

ADRIANO DE ABREU CORTEZE

PLASMA RICO EM TROMBÓCITOS (PRT) EM GALINHAS ADULTAS (*Gallus
gallus domesticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Escola de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-
requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cleuza Maria de Faria Rezende

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabíola de Oliveira Paes Leme

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2019

C828p

Cortez, Adriano de Abreu, 1982

Plasma Rico em Trombócitos (PRT) em Galinhas Adultas (*Gallus gallus domesticus*) /
Adriano de Abreu Cortez- 2019

34 p.: il.

Orientador: Cleuza Maria de Faria Rezende
Coorientadora: Fabíola de Oliveira Paes Leme

Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

1. – Trombócitos – Plaquetas. 2. - aves – galinhas – plasma – Teses. 3.- Terapia celular
Teses. 4. Pericárdico – I. Rezende, Cleuza Maria de Faria – II. Leme, Fabíola de Oliveira
Paes - II. Universidade Federal de Minas Gerais – Veterinária.

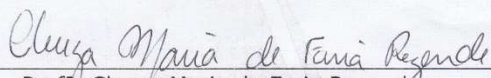
CDD – 636.50892

FOLHA DE APROVAÇÃO

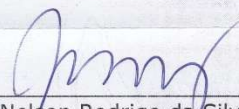
ADRIANO DE ABREU CORTEZE

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS .

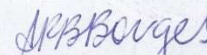
Aprovada em 08 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Profª. Cleuza Maria de Faria Rezende
Presidente - Orientador



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Andréa Pacheco Batista Borges
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Dedico esse trabalho ao meu irmão Fausto (*in memoriam*).

Agradecimentos

À professora Cleuza, por ter aceito ser minha orientadora nesses dois anos e por todo conhecimento passado a mim.

Agradeço a minha família por sempre me apoiarem em minhas decisões e por estarem sempre ao meu lado, mesmo distante, me ajudando e me dando todo apoio em todos os sentidos.

À professora Fabíola, pela co-orientação e pela ajuda em todo o projeto, sem você esse projeto teria sido muito mais difícil do que ele foi.

A Mariana, pela paciência em me aguentar em todos os momentos de estresse, pelo apoio dado em todos os momentos de dificuldades e pela fundamental ajuda no projeto. Obrigado pela amizade, companheirismo e amor.

Ao meu colega de mestrado, *roommate*, amigo e irmão Santiago, que sempre me ajudou em tudo que eu precisei. Obrigado por tudo.

Ao professor Raphael por toda a ajuda e paciência para o desenvolvimento estatístico do projeto.

Ao professor Olicies, por me ensinar a gostar de cirurgia e principalmente de ortopedia e por toda orientação durante a minha graduação.

Ao Anderson, por ter me ajudado a dar os meus primeiros passos no mundo acadêmico e da medicina dos animais selvagens.

Ao Professor Paulo e ao Flávio por todo ensinamento e ajuda durante o meu projeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À Jéssica e ao Hítalo por toda a ajuda na fazenda e na escola.

A todos do Laboratório de Patologia Clínica, pela ajuda e paciência.

A todos os professores e funcionários da Fazenda Escola, em especial ao Maílson e ao professor Leonardo Lara.

E para finalizar, porém não menos importante, aos animais utilizados para esse estudo.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	6
	LISTA DE FIGURAS.....	7
	RESUMO.....	9
	ABSTRACT.....	10
1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVO GERAL.....	12
2.1.	Objetivos específicos.....	12
3.	LITERATURA CONSULTADA.....	13
3.1.	Contenção e colheita de sangue.....	13
3.2.	Componentes celulares do sangue das aves.....	13
3.3.	Anticoagulantes.....	14
3.4.	Plasma rico em plaquetas.....	15
3.5.	Obtenção de concentrado de trombócitos.....	16
4.	MATERIAL E METODOS.....	17
4.1.	Animais.....	17
4.2.	Preparação das aves e colheita de sangue.....	17
4.3.	Preparação do bissulfato de clopidogrel.....	18
4.4.	Processamento do plasma rico em trombócitos.....	18
4.4.1.	Primeira etapa.....	19
4.4.2.	Segunda etapa.....	22
4.5.	Destino dos animais.....	23
4.6.	Análise estatística.....	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1.	Primeira etapa.....	24
5.2.	Segunda etapa.....	26
6.	CONCLUSÃO.....	32
7.	REFERÊNCIAS.....	33

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1 -	Protocolos de centrifugação para a obtenção do PRP mostrando as variações da força centrífuga relativa (g) e variações do tempo expressa em minutos (min).....	19
Tabela 2 -	Valores de trombócitos obtidos antes da centrifugação do sangue total.....	24
Tabela 3 -	Valores médios (desvio-padrão) obtidos da concentração de trombócitos nos protocolos P1, P2, P3 e P4 utilizando (s/c) ou não (c/c) BC.....	26
Tabela 4 -	Contagem hematológica / μ L no sangue total e no concentrado de trombócitos de galinhas (média, erro padrão da média).....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração dos elementos celulares do sangue de galinha: eritrócito (seta vermelha), trombócito (seta preta), heterófilo (seta azul), eosinófilo (seta amarela) e linfócito (seta verde). Coloração Wright-Giemsa, aumento de 1000x. Fonte: Wakenell, 2010.....	14
Figura 2 -	Ilustração do local da venopunção: veia jugular direita (seta) de galinha.....	17
Figura 3 -	Ilustração da balança de precisão e da pesagem do bissulfato de clopidogrel em um criotubo de 1,2 ml (seta).....	18
Figura 4 -	Ilustração do tubo com ACD-A mostrando o volume de sangue colhido de galinha.....	20
Figura 5 -	Ilustração dos criotubos contendo 2ml do sangue total para posterior centrifugação.....	20
Figura 6 -	Ilustração do tubo após a centrifugação mostrando as três frações visíveis, eritrócitos, zona de névoa e plasma e do local da colheita do plasma da primeira etapa.....	21
Figura 7 -	Ilustração da câmara de Neubauer mostrando nos quadrados vermelhos os locais para as contagens de trombócito (A), hemácias (B) e leucócitos (C).....	22
Figura 8 -	Ilustração das fórmulas utilizadas para o cálculo total de hemácias, leucócitos e trombócitos, onde Nh, Nl e Nt representam o número total de hemácias, leucócitos e trombócitos, respectivamente, contados na câmara de Neubauer....	22
Figura 9 -	Ilustração dos tubos após a primeira centrifugação no protocolo P1 (A), P2 (B), P3 (C) e P4 (D).....	25
Figura 10 -	Ilustração mostrando o criotubo após a centrifugação empregando o protocolo P2 mostrando o local da aspiração do PRT (seta).....	27
Figura 11 -	Ilustração do PRT (seta) em um tubo de 1,2 ml.....	27
Figura 12 -	Ilustração mostrando a câmara de Neubauer e a distribuição dos trombócitos, diluído no líquido de Dacie, nos quadrados. Aumento de 100x.....	28
Figura 13 -	Ilustração mostrando a câmara de Neubauer com as células do sangue total (A) e do PRT (B) após a diluição no líquido de Dacie. Aumento de 400x.....	29

Figura 14 -	Ilustração mostrando a câmara de Neubauer com os leucócitos (seta) no PRT após a diluição com líquido de Dacie.....	30
Figura 15 -	Gráfico com os valores dos trombócitos do sangue total e do PRT de cada amostra.....	30

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo para obtenção de plasma rico em trombócitos (PRT) em galinhas. Foram utilizadas 19 galinhas e o projeto foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foram utilizadas amostras de 10 galinhas das quais foram colhidos 7 ml de sangue da veia jugular direita. Foram testados quatro protocolos (P1, P2, P3 e P4) para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) utilizados em mamíferos. O sangue foi colhido em dois tubos diferentes, um contendo ACD-A e outro ACD-A acrescido de bissulfato de clopidogrel (BC). Na segunda etapa foram utilizadas amostras das 19 galinhas das quais foram colhidos 7 ml de sangue em um tubo contendo apenas ACD-A. Para essa etapa foi utilizado o protocolo P2 empregado em gatos, acrescido de modificação da região de colheita do plasma rico em trombócitos. Os resultados da concentração de trombócitos foram analisadas por meio das médias e desvio-padrão. Foi considerado um delineamento em blocos ao acaso com arranjo em parcela subdividida e o teste de Tukey foi realizado para comparação de trombócitos entre protocolos. A presença do efeito de protocolo e do acréscimo de bissulfato de clopidogrel foi avaliada por meio de análise de variância e teste de Fisher. O teste T pareado foi utilizado para comparação entre hemácias, leucócitos e trombócitos no sangue total e no PRT. Na primeira etapa não houve diferença estatística significativa nos resultados utilizando ou não o BC entre os mesmos protocolos. Nenhum dos protocolos mostrou-se eficaz para a obtenção do PRT. As médias (células/ μ L) (desvio-padrão) de trombócitos encontrados no sangue total foi de 48.200 (7208), no protocolo P1 4.800 (951), no protocolo P2 10050 (1932), no protocolo P3 6.750 (1292) e no protocolo P4 8.000 (1169). Os protocolos P1 e P2 foram estaticamente diferentes de todos os outros protocolos e os protocolos P3 e P4 não mostraram diferença estatística entre si. Nenhum dos protocolos apresentou resultado favorável para a obtenção do PRT. Na segunda etapa as médias (desvio-padrão) de trombócitos, eritrócitos e leucócitos no sangue total foi de 45.500 (12.900), 1.984.700 (377.700) e 14.300 (3900) respectivamente. Após a centrifugação e colheita do PRT os valores médios (desvio-padrão) obtidos dos trombócitos, eritrócitos e leucócitos foram respectivamente, de 337.900 (93.600), 189.700 (97.700) e 18.300 (5.400). Houve um aumento de 7,43 vezes dos trombócitos no PRT com relação à média do sangue total. A contagem de eritrócitos, leucócitos e trombócitos antes e após a centrifugação foram estatisticamente diferentes entre si. Os trombócitos das aves mostraram sedimentação em região diferente daquela observada nos mamíferos. Conclui-se, portanto, que é possível concentrar trombócitos em galinhas utilizando o protocolo para obtenção de PRP em gatos adaptado com a mudança da região de aspiração do concentrado de trombócitos.

