

PADRONIZAÇÃO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE FIBRINA RICA EM TROMBÓCITOS PARA AVES

Eduarda Santos Michelsen ¹; Eduarda Tamiris Konnorate¹; Ana Paula Morel²; Raqueli Teresinha França³; Carine Corsine³; Bruna Zafalon da Silva (Msc.)⁴

RESUMO

Afecções ortopédicas em medicina de aves são comuns, sendo abordagens conservadoras e cirúrgicas são descritas para tratamento de fraturas. Acelerando o processo de cicatrização tecidual e reparo, é descrito na literatura o uso de concentrados de plaquetas, todavia não foram encontrados estudos que abordam a utilização desta técnica em aves. Partindo deste contexto este estudo tem como objetivo padronizar a metodologia de coleta de membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos (L-TRF) com a fibrina rica em trombócitos líquida (I-TRF) em codorna-doméstica (*Coturnix coturnix japonica*). Para o experimento de padronização das coletas de I-TRF e L- TRF serão utilizadas 20 codornas e cada grupo terá 10 animais, submetidas a coleta de sangue venoso (1ml) de jugular direita. Após as amostras serão centrifugadas em diferentes tempos e rotações. Conclui-se que são necessários estudos da padronização da técnica para obtenção dos concentrados de TRF. Este estudo poderá oferecer importante contribuição para o avanço das técnicas ortopédicas em aves, acelerando o processo de consolidação óssea, reduzindo o tempo de reabilitação em aves domésticas e silvestres.

Palavras-chave: trombócitos, ortopedia, aves

INTRODUÇÃO

Em medicina de aves, afecções ortopédicas são rotineiras, ocorrendo tanto em aves mantidas sob cuidados humanos (pets, aves de plantéis de zoológicos, criadouros ou produção) quanto em aves de vida livre, sendo estas, na sua

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

grande maioria, acometidas por traumas ocasionados por interações antrópicas de ação direta ou indireta (FERNANDES, 2019; ZAFALON-SILVA, 2019). Diversas técnicas conservadoras e cirúrgicas são relatadas para o tratamento de fraturas em aves, sendo a escolha da técnica adequada desafiadora, devido aos aspectos biológicos, mecânicos e, principalmente, clínicos de cada espécie (ROMERO-CANO et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2017; ZIJLSTRA & REDIG, 2001).

Neste contexto, a escolha do tratamento cirúrgico através da osteossíntese pode ser complexo, devido às características evolutivas dos ossos das aves quando comparadas com as técnicas descritas para mamíferos (FERRIGNO et al., 2014; GROSSET et al., 2019; HELMER & REDIG, 2005), sendo necessários novos estudos em modelos experimentais abrangendo diversas categorias de tamanho de aves, considerando variações de peso.

Dentre os implantes indicados para o tratamento de fratura em aves, destaca-se o uso de implantes leves, externos ou internos, onde podemos citar o uso de pinos intramedulares (PIM) e/ou fixadores esqueléticos externos (FEE), hastes bloqueadas, placas ósseas e etc (DONCASTER et al., 2019; EROL et al., 2013; GULL et al., 2012; HOLLAMBY et al., 2004; OROSZ & ZIELEZINSKI, 2004).

Concomitante a estabilização ortopédica, acelerando o processo de cicatrização tecidual e reparo é descrito na literatura o uso concentrado de plaquetas, como o plasma rico em plaquetas ou trombócitos (PRP: Platelet-rich plasma ou PRT: Trombocyte-rich plasma) e uso mais moderno da fibrina rica em plaquetas ou trombócitos (PRF: Platelet-rich fibrin ou TRF: Thrombocyte-rich fibrin). Nos concentrados de plaquetas e trombócitos estima-se que contagem destes componentes estejam acima do valor basal, sendo aproximadamente 2 a 5 vezes maior que o parâmetro fisiológico (CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN et al., 2006; PAVLOVIC et al., 2021).

Tendo em vista o avanço da medicina regenerativa, foram descritas diferentes técnicas para a obtenção de PRP e PRF, e hoje, sabe-se que a utilização de fibrina rica em plaquetas tem demonstrado melhores resultado na

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

medicina regenerativa em mamíferos, tendo em vista a não utilização de nenhum tipo de aditivo, bem como a facilidade de obtenção, sem muitos processos, reduzindo assim o risco de contaminação. Ainda, quando comparado os concentrados de plasma com os de fibrina autógena, a fibrina uma liberação mais prolongada dos fatores de crescimento, pois ficam presos na matriz de fibrina e com isso modulando melhores respostas de regeneração tecidual (BADRAN et al., 2018; CHOUKROUN et al., 2006; JANG et al., 2011; PAVLOVIC et al., 2021).

