 5 minutos de duração.

Também o método de contagem utilizado pode acrescentar incerteza à determinação do rácio de concentração, pois vários estudos confirmam diferenças entre a contagem manual e automática. Nos métodos manuais distinguem-se as contagens através da coloração de esfregaços ou utilizando câmaras de contagens e reagentes de coloração diferenciada, enquanto os métodos automáticos utilizam máquinas que realizam a contagem através de técnicas de análise automatizadas. Neste trabalho foi escolhida a contagem manual e foi utilizada uma câmara de Neubauer modificada para quantificar as plaquetas, bem como os leucócitos e as hemácias, pois além de simples execução, este método permite contabilizar as plaquetas

individualmente, enquanto o método automático pode considerar agregados de plaquetas como uma única plaqueta, subestimando as contagens. No entanto, existe um coeficiente de variação inerente a este método de contagem de 20-25%, mesmo quando realizado por técnicos experientes (Eppley et al., 2006; Vendruscolo et al., 2012a; Voigt, 2000).

Estas observações para além de confirmarem a importância da utilização de métodos consistentes e da interpretação crítica dos resultados entre trabalhos cujos métodos de contagem possam diferir, podem justificar, em parte, os resultados obtidos, quer nas contagens de plaquetas no sangue como nos PRP. Por fim, atendendo aos resultados deste trabalho, é possível classificar o protocolo otimizado como P1-A, de acordo com o sistema de classificação de PAW (tabela 3).

5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O desenho experimental poderá ser considerado, em parte, uma limitação deste trabalho, no sentido em que, pela escassez de estudos relativos à preparação de PRP em gatos, os protocolos em estudo foram desenhados com base em trabalhos realizados noutras espécies animais. Atendendo, às características particulares das plaquetas do gato, os níveis das variáveis testadas podem justificar os resultados, limitando as conclusões nas forças maiores e na segunda centrifugação. Contudo, é importante referir que este estudo deverá servir de estudo preliminar para a execução no futuro de estudos adaptados à espécie felina. Ainda quanto ao desenho dos protocolos, é de referir que, apesar dos estudos consultados concordarem no que toca ao volume de plasma a reduzir para concentrar plaquetas, não foi possível excluir 9/10 do plasma e, adicionalmente, o volume de plasma eliminado não foi idêntico entre a primeira e a segunda centrifugação. Estas limitações poderão não só ter influenciado os resultados obtidos como acrescem dúvida quanto à causa de não terem sido obtidas concentrações significativas.

Quanto à contagem de plaquetas, é inerente a existência de uma grande variedade de concentrações associadas a variações hematológicas individuais, e logo este trabalho beneficiaria de um número de casos expressivamente maior, no sentido de evitar a existência de uma variável adicional e assim possibilitar a avaliação estatística das variáveis inerentes à centrifugação e obtenção do PRP (força, tempo e número de centrifugações). É importante referir que devido ao n ser pequeno em cada estudo, os presentes resultados devem ser interpretados como preliminares.

Salienta-se ainda que atendendo ao número limitado de sistemas *Butterfly* disponibilizado para a realização deste trabalho, por razões económicas, não foi possível utilizar o mesmo método

de colheita em todos os animais, tendo-se de recolher amostras com agulha e seringa em alguns gatos do “estudo tempo”. Apesar de não se ter considerado que os diferentes métodos conduziriam a resultados diferentes, Rizzi *et al.*, (2010) refere que a colheita direta de sangue através de um sistema para um tubo *Vacutainer* diminui a formação de aglomerados. Seria portanto interessante verificar se o sistema *Vacutainer* é significativamente mais eficiente na colheita de plaquetas íntegras relativamente à colheita com agulha e seringa, não só para interesse deste trabalho, mas também porque em ambiente hospitalar o mais comum é a agulha e a seringa.

Outra limitação deste estudo foi não se terem realizados esfregaços do sangue colhido e dos PRP que poderiam ter determinado a validade da metodologia usada. Como argumentado por vários autores (Andrade *et al.*, 2008; Nagata *et al.*, 2010; Rizzi *et al.*, 2010), a realização de esfregaços possibilitaria uma melhor avaliação dos resultados, pois nestes é possível confirmar as contagens e observar parâmetros indicadores da atividade plaquetária, tais como: alterações da morfologia, do tamanho, da forma, das características da coloração, do grau de ativação e formação de aglomerados, da distribuição dos grânulos e aparecimento de vacúolos. Alternativamente poder-se-ia comparar as contagens manuais com contagens automatizadas, em combinação com a determinação dos valores de MPV e o PDW (volume plaquetário médio), pois os seus valores aumentam com a ativação plaquetária, verificando alterações compatíveis com a ativação e aglomeração plaquetária.

Por fim, para concentrar um elevado número de plaquetas íntegras, o processo de centrifugação deve ser asséptico e executado com precisão para separar e concentrar plaquetas sem que ocorra lise ou aglomeração. Em relação a estes parâmetros importa realçar as limitações da execução por um operador que, embora tenha treinado para o trabalho não é experiente, e as condições de assépsia de um laboratório de clínica, podem ter influenciado os resultados.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível confirmar que o conteúdo do produto final de PRP pode variar não só entre métodos mas dentro do mesmo método de preparação, sendo que o protocolo ótimo para máxima concentração plaquetária variou entre indivíduos. Estas observações sugerem que até diferentes condições físicas podem influenciar os requisitos ótimos de centrifugação, tornando o estudo de fatores associados ao paciente, como o htc ou a contagem de plaquetas no sangue, essenciais para predizer características do PRP final, como por exemplo, o número de

plaquetas que possivelmente será concentrado. Assim, o protocolo para a produção de PRP seria idealmente personalizado para cada indivíduo.

No entanto para estabelecer um protocolo simples para a preparação manual de PRP, e atentando aos resultados deste trabalho, é possível concluir que a segunda centrifugação usada contabilizou significativamente menos plaquetas que no sangue, enquanto a primeira, apesar de indicar algumas contagens superiores às fisiológicas, não mostrou diferenças significativas. Conseqüentemente uma única centrifugação pode ser a metodologia mais eficaz para obter PRP em gatos. Baseado nos resultados obtidos em relação à concentração plaquetária nas condições experimentais, a melhor força de centrifugação seria uma inferior às testadas, pois 100g, apesar de indicar contagens médias superiores ao sangue, não conseguiu obter um rácio de concentração significativo e o aumento da força de centrifugação mostrou reduzi-lo significativamente. Apesar da força aplicada no estudo do tempo de centrifugação não concentrar plaquetas acima da contagem fisiológica, também não se verificaram contagens significativamente diferentes com o aumento do tempo. Tendo em conta que o PRP deve ser produzido o mais rapidamente possível, 5 minutos parece ser o tempo de centrifugação mais adequado.