Palavras-chave: concentrado de trombócitos, aves, terapia celular.

ABSTRACT

The study of platelet-rich plasma (PRP) has been increasing considerably in veterinary medicine, but its progress includes only domestic animals, including dogs, cats and horses. Thrombocytes in birds have similar function to platelets in mammals, but their morphology differs. They are responsible for hemostasis and when activated are able to release growth factors that are responsible for signaling the onset of tissue repair. The objective of this study was to establish a protocol to obtain plasma rich in thrombocytes (PRT) in chickens. A total of 19 chickens were used and the project was divided into two stages. In the first stage, samples of 10 chickens from which 7 ml of blood from the right jugular vein were collected were used. Four protocols (P1, P2, P3 and P4) were tested to obtain platelet rich plasma (PRP) used in mammals. Blood was collected in two different tubes, one containing ACD-A and another ACD-A plus clopidogrel bisulfate (BC). In the second step, samples of the 19 chickens from which 7 ml of blood were collected in a tube containing only ACD-A were used. For this step, the P2 protocol used in cats was used, plus modification of the collection region of the thrombocyte-rich plasma. The results of thrombocyte concentration were analyzed by means and standard deviation. A randomized complete block design with subdivided plot arrangement was considered and the Tukey test was performed to compare thrombocytes between protocols. The presence of the protocol effect and addition of clopidogrel bisulfate was evaluated by means of analysis of variance and Fisher's test. The paired T-test was used to compare red blood cells, leukocytes and thrombocytes in whole blood and PRT. In the first step there was no significant statistical difference in the results using or not the BC between the same protocols. None of the protocols proved to be effective in obtaining PRT. The mean (cell / μL) of the thrombocytes found were: total blood was 48,200 (7208), protocol P1 4,800 (951), protocol P2 10050 (1932), protocol P3 6,750 (1292) and in protocol P4 8,000 (1169). The P1 and P2 protocols were statically different from all other protocols, and the P3 and P4 protocols showed no statistical difference between them. None of the protocols presented a favorable result to obtain the PRT. In the second stage the mean (standard deviation) of thrombocytes, erythrocytes and leukocytes in whole blood was 45,500 (12,900), 1,984,700 (377,700) and 14,300 (3900) respectively. After centrifugation and collection of the PRT the mean values (standard deviation) of thrombocytes, erythrocytes and leukocytes were respectively 337,900 (93,600), 189,700 (97,700) and 18,300 (5,400). There was a 7.43 fold increase in thrombocytes in the PRT compared to the mean total blood. The counts of erythrocytes, leukocytes and thrombocytes before and after centrifugation were statistically different from each other. The thrombocytes of the birds showed sedimentation in a region different from that observed in mammals. It is concluded, therefore, that it is possible to concentrate thrombocytes in chickens using the protocol for obtaining PRP in cats plus the change in the aspiration region of the thrombocyte concentrate.

Key words: thrombocyte concentrate, birds, cell therapy.

1. INTRODUÇÃO

As aves representam a maioria das espécies da fauna silvestre mantidas como animais de companhia (Castro et al., 2013). A diversidade, a beleza das plumagens e seus cantos elaborados, tornam as aves os animais mais cobiçados, seja pelos criadores, para compor coleções de zoológicos ou mesmo para serem utilizados como animais de estimação pela população em geral. Este grupo taxonômico é o mais apreendido no Brasil, conforme observado nas regiões Sul, Sudeste, Norte e Nordeste (Souza, et al, 2014).

As aves são animais que se estressam facilmente e devem receber tratamento que permita a soltura o mais breve possível, no seu ambiente natural ou em recinto adequado. Aves de companhia, que vivem em gaiola e não dependem da capacidade de voo para sobreviver não precisam necessariamente da recuperação de plena capacidade do membro acometido, porém animais de vida livre que dependem do uso adequado dos membros para caçar, se alimentar, fugir de predadores e se proteger, precisam de perfeitas condições físicas e funcionais (Ferrigno et al., 2014).

Dentre as alterações clínico-cirúrgicas que acometem as aves, as lesões ortopédicas são as mais comuns em quaisquer ambientes e condições: aves de estimação, mantidas em zoológico, de vida livre ou de produção. Os distúrbios ortopédicos variam conforme a espécie e as condições nas quais as aves estão expostas em cativeiro (Ferrigno et al., 2014). Dentre estas, destacam-se as diferentes fraturas com alto índice de exposição óssea e contaminação. As fraturas demandam cerca de quatro semanas para consolidação acrescido ainda do tempo necessário para reabilitação física e possível retorno no seu ambiente de origem.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é amplamente utilizado na medicina em procedimentos de reconstrução alvéolo-maxilar, em cirurgias plásticas, cirurgias ortopédicas, medicina esportiva (tratamento de lesões em tendões de atletas), tratamento de úlceras gástricas, úlceras cutâneas crônicas e úlceras de córnea (Silva et al., 2011; McCarrel et al., 2014). Na medicina veterinária a utilização clínica do PRP é relatada em equinos para tratar afecções locomotoras crônicas e osteocondrite dissecante da articulação escapuloumeral, em ruptura de ligamento cruzado cranial em cão e em cicatrização cutânea de feridas em gatos (Carmona, et al., 2007; Silva et al., 2012; Bertolletti, 2015). Entretanto, não foi encontrada na literatura consultada qualquer informação sobre a obtenção do plasma rico em trombócitos (PRT) em aves nem de sua caracterização. É, portanto, de interesse científico e de aplicação prática a elaboração de um protocolo de obtenção do PRT em aves. Sua caracterização marcará o início dos estudos relacionados com seu possível emprego no tratamento de lesões ósseas e feridas em aves, que poderá reduzir o tempo de permanência em tratamento, podendo a ave retornar ao seu habitat precocemente.

Considerando os resultados favoráveis do emprego da terapia celular em outras espécies (Carmona, et al., 2007; Silva et al., 2012; Bertolletti, 2015) é possível que o uso do PRT nas aves possa beneficiar o tratamento das lesões e favorecer a recuperação pós-operatória precoce. Assim, o objetivo desse trabalho é elaborar um protocolo para a obtenção do plasma rico em trombócitos em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e descrever suas características.

2. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo para obtenção de plasma rico em trombócitos (PRT) de galinhas pelo método do tubo em centrifugação única e caracterizar os elementos celulares no plasma.

2.1. Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo para a obtenção de plasma rico em trombócitos em galinhas.
- Avaliar a contagem trombocitária em diferentes protocolos de centrifugação.
- Avaliar os elementos celulares e sua concentração no plasma.
- Verificar a região do plasma sanguíneo no qual os trombócitos se concentram.

3. LITERATURA CONSULTADA

3.1. Contenção e colheita de sangue

A contenção física das aves possivelmente seja o momento de maior estresse para elas. O estresse associado à contenção física das aves não submetidas rotineiramente a esse manejo, pode comprometer a saúde e afetar os parâmetros sanguíneos. A contenção deve ser realizada por pessoas treinadas e da maneira mais adequada possível. É importante na contenção permitir o livre movimento do esterno para a respiração da ave, pois quando muito pressionado pode causar asfixia e morte. Os membros pélvicos devem permanecer junto ao corpo para evitar lesões durante o momento da colheita de sangue (Schmidt, 2014).

Os principais locais utilizados para a colheita de sangue nas aves são: veia jugular direita e esquerda, veia ulnar superficial ou veia braquial, veia metatársica medial, seio venoso occipital e coração (punção cardíaca) (Schmidt et al., 2007; Doneley, 2010). A jugular direita é um vaso relativamente móvel e encontra-se no subcutâneo da região cervical látero-ventral, sem um leito definido e geralmente mais proeminente que a esquerda (Schmidt, 2014).

O volume total médio de sangue nas aves varia de 6 a 12 ml/100 g, ou seja, corresponde a 6 - 12% da massa corporal. O volume máximo a ser colhida com segurança em aves sadias é o equivalente a 1% da sua massa corporal. Perus e galinhas são mais tolerantes a perda sanguínea quando comparadas aos mamíferos devido à maior capacidade de mobilização de fluido extravascular, podendo essa colheita chegar até a 2% da massa corporal da ave (Schmidt et al., 2007; Schmidt, 2014). O uso de tubos com vácuo não é recomendado, pois o vácuo exerce pressão excessiva ocasionando o colapso das veias no momento da colheita (Schmidt, 2014).