Nas aves as plaquetas são nucleadas, caracterizadas como trombócitos, essas células são encontradas em grande quantidade no sangue das aves, perdendo somente para as hemácias. Os trombócitos possuem funções semelhantes a plaqueta dos mamíferos, como a coagulação sanguínea e resposta imunológica (FARZANA, 2014). 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 importantes na sinalização celular e indução da regeneração tecidual lesionada. Segundo autores, é descrito que os trombócitos expressam transcritos constitutivamente para as citocinas pró e anti-inflamatórias, além daqueles associados com respostas antivirais e apresentação de antígeno e que são capazes de produzir interleucinas (IL) - 1β , $11-6$ e 118 em grande quantidade. Neste contexto, ao que tange a regeneração óssea, algumas interleucinas são importantes na sinalização e modulação de respostas celulares, com a indução da consolidação óssea e seu remodelamento (CHOUKROUN et al., 2006).

Assim, alguns pesquisadores descrevem a obtenção do plasma rico em trombócitos e da membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos (L-TRF) para algumas espécies (BERTOLETTI, 2015; CARMONA, et al., 2007; FERNANDES et al., 2019; SILVA et al., 2012), todavia não foram encontrados estudos que utilizam os concentrados de trombócitos como acelerador do processo de consolidação óssea em aves. Estudos neste âmbito podem

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

impactar positivamente as condutas clínico cirúrgicas das aves de vida livre traumatizadas e/ou mantidas sob cuidados humanos, reduzindo assim o tempo de permanência em tratamento de reabilitação ortopédica.

Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar a viabilidade de obtenção de concentrados de fibrinas ricas em trombócitos e leucócitos (L-TRF – fibrina gel e I-TRF- fibrina líquida) em obtidas de codornas-domésticas. O desenvolvimento deste projeto de pesquisa é de suma importância para inferir a utilização destes concentrados na rotina de atendimento ortopédico de aves, sendo uma ferramenta fácil obtenção e de baixo custo. Os dados obtidos poderão servir como um referencial teórico para estudos pré-clínicos e para o aprimoramento das técnicas cirúrgicas existentes, auxiliando nas decisões relacionadas às condutas clínico-cirúrgicas no tratamento de fraturas em aves domésticas e silvestres.

MÉTODOS

O experimento foi previamente analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPeL. Serão utilizadas 20 codornas-domésticas (*Coturnix coturnix japonica*), fêmeas, adultas em início de fase reprodutiva (60 dias de vida), com peso médio 160g, obtidas de criadouro comercial. Os animais serão inicialmente aclimatados durante 10 dias em gaiolas coletivas com no máximo 4 animais. O experimento será realizado nas instalações do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Pelotas. Após o período de aclimação os animais serão submetidos a avaliação clínica individual, seguida de hemograma completo com contagem de trombócitos, marcadores bioquímicos. Para a padronização das coletas de I-TRF e L- TRF serão utilizadas 20 codornas e cada grupo terá 10 animais, submetidos a somente coleta de sangue venoso.

O experimento será previamente analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Serão utilizadas 20 codornas-domésticas (*Coturnix coturnix japonica*), fêmeas, adultas em início de fase reprodutiva (60

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

dias de vida), com peso médio 160g, obtidas de criadouro comercial. Após a aclimação será realizada randomização para distribuição dos animais nos dois grupos amostrais sendo GI o do L-TRF e o GII do I-TRF.

Obtenção de amostras GI:

Para o procedimento de coleta de sangue periférico, mediante contenção química com isoflurano ao efeito, vaporizado em 100% de oxigênio, será coletado 1ml de sangue total da veia jugular direita, mediante uso de seringa 3 ml e agulha hipodérmica 24G após o sangue será acondicionado em tubos de vidro estéreis e submetidos a centrifugação de 400g, imediatamente após a coleta, por 10 minutos, segundo descrito por Fernandes *et al.* (2019).

Os coágulos obtidos de L-TRF serão recuperados delicadamente com auxílio de pinça anatômica e a porção concentrada de hemácias será removida parcialmente com uso de lâmina de bisturi em local estéril. Em seguida, os coágulos serão mantidos em papel filtro estéril, a fim de se obter membranas de fibrina.

Obtenção de amostras GII:

Assim como para o L-TRF, será coletado 1ml de sangue total da veia jugular direita e após o volume obtido será depositado em tubo seco estéril (sem anticoagulante) e centrifugado imediatamente após a coleta a 3000 rpm por 10 minutos (FERNANDES *et al.*, 2019).

Após o término da experimentação será realizada a doação de todos animais hígidos aos mantenedores de fauna silvestre Quinta da Estância e Rincão do Araticum, para criação doméstica de postura de ovos.

Após o processamento das amostras, alíquotas serão encaminhadas para análise histopatológica das amostras afim de determinar se houveram concentrados suficientes.