A presença de leucócitos e hemácias nos PRP pode estar associada à metodologia e, embora não se tenha verificado esta relação, observa-se que alguns gatos do estudo concentram mais plaquetas à medida que aumentavam as células sanguíneas nas contagens. Seria portanto interessante confirmar estas observações e aferir se se devem à colheita da CF até à camada adjacente das hemácias que contem plaquetas mais jovens, beneficiando a sua concentração; ou se, por outro lado, a presença de hemácias não permite a melhor separação dos elementos, contribuindo para que as concentrações não tenham sido significativas, sendo preferível uma colheita de CF isenta de hemácias. Em semelhança, se questiona se a colheita de uma maior quantidade de CF influencia a concentração de plaquetas, tendo em conta que ainda não existe consenso quanto aos efeitos dos leucócitos na capacidade terapêutica do PRP.

É de salientar que a incerteza associada aos resultados é também atribuída a outras variáveis de preparação e avaliação do PRP, mesmo que constantes na metodologia. Nomeadamente o anticoagulante, o método de colheita, a redução de volume plasmático, a preparação da amostra e a sua avaliação (método de contagem). Adicionalmente, características particulares das plaquetas dos gatos poderão justificar os resultados para a metodologia aplicada, sugerindo que os protocolos de preparação de PRP devem ser adequados ao modelo animal em estudo.

Em conclusão, a elaboração do presente trabalho foi útil no sentido que permitiu rever a literatura existente até à data sobre o tema e reunir um conjunto de informações bastante

relevantes para a compreensão das inconsistências sobre a eficácia terapêutica do PRP. Adicionalmente, este trabalho prático deverá servir como um estudo preliminar para a caracterização e standardização das propriedades biológicas do PRP em gatos, objetivando a elaboração otimizada de um protocolo de preparação e a definição do seu valor clínico nesta espécie animal.

LISTA DE REFERÊNCIAS

- Aghaloo, T. L., Moy, P. K., & Freymiller, E. G. (2002). Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 60(10), 1176–1181. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12378494>
- Alio, J. L., Arnalich-Montiel, F., & Rodriguez, A. E. (2012). The role of “eye platelet rich plasma” (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(7), 1257–1265.
- Alves, S. B. C. R., Monteiro, M. P. G., Pires, N. R. & Santos, A. V. P. (2012). Metodologia para obtenção do plasma rico em plaquetas: Estudo preliminar, Revista Eletrônica Novo Enfoque, 15, 83 – 89. Acedido em Abr. 27, 2014, disponível em http://www.castelobranco.br/sistema/novoenfoque/files/15/artigos/16_Metodologiaapar aobtencaodoPlasma_Beatriz_NathaliaPires_Retificado_VF.pdf
- Andrade, M. G. S., de Freitas Brandão, C. J., Sá, C. N., de Bittencourt, T. C. B. D. S. C., & Sadigursky, M. (2008). Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 105(1), e5–e12. doi:10.1016/j.tripleo.2007.07.032
- Araki, J., Jona, M., Eto, H., Aoi, N., Kato, H., Suga, H., Doi, K., Yatomi, Y. & Yoshimura, K. (2012). Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 18(3), 176–185. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0308
- Arnoczky, S. P., Delos, D., & Rodeo, S. A. (2011). What Is Platelet-Rich Plasma? *Operative Techniques in Sports Medicine*, 19(3), 142–148. doi:10.1053/j.otsm.2010.12.001
- Baker, D. C. (2012). Diagnosis of disorders of hemostasis. A. M. Thrall, G. Weiser, R. Allison, T. W. & Campbell (Eds), *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed.). (pp. 185 - 189). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Bausset, O., Giraudo, L., Veran, J., Magalon, J., Coudreuse, J.-M., Magalon, G., Dubois, C., Serratrice, N., Dignat-George, F. & Sabatier, F. (2012). Formulation and Storage of Platelet-Rich Plasma Homemade Product. *BioResearch Open Access*, 1(3), 115–123. doi:10.1089/biores.2012.0225
- Bielecki, T. M., Gazdzik, T. S., Arendt, J., Szczepanski, T., Król, W., & Wielkoszynski, T. (2007). Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 89(3), 417–420. doi:10.1302/0301-620X.89B3.18491
- Boldt, J., von Bormann, B., Kling, D., Jacobi, M., Moosdorf, R., & Hempelmann, G. (1990). Preoperative plasmapheresis in patients undergoing cardiac surgery procedures. *Anesthesiology*, 72(2), 282–288.
- Boudreaux, M. K., & Ebbe, S. (1998). Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comparative Haematology International*, 8(1), 16–20. doi:10.1007/BF02628099
- Boudreaux, M. K., Osborne, C. D., Herre, A. C., Rivera, E. R., & Spangler, E. A. (2010). Unique structure of the M loop region of β 1-tubulin may contribute to size variability of platelets in the family Felidae. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for*

Veterinary Clinical Pathology, 39(4), 417–423. doi:10.1111/j.1939-165X.2010.00256.x

- Boudreaux, M. K. & Catalfamo, J. (2010). Platelet biochemistry, signal transduction and function. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed.) (pp. 569- 575). Ames ,IA: Wiley-Blackwell.
- Boudreaux, M. K. (2010). Platelet structure. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed.) (pp. 561- 568). Ames ,IA: Wiley-Blackwell.
- Camargo, P. M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M., & Kenney, E. B. (2002). Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *Journal of Periodontal Research*, 37(4), 300–306. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200975>
- Cavalcanti, G. A. de S. A. (2010). Plasma rico em plaquetas: obtenção, momento de produção e uso na integração de flapes cutâneos de avanço em cães. Retrieved August 14, 2013, from http://200.17.137.108/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=698
- Coppi, P. D. (2012). Regeneration from Fat: A Clinical Reality? *Stem Cells Translational Medicine*, 1(3), x–x.
- Dailey, J. F. (1998). *Blood : Self - teaching hematology, immunology and transfusion therapy*. (pp. 177-183; 191-201). Arlington, VA: Medical Consulting Group.
- De La Mata, J. (2013). Plasma rico en plaquetas: ¿un nuevo tratamiento para el reumatólogo? *Reumatología Clínica*, 9(3), 166–171. doi:10.1016/j.reuma.2012.05.011
- De Mos, M., van der Windt, A. E., Jahr, H., van Schie, H. T. M., Weinans, H., Verhaar, J. A. N., & van Osch, G. J. V. M. (2008). Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *The American Journal of Sports Medicine*, 36(6), 1171–1178. De Mos, M., van der Windt, A. E., Jahr, H., van Schie, H. T. M., Weinans, H., Verhaar, J. A. N., & van Osch, G. J. V. M. (2008). Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *The American Journal of Sports Medicine*, 36(6), 1171–1178. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326832>
- DeLong, J. M., Russell, R. P., & Mazzocca, A. D. (2012). Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, 28(7), 998–1009. doi:10.1016/j.arthro.2012.04.148
- Deutsch, V. R., & Tomer, A. (2013). Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: From bench to bedside. *British Journal of Haematology*, 161(6), 778–793. doi:10.1111/bjh.12328
- Dhillon, R. S., Schwarz, E. M., & Maloney, M. D. (2012). Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Research & Therapy*, 14(4), 219. doi:10.1186/ar3914
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(3), e37–e44. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008