3.2. Componentes celulares do sangue das aves

As principais células encontradas no sangue das aves são os eritrócitos, trombócitos e leucócitos (Fig. 1), sendo estes últimos constituídos por granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e linfócitos (Campbell, 1994).

A hemácias nas aves são ovais e nucleadas, medem 7,7 μm de largura e 8,1 a 10 μm de comprimento e o tamanho do seu núcleo varia entre as espécies. O tempo de vida das hemácias varia em torno de 28 a 35 dias. Essa curta vida das hemácias nas aves é atribuída ao seu elevado metabolismo e temperatura corporal. Os leucócitos são células que tem um papel fundamental na resposta inflamatória, são os responsáveis pela defesa frente a uma infecção, destruindo bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os leucócitos variam de 4 a 19,9 micras de diâmetro (Cardoso e Tessari, 2003).

Os trombócitos são ovais, menores que as hemácias e medem de 3 a 6,1 μm de largura por 6,1 a 11,5 μm de comprimento. Possuem citoplasma incolor, com aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, um sistema de vesículas conectadas a membrana plasmática e muitas vezes contém um ou mais grânulos azurófilos em extremos opostos do núcleo e este ocupa um terço de seu volume total. São

células importantes para a resistência imunológica inespecífica e possuem função no processo de coagulação sanguínea, porém sua principal característica é o alto poder fagocitário, com capacidade de aderir e de fagocitar grande diversidade de partículas estranhas (Campbell, 1994; Lam, 1997; Cardoso e Tessari, 2003).

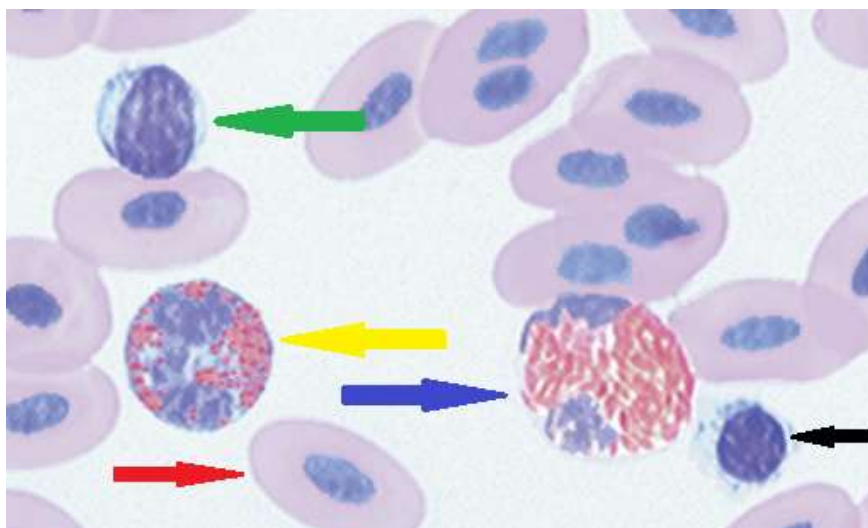


Figura 1. Ilustração dos elementos celulares do sangue de galinha: eritrócito (seta vermelha), trombócito (seta preta), heterófilo (seta azul), eosinófilo (seta amarela) e linfócito (seta verde). Coloração Wright-Giemsa, aumento de 1000x. Fonte: Wakenell (2010).

Os trombócitos das aves se assemelham às plaquetas dos mamíferos em diversos aspectos, tanto na coagulação sanguínea como na resposta imunológica. Nos mamíferos as plaquetas secretam moléculas antimicrobianas e citocinas que modulam a resposta inflamatória. A citocina pró-inflamatória, as interleucinas e o fator de crescimento transformador de citocina anti-inflamatória (TGF) - β são exemplos de tais moléculas (Scott e Owens, 2008). Paul et al. (2012) relataram que os trombócitos expressam transcritos constitutivamente para as citocinas pró e anti-inflamatórias, além daqueles associados com respostas anti-virais e apresentação de antígeno e que são capazes de produzir interleucinas (IL) - 1 β , IL-6 e IL-8 em grande quantidade.

3.3. Anticoagulantes

Como a ação regenerativa do PRP depende do nível de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, a viabilidade das plaquetas determina a qualidade do PRP. Se as plaquetas forem ativadas durante o processo de elaboração do PRP, os fatores de crescimento serão liberados no plasma, cuja maioria será descartada durante a preparação do PRP, o que diminui a eficácia do mesmo quando aplicado aos locais de tratamento. Portanto, quanto menos ativação plaquetária e maior retenção de fatores de crescimento nas plaquetas maior será a potência do PRP (Lei et al., 2009).

O efeito dos anticoagulantes na ativação plaquetária é um fator a ser considerado na elaboração do PRT. É necessário empregar um anticoagulante apropriado para evitar a ativação espontânea de plaquetas em amostras usadas para estudos fisiopatológicos (Pignatelli et al., 1996).

Muitos produtos são empregados para prevenir a agregação plaquetária e dentre eles o clopidogrel é um dos principais componentes utilizados para evitar as coagulopatias (Roscher, et al, 2015). O clopidogrel é um antagonista do receptor de adenosina difosfato (ADP) de plaquetas P2Y₁ e412 e reduz a agregação plaquetária em muitas espécies. A administração de clopidogrel em cães resulta na diminuição da responsividade do músculo liso vascular à 5HT. A liberação de 20 e 5-HT de plaquetas ativadas é significativamente diminuída em gatos tratados com clopidogrel. Por essas razões, o clopidogrel pode ser um fármaco que pode diminuir a hiperatividade das plaquetas, a secreção de 5-HT e a subsequente formação de agregados plaquetários durante condições inflamatórias (Brainard et al., 2011).

3.4. Plasma rico em plaquetas

O PRP é descrito como um volume de plasma que tem contagem de plaquetas acima do valor basal (do sangue total). Embora esta definição sugira uma mistura pura de plasma e plaquetas (e seus fatores de crescimento associados e citocinas), o termo plasma rico em plaquetas expandiu-se recentemente para incluir uma variedade de produtos finais. Estes produtos podem variar marcadamente, não apenas na concentração final de plaquetas que contém, mas também na quantidade de glóbulos vermelhos e/ou glóbulos brancos que são incluídos na preparação final, sendo que a concentração ideal dos seus componentes ainda não foi estabelecida (Arnoczky et al., 2011; Rinnovati et al., 2016).

Algumas técnicas para a obtenção de PRP ativam a cascata de coagulação como parte do processo, criando um arcabouço de fibrina. A inclusão destes componentes sanguíneos adicionais pode afetar as indicações, potência e eficácia do produto final do PRP, portanto a classificação genérica PRP não permite a distinção entre os diferentes sistemas e protocolos (Arnoczky et al., 2011).

Um sistema de classificação do PRP foi criado com base no conteúdo celular, principalmente com referência a glóbulos brancos e na arquitetura de fibrina. Com base nesses parâmetros, o PRP pode ser agrupado em quatro tipos diferentes: (a) PRP puro (P-PRP), que não contém leucócitos e possui uma rede de fibrina de baixa densidade; (b) o PRP rico em leucócitos (L-PRP) tem concentrações aumentadas de glóbulos brancos, além de alta concentração de plaquetas, mas também tem uma rede de fibrina de baixa densidade; (c) a fibrina pura rica em plaquetas é livre de leucócitos, mas tem uma rede de fibrina de alta densidade; (d) a fibrina rica em leucócitos e plaquetas combina concentrações aumentadas de leucócitos e uma rede de fibrina de alta densidade (McCarrel et al., 2014; Lansdown e Fortier, 2017).

O uso do PRP tornou-se predominante no campo da medicina regenerativa com diversas aplicações, desde medicina esportiva e ortopedia até cirurgia plástica e oftalmologia (Lieberman et al., 2002; Tambella et al., 2018). Na medicina veterinária tem sido relatado seu uso para diversas espécies de mamíferos principalmente em cavalos, cães, gatos e coelhos (Carmona, et al., 2007; Nagata et al., 2010; Silva, 2012; Silva et al., 2012; Vendruscolo et al., 2012; Bertolotti, 2015).

Nos animais selvagens a literatura referente ao uso de PRT é escassa. Di Ianni et al. (2015), após dupla centrifugação, utilizaram o plasma autólogo rico em trombócitos e leucócitos de quelônios para reparação tecidual em duas espécies diferentes.

3.5 Obtenção de concentrado de trombócitos

Algumas técnicas foram descritas na literatura para a separação dos trombócitos dos outros elementos celulares presentes no sangue das galinhas, no entanto nenhuma dessas técnicas foi estabelecida para concentração de trombócitos e sua utilização como alternativa de tratamento, apenas para estudos celulares dos trombócitos isoladamente (Janzarik, 1981; DaMatta et al., 1999; Scoot e Owens, 2008).