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

RESULTADO E DISCUSSÃO

O estudo será realizado na Universidade Federal de Pelotas, tendo em vista a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Durante a submissão do projeto para a CEUA- UniRitter, houve divergência entre avaliadores, e o projeto foi submetido a diferentes avaliações com diligências repetitivas e incoerentes com os objetivos do estudo. Devido a isto, o projeto foi submetido a CEUA-UFPeI, tendo a aprovação e será executado pela docente e bolsistas durante o período de férias acadêmicas.

CONCLUSÃO

Conclui-se que são necessários estudos da padronização da técnica para obtenção dos concentrados de TRF. Este estudo poderá oferecer importante contribuição para o avanço das técnicas ortopédicas em aves, acelerando o processo de consolidação óssea, reduzindo o tempo de reabilitação em aves domésticas e silvestres.

REFERÊNCIAS

BADRAN KW, SAND JP. Platelet-Rich Plasma for Hair Loss: Review of Methods and Results. *Facial Plast Surg Clin North Am.*v;26(4):469-485. 2018

BERTOLETTI, B. Plasma rico em plaquetas na cicatrização cutânea de gatos: padronização de técnica e aplicação clínica. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 94f. 2015

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

CHOUKROUN, J., DISS, A., & SIMONPIERI, A. Platelet-rich fibrin(PRF): a second generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Rad Endod.*, V.101, pp. 299-303, 2006.

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

DOHAN, D. M., OUN, J., DISS, A., DOHAN, S. L., DOHAN, A. J. J., MOUHYI, J. AND GOGLY, B. : Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. v101, pp.37–44. 2006

DONCASTER, CP; SHEPHERDSON, DJ; WOODGATE, SL; INWOOD, AJ; HAWKINS, P. Fracture healing in wild birds: a comparative study of pin and cage rest versus no intervention in pigeons (*Columba livia*). Veterinary Records.v185(10):312 2019

EROL H, ÇINAR M, BALTACI AK, et al. The efficacy of tie-in external fixator technique in the treatment of long bone fractures in raptors. Türk Veteriner Hekimliği Dergisi.v37(5): pp681-686. 2013

FERNANDES et al. Production and evaluation of leukocyte and Thrombocyte-rich fibrin membranes in birds. Acta Veterinaria Hungarica v.67 (2), pp. 296–306. 2019

FERRIGNO, C.R.A. ET AL. Ortopedia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (2ª Eds.). Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, v.2, 2014.

GROSSET et al., Release Rates and Complications for Birds of Prey With Antebrachial Fractures at a Veterinary Teaching Hospital. J. of Avian Medicine and Surgery, v v.33(4):pp.388-397 2019.

GULL, J. M.; SAVERAID, T. C.; SZABO, D.; HATT, J. M. Evaluation of three miniplate systems for fracture stabilization in pigeons (*Columba livia*). Journal of Avian Medicine and Surgery, Lawrence, v.26, n.4, p.203-212, 2012

HELMER P.; REDIG P.T. Surgical resolutions of orthopedic disorders, p.761-774. In: HARRISON G.J. & LIGHTFOOT T.L. (ed.), Clinical Avian Medicine. Spix Publishing Inc., Palm Beach. v.2, 2005

HOLLAMBY, S.; DEJARDIN, L.M.; SIKARSKIE, J.G.; HAEGER, J. Tibiotarsal fracture repair in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) using an interlocking nail. J. Zoo Wildl. Med., v.35, p.77-81, 2004

JANG SH, HA JK, LEE DW, KIM JG. Fibrin clot delivery system for meniscal repair. Knee Surg Relat Res. 2011

OROSZ, SE; ZIELEZIŃSKI, MB. External skeletal fixation in psittacine birds: techniques and clinical applications. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice. v 7(2): pp.413- 433. 2004

PAVLOVIC V, CIRIC M, JOVANOVIC V, TRANDAFILOVIC M, STOJANOVIC P. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. Open Med (Wars). v22;16(1):pp. 446-454. 2021

ROMERO-CANO, R; REYES-BENÍTEZ, A; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A; et al. Surgical treatment of a femoral fracture using an intramedullary Steinmann pin in an 28 African grey parrot (*Psittacus erithacus*). Journal of Avian Medicine and Surgery. v27(2): pp154-158. 2013

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. Uso de plasma rico em plaquetas intraarticulares 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.

TEIXEIRA, CRV; CALDEIRA, DF; QUEIROZ, LJP. Avian Orthopedics. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. v 20(2): pp.367-389. 2017

ZAFALON-SILVA, B. Determinação do defeito crítico em ulna de codorna-doméstica (*Coturnix coturnix japonica*). Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, p.49. 2019

ZIJLSTRA, M; REDIG, PT. Surgical anatomy of the avian orthopedic patient. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. v4(2):pp. 297-317. 2001

FOMENTO

O fomento em sua integralmente será fornecido pela Universidade Federal de Pelotas.

¹ Bolsistas do projeto, alunas de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter

² Anestesista volante de Animais Silvestres

³ Docentes da Universidade Federal de Pelotas

⁴ Docente no curso de graduação em Medicina Veterinária, UniRitter