- Drago, L., Bortolin, M., Vassena, C., Taschieri, S., & Del Fabbro, M. (2013). Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiology*, *13*, 47. doi:10.1186/1471-2180-13-47
- Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, *27*(3), 158–167. doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009
- Eppley, B. L., Woodell, J. E., & Higgins, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *114*(6), 1502–1508. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509939>
- Eppley, B. L., Pietrzak, W. S., & Blanton, M. (2006). Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *118*(6), 147e–159e. doi:10.1097/01.prs.0000239606.92676.cf
- Everts, P. A. M., Knappe, J. T. A., Weibrich, G., Schönberger, J. P. A. M., Hoffmann, J., Overvest, E. P., Box, H. A. M. & van Zundert, A. (2006). Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *The Journal of Extra-Corporeal Technology*, *38*(2), 174–187.
- Flatow, F. A., Jr, & Freireich, E. J. (1966). The increased effectiveness of platelet concentrates prepared in acidified plasma. *Blood*, *27*(4), 449–459.
- Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B., & Rodeo, S. A. (2009). Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American Journal of Sports Medicine*, *37*(11), 2259–2272. doi:10.1177/0363546509349921
- Freymler, E. G., & Aghaloo, T. L. (2004). Platelet-rich plasma: ready or not? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *62*(4), 484–488.
- Froum, S. J., Wallace, S. S., Tarnow, D. P., & Cho, S.-C. (2002). Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, *22*(1), 45–53.
- Gandhi, A., Dumas, C., Dumas, C., O'Connor, J. P., Parsons, J. R., & Lin, S. S. (2006). The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*, *38*(4), 540–546. doi:10.1016/j.bone.2005.10.019
- Gentile, P., Orlandi, A., Scioli, M. G., Di Pasquali, C., Bocchini, I., & Cervelli, V. (2012b). Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. *Stem Cells Translational Medicine*, *1*(3), 230–236. doi:10.5966/sctm.2011-0054
- Gentile, P., Orlandi, A., Scioli, M. G., Pasquali, C. D., Bocchini, I., Curcio, C. B., Floris, M., Fiaschetti, V., Floris, R. & Cervelli, V. (2012a). A Comparative Translational Study: The Combined Use of Enhanced Stromal Vascular Fraction and Platelet-Rich Plasma Improves Fat Grafting Maintenance in Breast Reconstruction. *Stem Cells Translational Medicine*, *1*(4), 341–351. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368279>
- Gimeno, F., Gatto, S., Ferro, J., Croxatto, J. O., & Gallo, J. E. (2006). Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thrombosis Journal*, *4*, 18. doi:10.1186/1477-9560-4-18

- Graziani, F., Ivanovski, S., Cei, S., Ducci, F., Tonetti, M., & Gabriele, M. (2006). The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clinical Oral Implants Research*, 17(2), 212–219. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16584418>
- Haynesworth, S.E., Kadiyala, S., Liang, L.N. & Bruder, S. P. (2002). Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet release suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates. Poster número 0462 apresentado no 48th Meeting of the Orthopedic Research Society, Boston, MA, 2002
- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., McCarty, O. J. T., Moroi, M., Ruggeri, Z. M., Kunicki, T. J., Ozaki, Y. & Watson, S. P. (2006). Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha_6\beta_1$ -dependent activation of GPVI. *Blood*, 107(4), 1405–1412. doi:10.1182/blood-2005-06-2406
- Italiano, J. E., Jr, Lecine, P., Shivdasani, R. A., & Hartwig, J. H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *The Journal of Cell Biology*, 147(6), 1299–1312.
- Jain, N. C. (1993). *Essentials of veterinary hematology*. (pp. 105 - 120). Malvern, Pennsylvania, USA: Lea & Febiger.
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D. D., Italiano, J. E., Jr., Shivdasani, R. A. & von Andrian, U. H. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, 317(5845), 1767–1770. doi:10.1126/science.1146304
- Jurk, K., & Kehrel, B. E. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31(4), 381–392. doi:10.1055/s-2005-916671
- Klein, C. P., Wagner, S. C., & Silva, J. B. da. (2011). Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(4), 509.
- Machlus, K. R., & Italiano, J. E., Jr. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of Cell Biology*, 201(6), 785–796. doi:10.1083/jcb.201304054
- Maia, L., & Souza, M. V. de. (2009). Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. *Ciência Rural*, 39(4), 1279–1286.
- Man, D., Plosker, H., & Winland-Brown, J. E. (2001). The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 107(1), 229–237; discussion 238–239.
- Maroco, J. (2007). *Análise estatística – Com utilização do Spss* (3ª ed.).(pp. 46-47; 71-73;154-163). Lisboa: Edições Sílabo.
- Marx, R. E. (2001). Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry*, 10(4), 225–228.
- Marx, R. E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 62(4), 489–496.
- Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., & Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 85(6), 638–646.

- McConnell, M. F.. (2000a). Haemostatic Diagnosis Techniques. In M. J. Day, A. Mackin & J. Littlewood (Eds), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp. 174-175). Quedgeley, Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association.
- McConnell, M. F.. (2000b). Overview of haemostasis. In M. J. Day, A. Mackin & J. Littlewood (Eds), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp. 165-171). Quedgeley, Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association.
- McLellan, J., & Plevin, S. (2011). Does it matter which platelet-rich plasma we use? *Equine Veterinary Education*, 23(2), 101–104. doi:10.1111/j.2042-3292.2010.00185.x
- Nagata, M. J. H., Messoria, M. R., Furlaneto, F. A. C., Fucini, S. E., Bosco, A. F., Garcia, V. G., Deliberador, T. M. & de Melo, L. G. N. (2010). Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *European Journal of Dentistry*, 4(4), 395–402.
- Okamura, T., Koh, E., & Yokoyama, S. (2001). Effect of autologous platelet-rich plasma (PRP) in cardiac surgery. *Kyobu geka. The Japanese journal of thoracic surgery*, 54(5), 397–400. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357304>
- Pardo, M., Sacco, S. R., Surian, C. R. S. & Landim - Alvarenga, F. C (2012). Principais usos do plasma em plaquetas em medicina veterinária, *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* (18). Acedido em Abr. 27, 2014, disponível em http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/mU8J9OaisiRuIg8_2013-6-25-18-11-10.pdf
- Patel, S. R., Hartwig, J. H., & Italiano, J. E., Jr. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3348–3354. doi:10.1172/JCI26891
- Perazzi, A., Busetto, R., Martinello, T., Drigo, M., Pasotto, D., Cian, F., Patruno, M. & Iacopetti, I. (2013). Description of a double centrifugation tube method for concentrating canine platelets. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 146. doi:10.1186/1746-6148-9-146
- Pereira, R. C. F. (2012). Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Santa Maria, RS, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria- Centro de Ciências Rurais
- Pereira, R. C., Freitas Zacarias, G. V., Cantarelli, C., Burgo Corrêa, M. M., da Silva, G. B., Trindade Barbosa, A. L., Brass, K. E. & De La Côte, F. D. (2013). Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. (Portuguese). *Evaluation of Seven Platelet-Rich Plasma Processing Protocols in the Equine Species. (English)*, 43(6), 1122–1127.
- Petrie, A., & Watson, P. (1999). *Statistics for Veterinary and Animal Science*. (pp. 11-18; 44-51; 70-75). UK: Blackwell Science.
- Pham, P. V., Bui, K. H.-T., Ngo, D. Q., Vu, N. B., Truong, N. H., Phan, N. L.-C., Le, D. M., Duong, T. D., Nguyen, T. D. & Phan, N. K. (2013). Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(4), 91. doi:10.1186/scrt277
- Pieri, F., Lucarelli, E., Corinaldesi, G., Fini, M., Aldini, N. N., Giardino, R., Donati, D. & Marchetti, C. (2009). Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*:

- Pietrzak, W. S., & Eppley, B. L. (2005). Platelet rich plasma: biology and new technology. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 16(6), 1043–1054.
- Prakash, S., & Thakur, A. (2011). Platelet Concentrates: Past, Present and Future. *Journal of Maxillofacial & Oral Surgery*, 10(1), 45–49. doi:10.1007/s12663-011-0182-4
- Richardson, J. L., Shivdasani, R. A., Boers, C., Hartwig, J. H., & Italiano, J. E., Jr. (2005). Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*, 106(13), 4066–4075. doi:10.1182/blood-2005-06-2206
- Rizzi, T. E., Clinkenbeard, K. D. & Meinkoth, J. H. (2010). *Normal hematology of the cat*. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed.) (pp. 576- 585). Ames ,IA: Wiley-Blackwell.
- Ruggeri, Z. M. (2009). Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 16(1), 58–83. doi:10.1080/10739680802651477
- Russell, K. E. (2010). Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed.) (pp. 576-585). Ames ,IA: Wiley-Blackwell.
- Sánchez-González, D. J., Méndez-Bolaina, E., & Trejo-Bahena, N. I. (2012). Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *International Journal of Peptides*, 2012, 532519. doi:10.1155/2012/532519
- Shanaman, R., Filstein, M. R., & Danesh-Meyer, M. J. (2001). Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 21(4), 345–355.
- Silva, R. F., Carmona, J. U., & Rezende, C. M. (2012a). Comparison of the effect of calcium gluconate and batroxobin on the release of transforming growth factor beta 1 in canine platelet concentrates. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 121. doi:10.1186/1746-6148-8-121
- Silva, R. F., Álvarez, M. E., Ríos, D. L., López, C., Carmona, J. U., & Rezende, C. M. (2012b). Evaluation of the effect of calcium gluconate and bovine thrombin on the temporal release of transforming growth factor beta 1 and platelet-derived growth factor isoform BB from feline platelet concentrates. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 212. doi:10.1186/1746-6148-8-212
- Smith, R. G.; Gassmann, C. J, & Campbell, M. S. (2007). Platelet-rich plasma: properties and clinical applications. *The Journal of Lancaster General Hospital*, 2(2)
- Stasi, R., Bosworth, J., Rhodes, E., Shannon, M. S., Willis, F., & Gordon-Smith, E. C. (2010). Thrombopoietic agents. *Blood Reviews*, 24(4-5), 179–190. doi:10.1016/j.blre.2010.04.002
- Stockham, S. L. & Scott, M. A. (2008). *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology* (2nd ed.)(pp?). Ames, IA: Blackwell Publishing
- Stokol, T. (2000). Disorders of platelet function. In M. J. Day, A. Mackin & J. Littlewood (Eds), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp. 197-202). Quedgeley, Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association.
- Sunitha Raja, V., & Munirathnam Naidu, E. (2008). Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 19(1), 42–46.

- Suvarna, S., Sahoo, S., Gupta, A. & Kuma, P. (2013) Letters to editor: Platelet-rich plasma as a promising innovation in dentistry: An epigrammatic outlook. *Nigerian Journal of Basic and Clinical Sciences*, 37-38 10 (1). doi: 10.4103/0331-8540.117246
- Tabélé, C., Montana, M., Curti, C., Terme, T., Rathelot, P., Gensollen, S., & Vanelle, P. (2012). Organic Glues or Fibrin Glues from Pooled Plasma: Efficacy, Safety and Potential as Scaffold Delivery Systems. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 124–140.
- Tanaka, Y., Kurashima, K., Saito, H., Nagai, A., Tsutsumi, Y., Doi, H., Namura, N. & Hanawa, T. (2009). In vitro short-term platelet adhesion on various metals. *Journal of Artificial Organs: The Official Journal of the Japanese Society for Artificial Organs*, 12(3), 182–186. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19894092>
- Thon, J. N., Montalvo, A., Patel-Hett, S., Devine, M. T., Richardson, J. L., Ehrlicher, A., Larson, M. K., Hoffmeister, K., Hartwig, J. H. & Italiano, J. E., Jr. (2010). Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *The Journal of Cell Biology*, 191(4), 861–874. doi:10.1083/jcb.201006102
- Vanat, N., Medeiros, T. N. da S., Balarin, M. R. S., Pereira, P. M., & Biasi, F. (2012). Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(1), 313–322. doi:10.5433/6488
- Vavken, P., Saad, F. A., & Murray, M. M. (2010). Age dependence of expression of growth factor receptors in porcine ACL fibroblasts. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 28(8), 1107–1112. doi:10.1002/jor.21111
- Vendramin, F. S., Franco, D., & Franco, T. R. (2009). Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo; Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. *Rev. bras. cir. plást*, 24(2), 212–218.
- Vendruscolo, C. P., Carvalho, A. de M., Moraes, L. F., Maia, L., Queiroz, D. L., Watanabe, M. J., Yamada, A. L. M. & Alves, A. L. G. (2012a). Evaluating the effectiveness of different protocols for preparation of platelet rich plasma for use in equine medicine. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(2), 106–110. doi:10.1590/S0100-736X2012000200002
- Vendruscolo, C. do P., Watanabe, M. J., Maia, L., Carvalho, A. M. de, & Alves, A. L. G. (2012b). Plasma rico em plaquetas: uma nova perspectiva terapêutica para Medicina Equina. *Veterinária e Zootecnia*, 19(1), 033–043.
- Voigt, G. L. (2000). *Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians*. (pp. 103-107). Ames, IA: Wiley-Blackwell.
- Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., & Hitzler, W. E. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34(4), 665–671. Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., & Hitzler, W. E. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34(4), 665–671. Resumo retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050897>
- Weiss, J. D. & Tvedten, J. H. (2012). *The complete blood count, bone marrow examination and blood banking. General comments and selected techniques*. In M. Willard & H. Tvedten, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (5th ed.) (pp. 22-23). St. Louis, MI: Elsevier.
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835–870. doi:10.1152/physrev.00031.2002

- Whitman, D. H., Berry, R. L., & Green, D. M. (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 55(11), 1294–1299.
- Wroblewski, A. P., Mejia, H. A., & Wright, V. J. (2010). Application of Platelet-Rich Plasma to Enhance Tissue Repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 20(2), 98–105. doi:10.1053/j.oto.2009.10.006

ANEXOS

ANEXO I: Casuística discriminada referente aos casos observados nos serviços do HSVB.