Scott e Owens (2008) utilizaram um protocolo de dupla centrifugação em 3 ml de sangue de frango, colhido em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para separação dos trombócitos. Antes da centrifugação o sangue foi preparado com uma solução salina de Hank (HBSS) e uma solução separadora de leucócitos. A primeira centrifugação foi de 1700 g durante 30 minutos. A camada de trombócitos foi removida com uma pipeta de Pasteur e lavada duas vezes com 2 ml de HBSS por centrifugação a 450 g durante 5 minutos. Os sedimentos celulares finais foram ressuspensos em 2 ml de HBSS e colocados no gelo. As amostras foram centrifugadas novamente até se obter uma quantidade de 1×10^7 trombócitos em 1,5 ml de solução.

Outro método utilizando centrifugação única a 100 g durante 3 a 5 minutos em sangue colhido em tubo plástico contendo citrato de sódio foi proposto por Janzarik (1981). Esse mesmo autor relata ainda que obteve amostras por sedimentação à temperatura ambiente. Esse estudo consistiu em estudar a morfologia plaquetária utilizando microscopia de contraste de fase.

DaMatta et al. (1999), em seu estudo para avaliar a apoptose dos trombócitos de frango, coletaram 15 ml de sangue em heparina e diluíram em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), utilizando Percoll e centrifugaram a 600 g durante 20 minutos, do qual resultou um “buffy coat” que foi colhido e lavado. As células constituídas principalmente por linfócitos, monócitos e trombócitos foram ressuspensas em DMEM até a concentração de 2×10^7 trombócitos / ml.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo de número 128/2018.

Foram utilizadas 19 galinhas da linhagem Lohmann Brown com aproximadamente 30 semanas de idade e com massa corporal média de 2,0 kg provenientes da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG. Os animais foram mantidos no galpão de avicultura (G3) da própria fazenda. As galinhas permaneceram em gaiolas, medindo 40 cm x 40 cm x 60 cm com acesso à água *ad libitum* e a alimentação era fornecida uma vez ao dia com ração própria para galinhas poedeiras conforme o manejo da fazenda. Cada gaiola continha quatro galinhas.

4.2. Contenção das aves e colheita de sangue

As aves foram contidas manualmente imobilizando seus membros torácicos, pélvicos e cabeça e posicionadas em decúbito lateral esquerdo para a exposição da veia jugular direita (Fig. 2). As penas foram afastadas utilizando álcool 70% e a antisepsia do local da colheita foi realizada com uma solução alcóolica contendo 0,5% de digliconato de clorexidina. A colheita de sangue foi realizada por venopunção da veia jugular direita utilizando cateter 20G x 1.16" (BD Angiocath™ ®) em duas seringas de 10 ml, uma contendo anticoagulante ACD-A (citrato trissódico 22 g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L) e a outra contendo ACD-A com bissulfato de clopidogrel (BC).

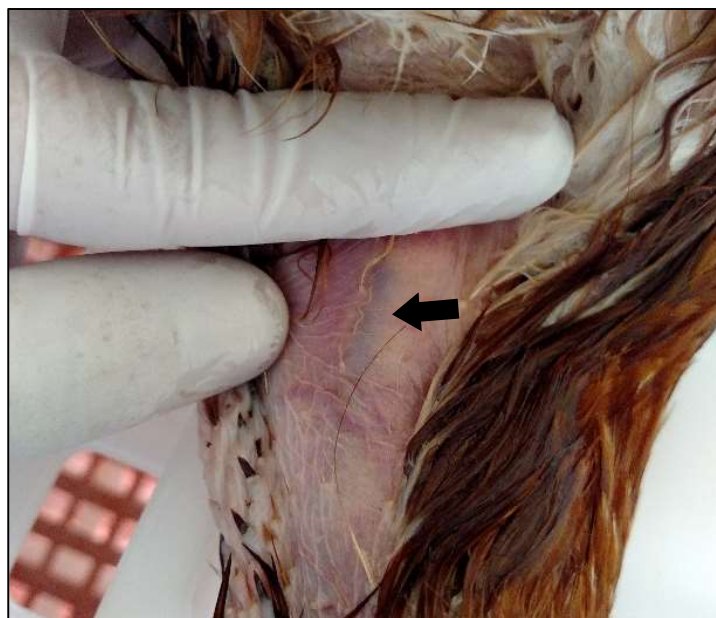


Figura 2. Ilustração do local da venopunção: veia jugular direita (seta) de galinha.

Imediatamente após a colheita o sangue foi armazenado no seu respectivo tubo com e sem o BC e o local da colheita foi pressionado por no mínimo um minuto.

4.3. Preparação do bissulfato de clopidogrel

Antes da colheita de sangue foi pesado em um criotubo de 1,2 ml aproximadamente 0,0232 g de bissulfato de clopidogrel. Para a pesagem foi utilizada uma balança de precisão do Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG (Fig. 3). Imediatamente antes da coleta o BC contido no criotubo foi transferido para o tubo com o anticoagulante (BD Vacutainer® ACD Solution A).

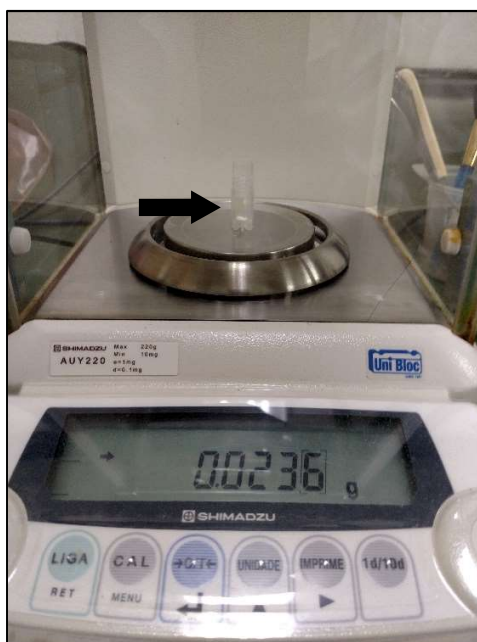


Figura 3. Ilustração da balança de precisão e da pesagem do bissulfato de clopidogrel em um criotubo de 1,2 ml (seta).

4.4. Obtenção do plasma rico em trombócitos

Para obtenção do PRT foram testados diferentes protocolos usados em mamíferos. O estudo foi desenvolvido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na seleção do melhor método para a obtenção do concentrado de trombócitos e foi realizado na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG. Na segunda etapa o sangue foi colhido na fazenda e acondicionado em grades numa caixa térmica de plástico à 5 °C por um período de duas horas até o momento do seu processamento no Laboratório de Patologia Clínica e Anexo do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG. Todas as etapas de manipulação das amostras até a produção do PRT foram realizadas pelo mesmo operador.

4.4.1. Primeira etapa

As amostras de sangue de 10 das 19 aves foram utilizadas para selecionar o protocolo mais adequado para a concentração dos trombócitos. Foram testados protocolos utilizados em cão, gato, cavalo e coelho (Carmona et al., 2007; Nagata et al., 2010; Silva et al., 2011; Silva, 2012).

Para cada protocolo houve duas colheitas de sangue em duas seringas diferentes, uma contendo apenas ACD-A e outra contendo ACD-A acrescido de BC. Foram colhidos 7 ml de sangue para cada tubo com 1,5 ml de ACD-A acrescido ou não de BC (Fig. 4), totalizando 8,5 ml em cada tubo. O sangue foi homogeneizado e o conteúdo de cada tubo foi fracionado em quatro porções iguais de 2 ml em um criotubo de 4 ml totalizando oito tubos contendo 2 ml de sangue em cada. Quatro tubos continham apenas ACD-A (Fig. 5) e 4 tubos continham ACD-A com BC. Os criotubos foram centrifugados (centrífuga Centribio 80-2B®) em forças e tempos pré-estabelecidos (Tab. 1).

Tabela 1. Protocolos de centrifugação para a obtenção do PRP mostrando as variações da força centrífuga relativa (g) e variações do tempo expressa em minutos (min) no cão, no gato, no cavalo e no coelho.

Protocolo	1º centrifugação	Tempo (min)	2º centrifugação	Tempo (min)	Espécie	Referência
P1	191g	6	-	-	Cão	Silva et al., 2011
P2	85g	6	-	-	Gato	Silva, 2012
P3	120g	10	240	10	Cavalo	Carmona et al., 2007
P4	160g	20	400	15	Coelho	Nagata et al., 2010



Figura 4. Ilustração do tubo com ACD-A mostrando o volume de sangue colhido de galinha.



Figura 5. Ilustração dos criotubos contendo 2ml do sangue total para posterior centrifugação.

Após centrifugação o conteúdo se separou em três frações distintas denominadas de fase inferior constituída pelos eritrócitos; a intermediária, formada pela zona da névoa (ZN), constituída por leucócitos e trombócitos maiores; e a superior, constituída pelos trombócitos menores e pelo plasma (Fig. 6).

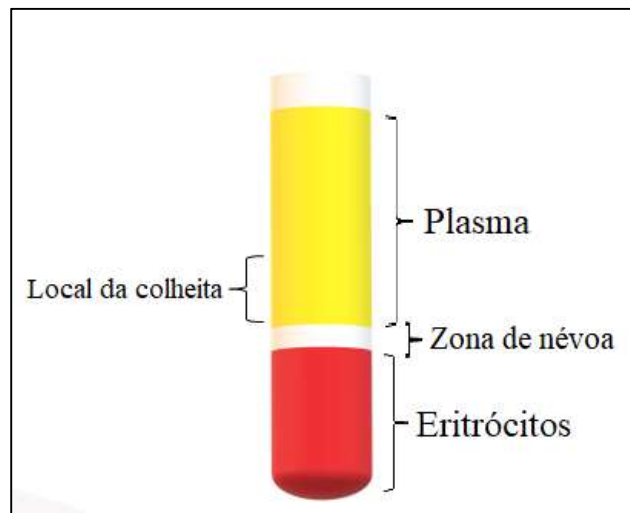


Figura 6. Ilustração do tubo após a centrifugação mostrando as três frações visíveis, eritrócitos, zona de névoa e plasma e o local da colheita do plasma na primeira etapa.

Após a centrifugação única nos protocolos P1 e P2 (Tab. 1), e conforme preconizado pelos autores (Carmona, et al., 2007; Nagata et al., 2010; Silva et al., 2012; Bertoletti, 2015), foram aspirados 0,5 e 0,4 ml de plasma, respectivamente, imediatamente acima da ZN, com o auxílio de uma seringa de 1 ml e um cateter 20G que foi armazenado em um eppendorf®. Nos protocolos P3 e P4 (Tab. 1) foi aspirado, após a primeira centrifugação todo o plasma com o auxílio de uma pipeta automática, que correspondeu a 1,4 e 1,5 ml respectivamente, que foram transferidos para um tubo criogênico de 4 ml e centrifugado novamente conforme os protocolos. Após a segunda centrifugação foi aspirado com o auxílio de uma pipeta automática, 1 ml do plasma na camada superior do tubo e descartado, restando no tubo apenas a porção inferior do plasma contendo os trombócitos. O volume restante correspondente aos eritrócitos foi descartado em todos os protocolos.

O plasma final colhido nos quatro protocolos foi homogeneizado e diluído em líquido de Dacie, utilizando 10 μL de plasma para 2000 μL de Dacie e procedeu-se à contagem manual das células em câmara de Neubauer após 5 minutos de repouso, utilizando um microscópio ótico binocular com aumento de 400x. A contagem dos trombócitos foi realizada segundo Campbell (2015) que consiste em contar todos os 25 quadrados centrais menores dos dois lados da câmara e multiplicar por mil para se obter o valor total final (Fig. 7).

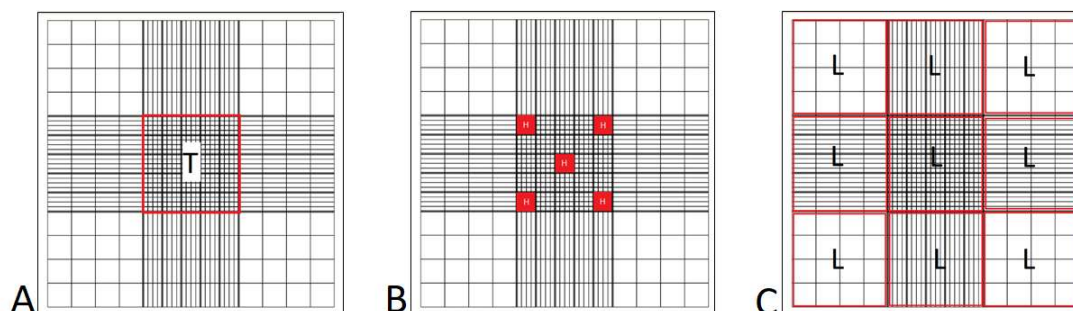


Figura 7. Ilustração da câmara de Neubauer mostrando nos quadrados vermelhos os locais para as contagens de trombócito (A), hemácias (B) e leucócitos (C).

O volume de 0,5 ml de sangue total restante foi utilizado para hemograma das aves conforme proposto por Campbell (2015) por contagem manual. Para a contagem celular foi empregado 10 μ L do sangue total diluído em 2000 μ L de líquido de Dacie e utilizado a câmara de Neubauer para a contagem em microscópio ótico binocular em aumento de 400x. Para computar o total de eritrócitos contou-se cinco quadrados menores centrais e multiplicou-se por 10000 (Fig. 7). Foi colhido sangue em um capilar seguido de centrifugação em centrífuga de microhematócrito para a obtenção do volume globular.

O valor dos leucócitos totais foi obtido contando os leucócitos presentes nos nove quadrados maiores (Fig. 7) e foi utilizada a fórmula ilustrada na fig. 8, para a obtenção do resultado final. O diferencial dos leucócitos foi realizado contando 100 leucócitos num esfregaço sanguíneo do sangue total corado em panótico rápido em um microscópio ótico binocular com aumento de 1000x. Para a contagem total de trombócitos foi utilizado o mesmo protocolo pós centrifugação.

Hemácias = $N_h \times 10000$
Leucócitos = $(N_l \times 1.1) \times 200$
Trombócitos = $N_t \times 1000$

Figura 8. Ilustração das fórmulas utilizadas para o cálculo total de hemácias, leucócitos e trombócitos, onde N_h , N_l e N_t representam o número total de hemácias, leucócitos e trombócitos, respectivamente, contados na câmara de Neubauer.

4.4.2. Segunda etapa

A segunda etapa constou da avaliação da eficácia do protocolo P2 selecionado na primeira etapa. Foram utilizadas 19 galinhas e de cada uma colheu-se 7 ml de sangue em tubo contendo ACD-A que foi submetido a centrifugação segundo o protocolo P2 acrescido de modificações. Do sangue total foram pipetados 2 ml e transferidos para um criotubo de 4 ml para centrifugação única a 85 g durante 6 minutos. O tubo foi retirado da centrífuga e deixado em repouso por no mínimo 5 minutos para realizar a coleta do plasma contendo trombócitos. Foi aspirado 0,1 ml com o auxílio de uma seringa de 1 ml e cateter 20 G da região correspondente a ZN e efetuada a contagem total dos eritrócitos, leucócitos e trombócitos utilizando o mesmo procedimento descrito na primeira etapa do projeto. Para

a realização do hemograma completo foi utilizado o sangue total da alíquota não utilizada para a centrifugação.

4.5. Destino dos animais

Todos os animais utilizados nesse experimento (primeira e segunda etapas) continuaram no galpão de avicultura da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG, pois ainda estavam em fase de produção de ovos.

4.6. Análise estatística

A descrição da concentração de trombócitos foi realizada por meio das médias e desvios-padrão. Foi considerado um delineamento em blocos ao acaso com arranjo em parcela subdividida em que o protocolo foi considerado o fator principal e a presença de bissulfato de clopidogrel como o fator secundário. A presença de efeito de protocolo e do acréscimo de bissulfato de clopidogrel foi avaliada por meio de análise de variância e teste de Fisher. O teste de Tukey foi realizado para comparação de trombócitos entre protocolos. O teste T pareado foi utilizado para comparação entre hemácias, leucócitos e trombócitos no sangue antes da aplicação e no plasma após a aplicação do protocolo selecionado como melhor para preparação do plasma rico em trombócitos. As associações entre hemácias, leucócitos e trombócitos antes e depois da realização do protocolo foram avaliadas por meio da correlação de Pearson. Para todas as avaliações foi considerado o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contenção realizada nas aves possibilitou a identificação da veia jugular direita conforme descrito por Doneley (2010) e Schmidt et al. (2007). Apenas duas pessoas foram necessárias para conter a galinha sem ocasionar estresse excessivo, pois logo após a coleta as mesmas não se mostravam ofegantes e se dirigiam ao comedouro. Apenas uma galinha apresentou ao final da coleta sinal de hipóxia que desapareceu imediatamente após sua liberação. Segundo Schmidt (2014) a hipóxia é ocasionada pelo excesso de compressão causado no tórax durante a contenção.

O método utilizado para a colheita de sangue mostrou-se eficiente para o objetivo proposto, pois foi possível obter trombócitos íntegros observados à microscopia ótica, isto é, supostamente não ativados. A utilização do cateter demonstrou-se eficiente para a colheita do sangue sem a necessidade da repetição do ato, pois o seu êmbolo de silicone permite pequenos movimentos do animal durante a colheita sem que haja perfuração do vaso e a inutilização daquele local, por alguns dias, para nova punção. Segundo Schmidt (2014) a pressão exercida pelo tubo a vácuo no momento da coleta pode ocasionar o colapamento do vaso e impedir o fluxo sanguíneo. A colheita de sangue realizada com cateter acoplado à seringa evitou o colapamento do vaso.

O ACD-A mostrou-se um anticoagulante satisfatório para colheita de sangue para PRT. Segundo Pignatelli et al. (1996) e Lei et al. (2009) a qualidade do concentrado de plaquetas está relacionada com o anticoagulante empregado e o ACD-A proporciona um PRP de qualidade superior quando comparado ao uso de citrato de sódio ou heparina. O total de sangue colhido na primeira e segunda etapas foram de 14 ml e 7 ml, respectivamente, sem ocasionar danos à ave conforme descrito por Schmidt et al. (2007).