Tabela 21. Casuística discriminada referente ao serviço de consulta externa do HSVB.

Consulta especializada	Espécie	Diagnóstico	Nº de casos	Nº de casos por área
Cardiologia	Canídeos	Insuficiência da tricúspide	1	3
		Insuficiência da válvula mitral	1	
		Persistência do ducto arterial	1	
Comportamento animal	Felídeos	Alterações de socialização	1	1
Dermatologia	Canídeos	Demodecose	2	14
		Dermatite alérgica a picada da pulga (DAPP)	2	
		Dermatite atópica	1	
		Otite externa	3	
	Felídeos	DAPP	2	
		Dermatofitose	1	
		Dermatite miliar	1	
Doenças infecciosas	Canídeos	Otite externa	2	
		Babesiose	1	4
		Parvovirose	1	
	Traqueobronquite infecciosa canina	1		
	Felídeos	Micoplasmose	1	

Consulta especializada (continuação)	Espécie (continuação)	Diagnóstico (continuação)	Nº de casos (cont.)	Nº de casos por área (cont.)
Endocrinologia	Canídeos	Hiperadrenocorticismo	2	3
		Hipoadrenocorticismo	1	
Gastroenterologia	Canídeos	Gastroenterite (indiscrição alimentar)	2	8
		Gastrite	3	
		Enterite	2	
		Hemorragia GI	1	
Medicina preventiva	Canídeos	Primovacinação e desparasitação	3	12
		Reforço vacinal	3	
	Felídeos	Primovacinação	1	
		Reforço vacinal	5	
Novos animais de companhia	Leporídeos	Ausência de cecotrofia	1	5
		Sobrecrescimento dentário	1	
		Úlcera da córnea	1	
	Roedores	Nódulo subcutâneo	1	
		Pododermatite	1	
Oftalmologia	Canídeos	Cataratas	1	4
		Úlcera córnea	1	
	Felídeos	Conjuntivite	1	
		Úlcera córnea	1	
Oncologia	Canídeos	Adenocarcinoma nasal	1	2
		Sarcoma pulmonar	1	

Consulta especializada (continuação)	Espécie (continuação)	Diagnóstico (continuação)	Nº de casos (cont.)	Nº de casos por área (cont.)
Ortopedia	Canídeos	Subluxação da rótula	1	2
	Felídeos	Fratura de úmero	1	
Pneumologia	Felídeo	Rinite alérgica	1	3
		Asma felina	1	
	Canídeos	Pneumonia	1	
Reprodução e obstetrícia	Canídeos	Testículo ectópico	1	1
Toxicologia	Canídeos	Intoxicação por Diazinão	1	1
Urologia e Nefrologia	Canídeos	Insuficiência renal crónica (IRC)	2	5
		Cálculos Vesicais	1	
	Felídeos	Doença do trato urinário inferior felino (FLUTD)	1	
		Insuficiência renal aguda (IRA)	1	
Consultas de seguimento e tratamentos continuados	Canídeos	Seguimento de carcinoma pulmonar	1	6
		Seguimento pós-cirúrgico	5	
Total de casos				74

Tabela 22. Casuística discriminada referente ao serviço de internamento do HVSB.

* Recobro pós-cirúrgico.

Área clínica	Espécie	Diagnóstico	Nº de casos	Nº de casos por área
Cardiologia	Felídeos	Derrame pericárdico	1	4
	Canídeos	Insuficiência cardíaca congestiva	3	
Dermatologia	Felídeos	DAPP	2	2
Doenças infecciosas	Canídeos	Babesiose	1	19
		Parvovirose	2	
		Rickettsiose	1	
	Felídeos	FIV/FeLV	5	
		Micoplasmose	1	
		Panleucopénia	6	
		PIF	2	
	Toxoplasmose	1		
Endocrinologia	Canídeos	<i>Diabetes mellitus</i> (curva de glicémia)	3	9
		Hipoadrenocorticismo	1	
		Pancreatite com cetoacidose diabética	1	
	Felídeos	<i>Diabetes mellitus</i> (curva de glicémia)	3	
		Hiperglicémia	1	
Gastroenterologia	Canídeos	Insuficiência hepática	1	41
		Peritonite	1	
		Dilatação gástrica	2	
		Encarceração intestinal*	1	
		Enterite	1	
		Gastroenterite	6	
		Gastroenterite (indiscrição alimentar)	4	
		Ingestão de Corpo estranho (CE) *	3	

Área clínica (continuação)	Espécie (continuação)	Diagnóstico (continuação)	Nº de casos (cont.)	Nº de casos por área (cont.)
Gastroenterologia	Canídeos	Megaesófago	1	41
		Pancreatite	1	
		Shunt Portossistémico	1	
		Torção gástrica*	1	
		Úlcera de estômago perfurada*	2	
	Felídeos	Enterite	3	
		Enterocolite crônica linfoplasmocitária	1	
		Esteatose hepática	1	
		Gastrite	1	
		Gastroenterite	3	
		Ingestão de Corpo estranho (CE)*	1	
		Megacólon*	1	
		Pancreatite	3	
Peritonite*	1			
Roedores	Colite	1		
Neurologia	Canídeos	Compressão medular*	3	10
		Epilepsia idiopática	2	
		Epilepsia secundária a tumor cerebral (glioma)	1	
		Síndrome vestibular central	1	
		Síndrome vestibular periférico	2	
	Felídeos	Tromboembolismo vascular	1	

Área clínica (continuação)	Espécie (continuação)	Diagnóstico (continuação)	Nº de casos (cont.)	Nº de casos por área (cont.)
Oftalmologia	Canídeos	Entrópion*	1	4
		Luxação do cristalino*	1	
		Glaucoma	1	
		Uveíte	1	
Oncologia	Canídeos	Adenocarcinoma intestinal*	1	16
		Hemangiossarcoma*	1	
		Leiomiossarcoma*	1	
		Neoplasia mamária*	4	
		Protocolos quimioterápicos	1	
		Sarcoma pulmonar*	1	
	Felídeos	Carcinoma das células escamosas*	1	
		Carcinoma nasal*	2	
		Neoplasia da cavidade oral*	1	
		Neoplasia mamária*	3	
Ortopedia	Canídeos	Fratura de fémur*	4	16
		Fratura de rádio e ulna*	1	
		Fratura do úmero*	1	
		Fratura patológica da mandíbula*	1	
		Luxação coxofemoral	1	
		Rutura de ligamento cruzado cranial (RLCC)	1	
		Felídeos	Fratura fémur*	
	Fratura de úmero*		2	
	Fratura de metacarpos/metatarsos*		1	
	Fratura de mandíbula*		1	
	Leporídeos	Fratura isquiática*	1	