5.1. Primeira etapa

A realização da primeira etapa do projeto foi necessária para definir o protocolo mais adequado para obtenção do PRT em galinhas. Nesta etapa observou-se, em todos os protocolos, redução da quantidade de trombócitos após a centrifugação quando comparado com o sangue total. A média (desvio padrão) de trombócitos / μL antes da centrifugação no sangue total foi de 48.200 (7208,02), com valor máximo de 56.000 e mínimo de 34.000 (Tab. 2).

Tabela 2. Valores de trombócitos / μL de galinhas adultas obtidos antes da centrifugação do sangue total.

Variável	Número de amostras	Média	Máxima	Mínimo	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Trombócito	10	48200	56000	34000	7208,02	14,95

Os quatro protocolos mostraram-se eficazes para a separação do sangue total em frações: eritrócitos, ZN e plasma (Fig. 9). Todavia, não foi possível obter um concentrado de trombócitos colhendo o plasma na região indicada pelos autores (Carmona et al., 2007; Nagata et al., 2010; Silva et al., 2011; Silva, 2012) nestes protocolos. O número de trombócitos após a colheita do plasma diminuiu acentuadamente quando comparado ao sangue total.

Considerando as particularidades do sangue das aves e sua propensão à agregação plaquetária, continuou-se a busca por alguma modificação nos protocolos usados em mamíferos que propiciasse a concentração de trombócitos e que prevenisse a agregação plaquetária. Como já relatado na literatura (Brainard et al., 2011; Roscher et al., 2015) substâncias como clopidogrel são usadas na medicina humana para prevenir coagulopatias. Assim, esperava-se que a associação desta substância ao sangue colhido pudesse favorecer o resultado, mas isto não ocorreu como mostram os achados apresentados na Tab. 3. Não houve diferença estatística com o uso ou não do BC na obtenção do PRT. A única alteração realizada até o momento foi apenas a adição de BC.

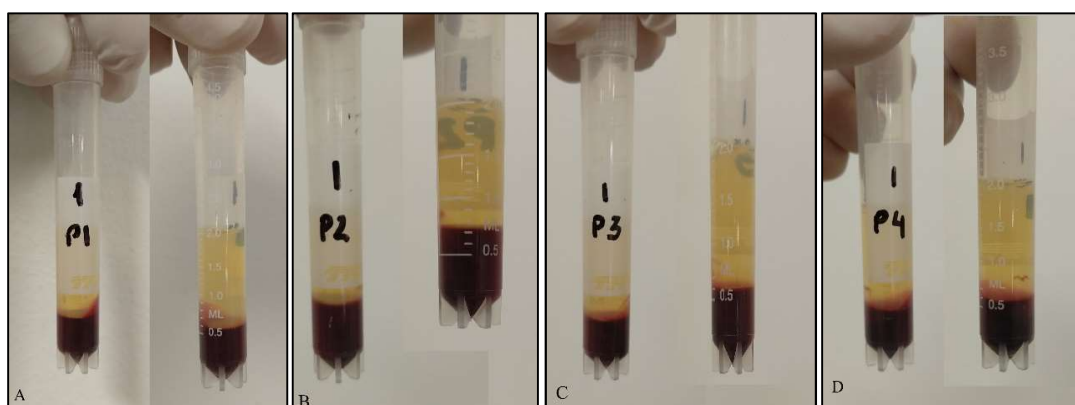


Figura 9. Ilustração dos tubos após a primeira centrifugação no protocolo P1 (A), P2 (B), P3 (C) e P4 (D).

No protocolo P1 a média de concentração dos trombócitos após a centrifugação foi de 4.700/ μ L para a amostra sem BC e 4.900/ μ L para a amostra contendo BC. Silva et al. (2011) obteve concentração de 49,4% em cães, utilizando este protocolo. Todavia, galinha é anatomofisiologicamente diferente de mamífero e tem suas próprias características. Com os protocolos P3 e P4 os resultados foram semelhantes (Tab. 3). Nagata et al. (2010) conseguiram concentração de 347% em coelhos. Isto levou a pensar que as adaptações aos protocolos devem considerar, antes de tudo, as características dos elementos sanguíneos das aves (tamanho das células, eritrócitos e trombócitos nucleados).

O protocolo P2 utilizado para gatos, mostrou concentração ligeiramente superior aos demais, porém ainda insignificante em termos de concentração de trombócitos. Para a colheita utilizando BC a média de trombócitos foi de 9.900/ μ L e sem a utilização 10.200/ μ L. A colheita nos tubos, após centrifugação, foi feita seguindo os protocolos, ou seja, imediatamente acima da ZN (Fig. 6). Entretanto, observou-se durante a execução do P2, na fase um, uma maior extensão da zona de névoa que após teste em lâmina, verificou-se tratar de trombócitos juntamente com leucócitos. Apesar de estreita, era passível de aspiração. Esta zona era visível apenas como uma tênue linha nos protocolos P1, P3 e P4, pois a alta velocidade e o tempo de centrifugação condensavam a ZN e impedia a aspiração. Dificuldade de aspiração foi relatado por Vendruscolo et al. (2012) após segunda centrifugação do sangue de cavalo devido a formação de um *pellet* no fundo do tubo, ocasionado pela força gravitacional.

O baixo número de trombócitos no local da colheita se deveu possivelmente às características peculiares dos trombócitos como: o tamanho ser praticamente o mesmo dos outros elementos celulares do sangue, a presença do núcleo e de vários outros componentes citoplasmático, conforme descrito por Campbell (1994), Lam (1997) e Cardoso e Tessari (2003). Isto torna a célula mais densa e possivelmente seu alto peso molecular levou-a a sedimentar mais rapidamente em relação as plaquetas dos mamíferos.

Não houve efeito do clopidogrel na concentração de trombócitos bem como não houve diferença estatística entre os quatro protocolos quando comparadas as médias de cada um com ou sem BC (Tab. 3). Todos os protocolos apresentaram diferença estatística entre eles com exceção dos protocolos P3 e P4.

Tabela 3. Valores médios (desvio-padrão) da concentração de trombócitos / μL nos protocolos P1, P2, P3 e P4 utilizando (c/c) ou não (s/c) BC.

	P1	P2	P3	P4	Total
s/c	4700 (1159)	10200 (2299)	6400 (1349)	7900 (875)	7300 (2207)
c/c	4900 (737)	9900 (1595)	7100 (1197)	8100 (1449)	7500 (2513)
Total	4800 (951,45) c	10050 (1932,41) a	6750 (1292,69) b	8000 (1169,8) b	7400 (2352,48)

Letras diferentes definem diferença entre protocolos por meio do teste de Tukey ($P < 0,001$).

5.2. Segunda etapa

Os resultados da primeira etapa indicaram o P2 como mais adequado para continuidade da avaliação, pois foi o único no qual foi possível colher o plasma na região onde se concentravam os trombócitos.

A centrifugação única a 85 g por 6 minutos mostrou-se eficaz, separando o sangue total nas três camadas como ocorre nas diversas espécies de mamíferos (Fig. 10), possibilitando identificar a ZN onde se depositam os trombócitos. A dificuldade encontrada resumiu-se na habilidade de aspirar o plasma rico em trombócitos sem exceder na quantidade de eritrócitos, pois estas células estão em camadas contíguas. Exige perícia. Os eritrócitos se encontravam pouco condensados e o movimento brusco do tubo e do cateter durante a aspiração dos trombócitos poderia ocasionar a homogeneização dos eritrócitos com a ZN e contaminar a amostra.

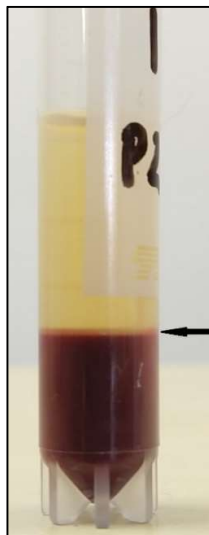


Figura 10. Ilustração do criotubo após a centrifugação empregando o protocolo P2 mostrando o local da aspiração do PRT (seta).

O resultado das contagens celulares na segunda etapa está expresso na Tab. 4. O protocolo P2 foi efetivo para a obtenção do PRT (Fig. 11) após modificação da região de aspiração, utilizando-se neste experimento a zona de névoa. A contagem celular no sangue total e no PRT apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) em relação aos valores de trombócitos, eritrócitos e do valor total de leucócitos (Tab. 4). Segundo Rinnovatti, et al. (2016) ainda não existe uma quantidade estabelecida de cada célula na composição do PRP. Não foi encontrado na literatura consultada nenhum estudo referente a PRT em aves, sendo este estudo pioneiro.

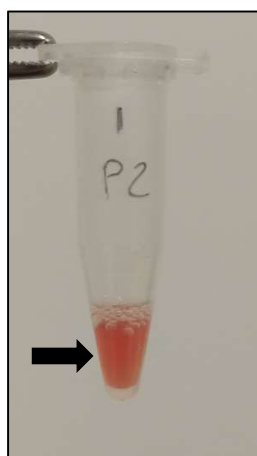


Figura 11. Ilustração do PRT (seta) em um tubo de 1,2 ml.

Tabela 4. Contagem hematológica / μL no sangue total e no concentrado de trombócitos de galinhas (média, erro padrão da média).