Área clínica (continuação)	Espécie (continuação)	Diagnóstico (continuação)	Nº de casos (cont.)	Nº de casos por área (cont.)
Ortopedia	Roedores	Amputação de membro posterior*	1	16
Pneumologia	Canídeos	Colapso da traqueia	1	10
		Edema do pulmão cardiogénico	1	
		Pneumonia	1	
	Felídeos	Asma felina	4	
Pneumotórax*		1		
Quilotórax		1		
	Leporídeos	Pneumonia	1	
Reprodução e obstetrícia	Canídeos	Distócia*	1	18
		Ovariohisterectomia electiva*	3	
		Orquiectomia eletiva*	2	
		Piómetra*	4	
	Felídeos	Ovariohisterectomia eletiva*	3	
		Orquiectomia eletiva*	5	
Toxicologia	Canídeos	Intoxicação por contacto com a larva processionária	1	3
	Felídeos	Intoxicação por consumo de paracetamol	1	
		IRA por ingestão de lírios	1	
Traumatologia	Canídeos	Otohematoma*	5	23
		Politraumatizado*	1	
		Trauma localizado/lacerações*	3	
	Felídeos	Politraumatizado*	7	
		Trauma localizado/lacerações*	6	

Área clínica (continuação)	Espécie (continuação)	Diagnóstico (continuação)	Nº de casos (cont.)	Nº de casos por área (cont.)
Traumatologia	Psitacídeos	Trauma localizado/lacerações*	1	23
Urologia e nefrologia	Canídeos	Agudização de IRC	1	28
		Cálculos uretrais*	1	
		Cálculos vesicais*	1	
		ITU	1	
		ITU multirresistente	1	
		IRC	2	
	Felídeos	Biópsia renal*	1	
		Cálculos uretrais*	2	
		Cálculos vesicais*	2	
		FLUTD	3	
		Infeção do trato urinário (ITU)	1	
		IRA	4	
		ITU	1	
		Seguimento de IRC (fluidoterapia)	7	
Outras	Canídeos	Diálise peritoneal *	1	1
Total de casos				204

Tabela 23. Casuística discriminada referente ao serviço de cirurgia do HVSB.

Área de cirurgia	Espécie	Procedimento cirúrgico	Nº de casos	Nº de casos por área
Cirurgia de tecidos moles	Canídeos	Cistotomia	2	50
		Enterotomia	1	
		Enucleação Unilateral	1	
		Esplenectomia	2	
		Exérese de neoformações	2	
		Exérese de nódulos cutâneos	3	
		<i>Flap</i> conjuntival	1	
		Gastrotomia	1	
		Mastectomia Unilateral	1	
		Orquiectomia eletiva	3	
		Ovariohisterectomia electiva	6	
		Resolução de entrópion	1	
		Resolução de hérnia perianal	1	
		Resolução de prolapso da glândula de Harder	1	
		Uretrostomia	1	
	Felídeos	Cistotomia	1	
		Enterotomia	1	
		Exérese de neoformações	2	
		<i>Flap</i> conjuntival	1	
		Mastectomia Unilateral	3	
		Orquiectomia eletiva	6	
		Ovariohisterectomia electiva	5	
		Uretrostomia	2	
	Leporídeos	Nefrectomia unilateral	1	
		Ovariohisterectomia	1	

Área de cirurgia (continuação)	Espécie (continuação)	Procedimento cirúrgico (continuação)	Nº de casos (cont.)	Nº de casos por área (cont.)
Cirurgia ortopédica	Canídeos	Hemilaminectomia	1	13
		Remoção de placas fixadoras	3	
		Resolução de fratura de fémur	3	
		Resolução de RLCC (TTA - avanço da tuberosidade tibial)	1	
		Resolução de rutura do ligamento cruzado cranial (TPLO - Osteotomia de Nivelamento da Meseta Tibial)	1	
		Sinfisiodesse púbica	1	
	Sutura de lacerações	1		
	Felídeos	Avaliação de fratura de crânio	1	
Resolução de fratura rádio-ulnar		1		
Odontologia e cirurgia maxilo-facial	Canídeos	Destartarização	10	20
		Extrações dentárias	3	
	Felídeos	Destartarização	1	
		Extrações dentárias	1	
		Remoção de neoformações	1	
Leporídeos	Corte de incisivos	3		
Roedores	Corte de incisivos	1		
Pequenas intervenções cirúrgicas	Canídeos	Biópsia ecoguiada (próstata)	2	19
		Colonoscopia	2	
		Endoscopia	1	
		Limpeza cirúrgica de feridas	5	
		Otohematoma	2	
		Rinoscopia	1	
		Sutura de lacerações	3	
	Felídeos	Colocação de sonda esofágica	2	
		Colocação de sonda gástrica através de endoscopia	1	
Total de casos				102

ANEXO II: Protocolo do “estudo força”.

(Dados do animal) ID: _____

Data: _____

1. Retirar sangue venoso por punção asséptica da veia jugular, até perfazer os 4,5 ml do tubo de colheita. Homogeneizar;
2. Fazer hematócrito;
3. Colocar os reagentes nos tubos previamente identificados
 - i. GV: 2000 µl de soro fisiológico
 - ii. GB: 400 µl de Türk
 - iii. PLT: 2000 µl de oxalato de amônio 1%

EPPENDORF A

4. Pipetar 1mL para o *eppendorf* A;
5. 1ª CENTRIFUGAÇÃO Força **100** (g) x Tempo **5** (min)
6. Passagem de ____ µl de soro + CF para *eppendorf*;
7. Análise:
 - a. Adicionar soro aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.
8. 2ª CENTRIFUGAÇÃO Força **200** (g) x Tempo **10** (min)
9. Dispensar **1/3** de PPP: ____µl;
10. Análise de PRP:
 - a. Adicionar PRP aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.

EPPENDORF B

11. Pipetar 1mL para o *eppendorf* B;
12. 1ª CENTRIFUGAÇÃO Força **200** (g) x Tempo **5** (min)
13. Passagem de ____ µl de soro + CF para *eppendorf*;
14. Análise:
 - a. Adicionar soro aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.
15. 2ª CENTRIFUGAÇÃO Força **400** (g) x Tempo **10** (min)
16. Dispensar **1/3** de PPP: ____µl;
17. Análise de PRP:
 - a. Adicionar PRP aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. GB: Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar

EPPENDORF C

18. Pipetar 1mL para o *ependorf C*;
19. 1ª CENTRIFUGAÇÃO Força **400** (g) x Tempo **5** (min)
20. Passagem de ____ µl de soro + CF para *ependorf*;
21. Análise:
 - a. Adicionar soro aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.
22. 2ª CENTRIFUGAÇÃO Força **800** (g) x Tempo **10** (min)
23. Dispensar **1/3** de PPP: ____µl;
24. Análise de PRP:
 - a. Adicionar PRP aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.

EPPENDORF S – sem centrifugação

25. Pipetar 1mL para o *ependorf S*;
26. Análise de sangue:
 - a. Adicionar sangue aos tubos com reagentes
 - i. GV: 10 µl sangue + 2000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 2000 µl de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.