Variável	Sangue total	Plasma rico em trombócitos
Trombócitos (células $\times 10^3$ / μL)	45,5 (12,9) a	337,9 (93,6) b
Eritrócitos (células $\times 10^3$ / μL)	1984,7 (377,7) a	189,7 (97,7) b
Leucócitos (células $\times 10^3$ / μL)	14,3 (3,9) a	18,3 (5,4) b

Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste t pareado ($P < 0,05$).

A contagem média de trombócitos obtida no PRT foi de $337,9 \times 10^3$ plaquetas / μL (Fig. 12 e 13) o que corresponde a concentração de 7,43 vezes superior à contagem do sangue total, que foi de $45,5 \times 10^3$ plaquetas / μL . Segundo Arnoczky et al. (2011) a concentração do PRP deve ser de 3 a 5 vezes o valor das plaquetas basal. O valor obtido nesse estudo foi superior ao proposto por Arnoczky et al. (2011), porém é possível obter um PRT menos concentrado aspirando mais plasma no momento da colheita e assim permanecer nos limites entre 3 a 5 vezes.

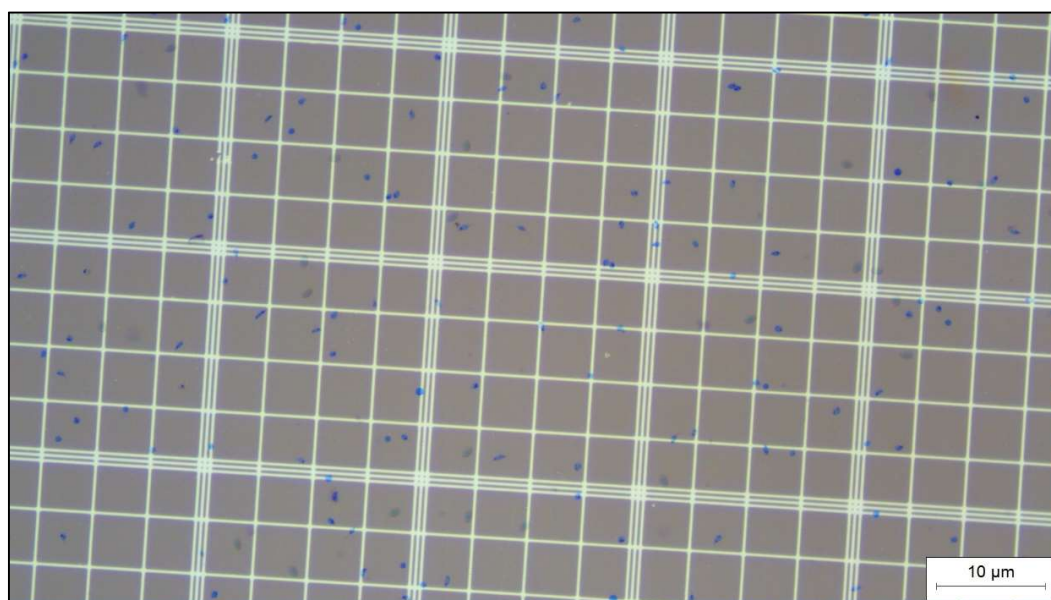


Figura 12. Ilustração mostrando a câmara de Neubauer e a distribuição dos trombócitos, diluído no líquido de Dacie, nos quadrados. Aumento de 100x.

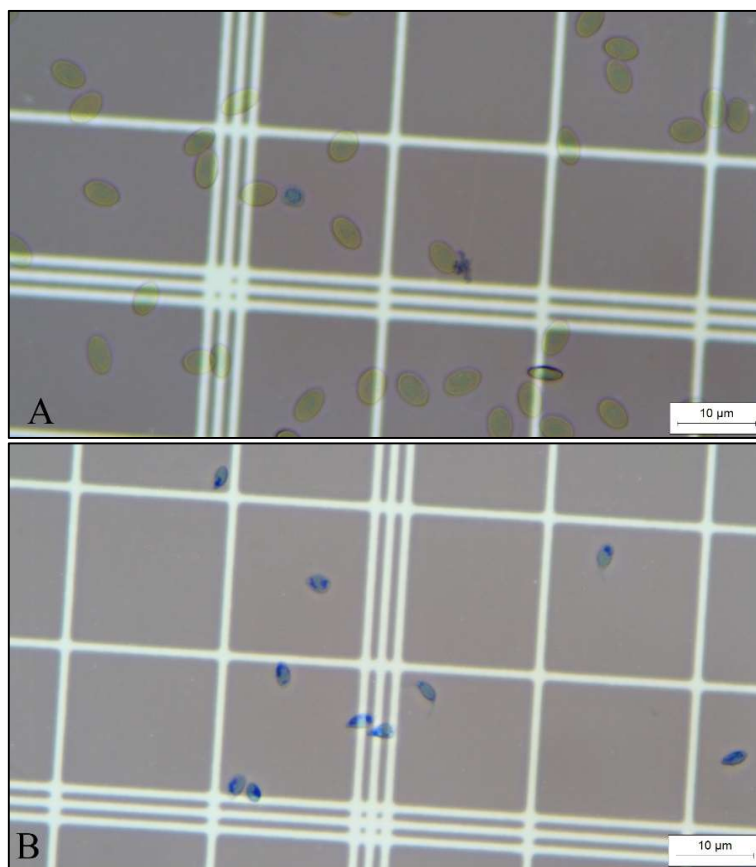


Figura 13. Ilustração mostrando a câmara de Neubauer com as células do sangue total (A) e do PRT (B) após a diluição no líquido de Dacie. Aumento de 400x.

Como foi observada a presença de leucócitos no concentrado de trombócitos obtido neste protocolo (Fig. 14), pode-se classificar o concentrado como um PRT rico em Leucócitos (L-PRT) segundo McCarrel, et al. (2014) e Lansdown e Fortier (2017). Para estes autores a presença de leucócitos caracteriza o concentrado como um PRP rico em leucócitos. Esta classificação foi estabelecida para mamíferos. Não existe até o momento nenhuma classificação para as aves.

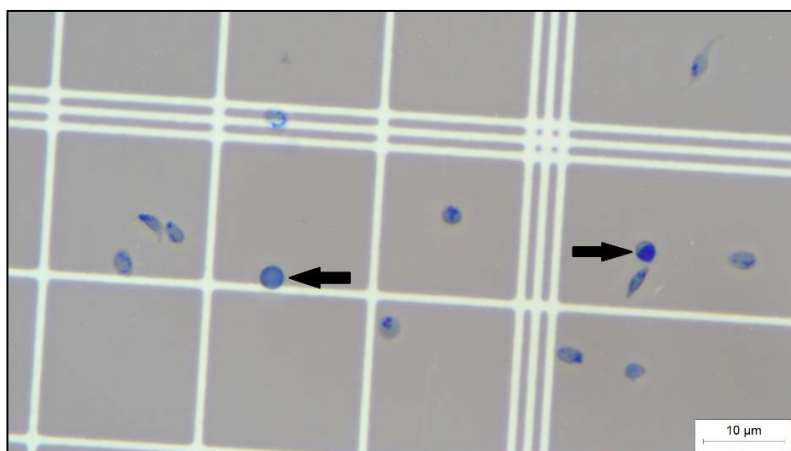


Figura 14. Ilustração mostrando a câmara de Neubauer com os leucócitos (seta) no PRT após a diluição com líquido de Dacie.

Foi observada correlação positiva entre a quantidade de eritrócitos e leucócitos antes e após a centrifugação. A correlação é significativa para os eritrócitos, porém não é perfeita (0,55), enquanto para os leucócitos há correlação de magnitude moderada (0,46). Para os trombócitos a correlação pode ser considerada nula (0,35), não havendo associação. Esta falta de correlação pode ser melhor observada na fig. 15, onde se verifica que nem sempre o maior número de trombócitos no sangue total será também maior em trombócitos no PRT.

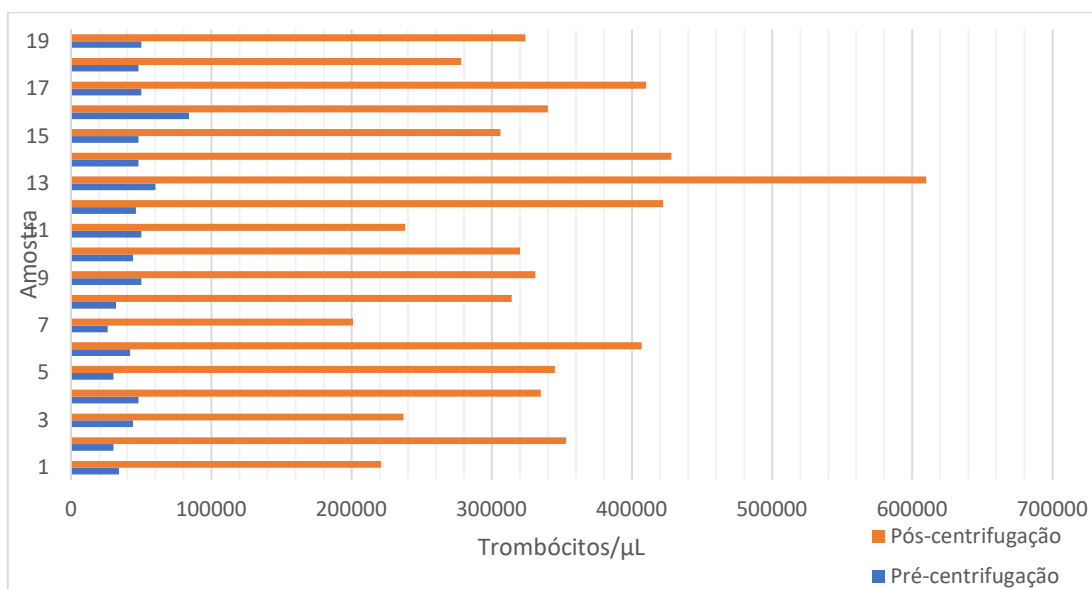


Figura 15. Gráfico com os valores dos trombócitos do sangue total e do PRT de cada amostra.

Conforme relatado por Paul et al. (2012), os trombócitos atuam ativamente na produção de fatores anti-inflamatórios, na liberação de IL e na apresentação de antígenos, transformando o PRT em mais uma alternativa terapêutica no auxílio de tratamentos de processos inflamatórios e infecciosos e não somente como regenerador tecidual.

O uso do concentrado de plaquetas na medicina veterinária, vem aumentando significativamente nos últimos anos para as diversas espécies de animais domésticos, porém o seu uso em animais selvagens ainda é escasso e pouco relatado. A padronização de um protocolo para a obtenção do concentrado autólogo de trombócitos em galinhas é o início para sua utilização em tratamentos de afecções nessa espécie, a exemplo do que ocorre em humanos e nas diversas espécies domésticas conforme descrito por Lieberman et al. (2002), Carmona, et al. (2007), Silva et al. (2012), Bertoletti (2015), Di Ianni et al. (2015) e Tambella (2018).

A literatura menciona diferentes técnicas para a separação dos trombócitos em galinhas, mas não para fins terapêuticos. As técnicas utilizadas por Damatta (1999) e Scott e Owens (2008) exigem manipulação extrema do material e vários meios diluentes, tornando o procedimento mais trabalhoso e com maior risco de contaminação. O protocolo utilizado neste estudo assemelha-se em velocidade de centrifugação e tempo ao empregado por Janzarik (1981), mas o autor não relata a concentração final de trombócitos e como nos outros trabalhos (Damatta, 1999; Scott e Owens, 2008) os trombócitos foram utilizados para estudos morfológicos ou funcionais.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que é possível obter PRT de sangue de galinhas utilizando o protocolo do tubo em centrifugação única a 85 g durante 6 minutos com aspiração na zona de névoa.

7. REFERÊNCIAS

- ARNOCZKY, S. P.; DELOS, D.; RODEO, S. A. What Is Platelet-Rich Plasma? Operation Techniques in Sports Medicine, v.19, n. 3, p. 142-148, 2011.
- BERTOLETTI, B. Plasma rico em plaquetas na cicatrização cutânea de gatos: padronização de técnica e aplicação clínica. 2015, 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- BRAINARD, B. M.; EPSTEIN, K. L.; LOBATO, D.; KWON, S.; PAPICH, M. G.; MOORE, J. N. Effects of Clopidogrel and Aspirin on Platelet Aggregation, Thromboxane Production, and Serotonin Secretion in Horses. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 25, n. 1, p. 116-122, 2011.
- CAMPBELL, T. W. Hematologia das aves, In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.250-276, 2015.
- CAMPBELL, T. W. Hematology In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L. R. Avian medicine: principles and application. Lake Worth: Wingers Publishing, p. 176-198, 1994.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudos dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. Arq. Inst. Biol, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 419-424, 2003.
- CARMONA, J. U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. J. Equine Vet. Sci., v. 27, p. 167-170, 2007.
- CASTRO, P.F.; FANTONI, D.T.; MATERA, J.M. Retrospective study of surgical disorders in birds. Pesquisa Veterinária Brasileira. V. 33, n. 5, p. 662-668, 2013.
- DAMATTA, R. A.; MANHÃES, L.; LASSOUNSKAIA, E.; SOUZA, W. Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. Tissue and Cell, v. 31, n.3, p. 255-263, 1999.
- DI IANNI, F.; MERLI, E.; BURTINI, F.; CONTI, V.; PELIZZONE, I.; DI LECCE, R.; PARMIGIANI, E.; SQUASSINO, G. P.; DEL BUE, M.; LUCARELLI, E.; RAMONII, R.; GROLI, S. Preparation and Application of an Innovative Thrombocyte/Leukocyte-Enriched Plasma to Promote Tissue Repair in Chelonians. Plos One, v. 10, n. 4. p. 1-14, 2015.
- DONELEY, B. Clinical techniques. In: DONELEY, B. Avian medicine and surgery in practice. Manson Publishing Ltda, London, UK, p. 55-68, 2010.
- FERRIGNO, C.R.A.; SCHMAEDECKE, A.; FERRAZ, V. Ortopedia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de Animais Silvestres. Editora Roca Ltda, São Paulo, 2014.

- JANZARIK, H. Nucleated thrombocytoid cells II. Phase-and interference-contrast microscopic studies on blood cells of the domestic fowl. *Cell and Tissue Research*, v. 219, n. 3, p. 497-510, 1981.
- LAM, K. M. Activation, adhesion, migration and death of chicken thrombocytes. *Comparative Haematology Internacional*, v. 1, p. 81-87, 1997.
- LANSDOWN, D. A.; FORTIER, L. A. Platelet-Rich Plasma: Formulations, Preparations, Constituents, and Their Effects. *Operation Techniques in Sports Medicine*, v. 25, n. 1, p. 7-12, 2017.
- LEI H, L GUI, R XIAO. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.*, v. 42, p. 1452-1460, 2009.
- LIEBERMAN, J.R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg*, v.84, n.6, p.1032-1042, 2002.
- MCCARREL, T. M.; MALL, N. A.; LEE, A. S.; COLE, B. J.; BUTTY, D. C.; FORTIER, L. A. Considerations for the Use of Platelet-Rich Plasma in Orthopedics. *Sports Medicine*, v. 44, p. 1025-1036, 2014.
- NAGATA, M. J. H.; MESSORA, M. R.; FURLANETO, F. A. C.; FUCINI, S. E.; BOSCO, A. F.; GARCIA, V. G.; DELIBERADOR, T.M.; MELO, L. G. N. Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *European Journal of Dentistry*, v. 4, p. 395-402, 2010.
- PAUL, M. S.; PAOLUCCI, S.; BARJESTEH, N.; WOOD. R. D.; SCHAT, R. A.; SHARIF, S. Toll-Like Receptor Ligands. *Plos One*, v. 7, n. 8, p. 1-10, 2012.
- PIGNATELLI, P., PULCINELLI, F. M.; CIATTI, F.; PESCIOTTI, M.; FERRONI, P.; GAZZANIGA, P. P. Effects of storage on in vitro platelet responses: comparison of ACD and Na citrate anticoagulated samples. *J. Clin. Lab. Anal.*, v. 10, p. 134-139, 1996.
- RINNOVATI, R.; ROMAGNOLI, N.; GENTILINI, F.; LAMBERTINI C.; SPADARI, A. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 58, p. 1-5, 2016.
- ROSCHER, K. A.; FAILING, K.; MORITZ, A. Inhibition of platelet function with clopidogrel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses. *The Veterinary Journal*, v. 203, n. 3, p. 332-336, 2015.
- SCHMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A.C. Clinical pathology in poultry – A tool to improve poultry health – a review. *Archives of Veterinary Science*, n. 12, v. 3, p. 9-29, 2007.

SCHMIDT, E. M. S. Patologia clínica em aves. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de Animais Silvestres. Editora Roca Ltda, São Paulo, p. 3279-3321, 2014.

SCOTT, T.; OWENS, M. D. Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF- κ B pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2. *Molecular Immunology*, v. 45, n. 4, p. 1001-1008, 2008.

SILVA, R. F. Caracterizações celular e ultra-estrutural do concentrado de plaquetas em cães e gatos e avaliação do seu efeito na osteoartrose em cães. 2012. 88f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

SILVA, R. F.; REZENDE, C. M. F.; PAES-LEME, F. O.; CARMONA, J. U. Evaluation of the tube method for concentrating canine platelets: cellular study. *Archivos de medicina veterinária*, n 43, p. 95-98, 2011.

SOUZA, T. O.; VILELA, D. A. R.; CÂMARA, B. G. O. Pressões sobre a avifauna brasileira: Aves recebidas pelo CETAS/IBAMA, Belo Horizonte, Minas Gerais. *Ornithologia*, n. 7, v. 1, p. 1-11, 2014.

TAMBELLA, A. M.; ATTILI, A. R.; DUPRE, G.; CANTALAMESSA, A.; MARTIN, S.; CUTERI, V.; MARCAZZAN, S.; FABBRO, M. D. Platelet-rich plasma to treat experimentally induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis. *Plos One*, v. 13, n. 1, p. 1-26, 2018.

WAKENELL, P. S. Hematology of Chickens and Turkeys. In: WEISS, D. J.; WARDROP. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6 ed., Ames, Iowa, John Wiley e Sons Publication, p. 958-967, 2010.

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