ANEXO III: Protocolo do “estudo tempo”.

(Dados do animal) ID: _____

Data: _____

1. Retirar sangue venoso por punção asséptica da veia jugular, até perfazer os 4,5 ml do tubo de colheita. Homogeneizar;
2. Fazer hematócrito;
3. Colocar os reagentes nos tubos previamente identificados
 - i. GV: 2000 µl de soro fisiológico
 - ii. GB: 400 µl de Türk
 - iii. PLT: 2000 µl de oxalato de amônio 1%

EPPENDORF A

4. Pipetar 1mL para o eppendorf A;
5. 1ª CENTRIFUGAÇÃO Força **100** (g) x Tempo **5** (min)
6. Passagem de _____ µl de soro + CF para eppendorf;
7. Análise:
 - a. Adicionar soro aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.
8. 2ª CENTRIFUGAÇÃO Força **200** (g) x Tempo **10** (min)
9. Dispensar 1/3 de PPP: _____ µl;
10. Análise de PRP:
 - a. Adicionar PRP aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.

EPPENDORF B

11. Pipetar 1mL para o eppendorf B;
12. 1ª CENTRIFUGAÇÃO Força **100** (g) x Tempo **5** (min)
13. Passagem de _____ µl de soro + CF para eppendorf;
14. Análise:
 - a. Adicionar soro aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.
15. 2ª CENTRIFUGAÇÃO Força **200** (g) x Tempo **15** (min)
16. Dispensar 1/3 de PPP : _____ µl;
17. Análise de PRP:
 - a. Adicionar PRP aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. GB: Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar

EPPENDORF C

27. Pipetar 1mL para o eppendorf C;
28. 1ª CENTRIFUGAÇÃO Força **100** (g) x Tempo **5** (min)
29. Passagem de _____ µl de soro + CF para eppendorf;
30. Análise:
- a. Adicionar soro aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.
31. 2ª CENTRIFUGAÇÃO Força **200** (g) x Tempo **5** (min)
32. Dispensar 1/3 de PPP: _____ µl;
33. Análise de PRP:
- a. Adicionar PRP aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.

EPPENDORF D

34. Pipetar 1mL para o eppendorf D;
35. 1ª CENTRIFUGAÇÃO Força **100** (g) x Tempo **10** (min)
36. Passagem de _____ µl de soro + CF para eppendorf;
37. Análise:
- a. Adicionar soro aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - c. PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.
38. 2ª CENTRIFUGAÇÃO Força **200** (g) x Tempo **10** (min)
39. Dispensar 1/3 de PPP: _____ µl;
40. Análise de PRP:
- a. Adicionar PRP aos tubos com reagentes
 - i. GV: 20 µl sangue + 4000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 1,9 ml de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b. GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x.
 - PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar

EPPENDORF S – sem centrifugação

41. Pipetar 1mL para o eppendorf S;
42. Análise de sangue:
- a) Adicionar sangue aos tubos com reagentes
 - i. GV: 10 µl sangue + 2000 µl de soro fisiológico. Agitar suavemente 2min.
 - ii. GB: 20 µl sangue + 400 µl de Türk. Agitar suavemente 2min.
 - iii. PLT: 10 µl de sangue + 2000 µl de oxalato de amônio 1%. Homogeneizar. Aguardar 10 min.
 - b) GV e GB: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer. Repousar 1-2min. Observar 100x ou 400x
 - c) PLT: Homogeneizar. Colocar em câmara de Neubauer, aguardar 10-15 min em câmara húmida. Observar.

ANEXO IV: Resultados da análise estatística do “estudo força”: comparação das contagens médias de plaquetas, hemácias e leucócitos no sangue e nos três PRP obtidos após cada centrifugação e entre os PRP da primeira e da segunda centrifugação.

Tabela 24. ANOVA de medições repetidas a um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos três PRP (A, B e C) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes forças (100, 200 e 400g).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação (ID)	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (>F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (dentro dos grupos)	8	272450	34056		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (entre os grupos)	3	380289	126763	3.533	0.0299
	Residual (dentro dos grupos)	24	861061	35878		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	212.22	88.72	2.392	0.0782
B - 0	134.44	88.72	1.515	0.4282
C - 0	-44.44	88.72	-0.501	0.9589
B - A	-77.78	88.72	-0.877	0.8170
C - A	-256.67	88.72	-2.893	0.0198
C - B	-178.89	88.72	-2.016	0.1818

Tabela 25. ANOVA de medições repetidas a um fator para a comparação das contagens médias de leucócitos no sangue e nos três PRP (A, B e C) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes forças (100, 200 e 400g).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (Dentro dos grupos)	8	367.8	45.97		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (Entre os grupos)	3	66.16	22.053	2.41	0.0918
	Residual (Dentro dos grupos)	24	219.66	9.152		

Tabela 26. ANOVA de medições repetidas a um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos três PRP (A, B e C) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes forças (100, 200 e 400g).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (Dentro dos grupos)	8	23817456	2977182		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (Entre os grupos)	3	207575356	69191785	97.82	1.36e-13
	Residual (Dentro dos grupos)	24	16976744	707364		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-5162.2	396.5	-13.020	<1e-04
B - 0	-5796.7	396.5	-14.621	<1e-04
C - 0	-5601.1	396.5	-14.127	<1e-04
B - A	-634.4	396.5	-1.600	0.378
C - A	-438.9	396.5	-1.107	0.685

Tabela 27. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos três PRP (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das amostras a diferentes forças (200, 400 e 800g).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (Dentro dos grupos)	8	103695	12962		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (Entre os grupos)	3	311172	103724	13.82	1.94e-05
	Residual (Dentro dos grupos)	24	180169	7507		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-200.67	40.84	-4.913	<1e-05
B - 0	-227.78	40.84	-5.577	<1e-05
C - 0	-212.22	40.84	-5.196	<1e-05
B - A	-27.11	40.84	-0.664	0.911
C - A	-11.56	40.84	-0.283	0.992
C - B	15.56	40.84	0.381	0.981

Tabela 28. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de leucócitos no sangue e nos três PRP (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das amostras a diferentes forças (200, 400 e 800g).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (Dentro dos grupos)	8	45.96	5.745		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (Entre os grupos)	3	540.3	180.11	29.38	3.34e-08
	Residual (Dentro dos grupos)	24	147.2	6.13		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-8.63889	1.15803	-7.460	<1e-06
B - 0	-9.11667	1.15803	-7.873	<1e-06
C - 0	-9.05556	1.15803	-7.820	<1e-06
B - A	-0.47778	1.15803	-0.413	0.976
C - A	-0.41667	1.15803	-0.360	0.984
C - B	0.06111	1.15803	0.053	1.000

Tabela 29. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos três PRP (A, B e C) resultantes da segunda centrifugação das amostras a diferentes forças (200, 400 e 800g).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (Dentro dos grupos)	8	15159247	1894906		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (Entre os grupos)	3	325106043	108368681	122.4	1.11e-14
	Residual (Dentro dos grupos)	24	21241594	885066		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-6697.333	443.488	-15.102	<1e-05
B - 0	-7048.889	443.488	-15.894	<1e-05
C - 0	-7050.000	443.488	-15.897	<1e-05
B - A	-351.556	443.488	-0.793	0.858
C - A	-352.667	443.488	-0.795	0.857
C - B	-1.111	443.488	-0.003	1.000

Tabela 30. Teste de Wilcoxon para a comparação das médias das contagens de plaquetas, hemácias e leucócitos nos protocolos força da primeira (PRP1: 100, 200 e 400g) e da segunda centrifugação (PRP2: 200, 400 e 800g).

TESTE DE WILCOXON (WILCOXON SIGNED RANK TEST)		
Elemento celular	Estatística de teste	Valor de <i>p</i>
Plaquetas	1368	6.41e-10
Leucócitos	1115	0.001356
Hemácias	1387.5	2.67e-08

ANEXO V: Resultados da análise estatística do “estudo tempo”: comparação das contagens médias de plaquetas, hemácias e leucócitos no sangue e nos quatro PRP obtidos após cada centrifugação e entre os PRP da primeira e da segunda centrifugação

Tabela 31. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 5, 5, 5 e 10 min.).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação (ID)	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (dentro dos grupos)	10	277295	27729		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (entre os grupos)	4	268600	67150	2.691	0.0446
	Residual (dentro dos grupos)	40	998160	24954		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-79.09	67.36	-1.174	0.7662
B - 0	10.91	67.36	0.162	0.9998
C - 0	125.45	67.36	1.863	0.3378
D - 0	-48.18	67.36	-0.715	0.9531
B - A	90.00	67.36	1.336	0.6686
C - A	204.55	67.36	3.037	0.0202
D - A	30.91	67.36	0.459	0.9909
C - B	114.55	67.36	1.701	0.4335
D - B	-59.09	67.36	-0.877	0.9053
D - C	-173.64	67.36	-2.578	0.0744

Tabela 32. ANOVA de medições repetidas um fator para a comparação das contagens médias de leucócitos no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 5, 5, 5 e 10 min.).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação (ID)	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (dentro dos grupos)	10	669	66.9		
Indivíduos/Sujeitos: Força	Fator (entre os grupos)	4	91.5	22.86	1.921	0.126
	Residual (dentro dos grupos)	40	476.0	11.90		

Tabela 33. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 5, 5, 5 e 10 min.).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação (ID)	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (dentro dos grupos)	10	12258316	1225832		
	Fator (entre os grupos)	4	166271567	41567892	27.05	6.58e-11
Indivíduos/Sujeitos: Força	Residual (dentro dos grupos)	40	61475350	1536884		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-4576.9	517.8	-8.839	<1e-04
B - 0	-4276.9	517.8	-8.260	<1e-04
C - 0	-4387.8	517.8	-8.474	<1e-04
D - 0	-4066.9	517.8	-7.854	<1e-04
B - A	300.0	517.8	0.579	0.978
C - A	189.1	517.8	0.365	0.996
D - A	510.0	517.8	0.985	0.862
C - B	-110.9	517.8	-0.214	1.000
D - B	210.0	517.8	0.406	0.994
D - C	320.9	517.8	0.620	0.972

Tabela 34. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de plaquetas no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após a segunda centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 10, 15, 5 e 20 min.).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação (ID)	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (dentro dos grupos)	10	199086	199092		
	Fator (entre os grupos)	4	631817	157954	8.382	5.22e-05
Indivíduos/Sujeitos: Força	Residual (dentro dos grupos)	40	753768	18844		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-225.45	58.53	-3.852	0.001039
B - 0	-242.73	58.53	-4.147	0.000322
C - 0	-262.68	58.53	-4.488	< 1e-04
D - 0	-306.36	58.53	-5.234	< 1e-04
B - A	-17.27	58.53	-0.295	0.998350
C - A	-37.22	58.53	-0.636	0.969243
D - A	-80.91	58.53	-1.382	0.639083
C - B	-19.95	58.53	-0.341	0.997104
D - B	-63.64	58.53	-1.087	0.813276
D - C	-43.69	58.53	-0.746	0.945502

Tabela 35. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de leucócitos no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após a segunda centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 10, 15, 5 e 20 min.).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação (ID)	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos	Residual (dentro dos grupos)	10	41.75	4.175		
	Fator (entre os grupos)	4	384.2	96.05	22.67	7.75e-10
Indivíduos/Sujeitos: Força	Residual (dentro dos grupos)	40	169.5	4.24		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-6.595455	0.876394	-7.526	<1e-07
B - 0	-6.563636	0.876394	-7.489	<1e-07
C - 0	-6.600000	0.876394	-7.531	<1e-07
D - 0	-6.668182	0.876394	-7.609	<1e-07
B - A	0.031818	0.876394	0.036	1
C - A	-0.004545	0.876394	-0.005	1
D - A	-0.072727	0.876394	-0.083	1
C - B	-0.036364	0.876394	-0.041	1
D - B	-0.104545	0.876394	-0.119	1
D - C	-0.068182	0.876394	-0.078	1

Tabela 36. ANOVA de medições repetidas um fator e teste *post-hoc* de Tukey para a comparação múltipla das contagens médias de hemácias no sangue e nos quatro PRP (A, B, C e D) obtidos após a segunda centrifugação das amostras a diferentes tempos (respetivamente, 10, 15, 5 e 20 min.).

ANOVA DE MEDIÇÕES REPETIDAS A UM FATOR						
	Fonte de variação (ID)	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F	Pr (> F)
Indivíduos/Sujeitos:	Residual (dentro dos grupos)	10	7422668	742267		
	Fator (entre os grupos)	4	311242563	77810641	104.1	<2e-16
Força	Residual (dentro dos grupos)	40	29900234	747506		

COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DAS MÉDIAS: TESTE DE TUKEY				
Fonte de variação	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de z	Pr (> z)
A - 0	-5946.909	368.401	-16.142	<1e-10
B - 0	-5946.909	368.401	-16.142	<1e-10
C - 0	-5943.273	368.401	-16.133	<1e-10
D - 0	-5951.455	368.401	-16.155	<1e-10
B - A	0.000	368.401	0.000	1
C - A	3.636	368.401	0.010	1
D - A	-4.545	368.401	-0.012	1
C - B	3.636	368.401	0.010	1
D - B	-4.545	368.401	-0.012	1
D - C	-8.182	368.401	-0.022	1

Tabela 37. Teste de Wilcoxon para a comparação das médias das contagens de plaquetas, hemácias e leucócitos nos protocolos tempo da primeira (PRP1: 5, 5, 5 e 10min.) e da segunda centrifugação (PRP2: 10,15, 5 e 10min).

TESTE DE WILCOXON (WILCOXON SIGNED RANK TEST)		
Elemento celular	Estatística de teste	Valor de p
Plaquetas	3915	3.915e-16
Leucócitos	2387	0.07416
Hemácias	3420	9.679e-10