

ASPECTOS RADIOGRÁFICOS E DENSITOMÉTRICOS DE FRATURAS EXPERIMENTAIS DO RÁDIO DE CÃES TRATADAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS

RADIOGRAPHIC AND DENSITOMETRIC ASPECTS OF EXPERIMENTAL RADIAL FRACTURES OF DOGS TREATED WITH PLATELET-RICH PLASMA

T. F. B. SOUZA¹, G. T. N. M. FERREIRA¹, S. S. SAKAMOTO¹,
V. B. ALBUQUERQUE¹, S. R. M. BOMFIM¹, A. L. ANDRADE^{1*}.

RESUMO

O presente artigo teve como objetivo avaliar a cicatrização óssea de fraturas experimentais do rádio de cães, tratadas ou não com o PRP autólogo, por meio de estudos radiográfico e densitométrico. Foram utilizados 11 cães, alocados aleatoriamente em dois grupos experimentais: o grupo controle (G-controle, n=6) e o grupo PRP (G-PRP, n=5). Todos os animais foram submetidos à osteotomia e osteossíntese (fixador esquelético externo) do rádio direito, gerando-se um *gap* de 2mm, que foi preenchido com PRP apenas no grupo G-PRP. Os estudos radiográficos e densitométricos foram realizados no pós-operatório imediato e aos 14, 21, 28, 35, 45 e 60 dias de pós-operatório (M0, M14, M21, M28, M35, M45 e M60). A análise estatística foi realizada por meio da Análise de Variância com Medidas repetidas (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias; teste de Friedman seguido do teste de Dunn para comparar os momentos em cada grupo e o teste de Mann-whitney para comparar os grupos em cada momento ($p < 0,05$). Referente à avaliação entre os momentos houve diferença significativa entre M0 e M60 nas avaliações radiográficas e densitométricas dentro do grupo G-PRP. Na comparação entre os dois grupos houve diferença estatística na avaliação radiográfica a partir de M28; e na avaliação densitométrica nos momentos M45 e M60. Conclui-se, nas condições deste estudo, que o PRP pode ser utilizado como terapia adjuvante, pois promove cicatrização óssea precoce em fraturas experimentais (*gap* de 2,0mm) do rádio de cães tratadas com fixador esquelético externo.

PALAVRAS-CHAVE: Fator transformador de crescimento beta. Plaquetas. Osso e ossos.

SUMMARY

The present article aimed to assess bone healing of experimental radial fractures, treated or not with autologous PRP, by means of radiographic and densitometric studies. Eleven dogs were randomly allocated in two experimental groups: control group (CG n=6) PRP group (PRPG n=5). All dogs underwent radial osteotomy and osteosynthesis (external skeletal fixation) of the right forelimb, in which a 2.0 mm defect was created. The gap was filled PRP in the treated group (PRPG); while CG received no treatment. Radiographic and densitometric studies were performed immediately at the end of the procedure and 14, 21, 28, 35, 45 and 60 days after the surgery (M0, M14, M21, M28, M35, M45 e M60). Way repeated measures ANOVA with Tukey as post hoc test; Friedman test and Dunn's post hoc test were used to compare data in different moments; and Mann-whitney test in different groups ($p < 0.05$). About assessment to moments; radiographic scores and densitometric values changed significantly at moment 0 and 60 within the PRPG. Comparing groups radiographic scores changed significantly from M28 and densitometric values from M45 and M60. Concluded under the conditions of this study; that PRP can be used as an adjuvant therapy to improve bone healing of experimental radial fractures (*gap* 2.0 mm) of dogs treated with external skeletal fixation.

KEY-WORDS: Transforming growth factor beta. Blood platelets. Bone and bones.

¹ Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal. Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia (FOA) Universidade Estadual Paulista (Unesp). * Autor para correspondência: landrade@fmva.unesp.br. Rua Clóvis Pestana, 793, prédio 87, Araçatuba-SP. CEP. 16050-680, Brasil.

INTRODUÇÃO

O reparo de fraturas com defeitos ósseos, em locais pouco vascularizados, é difícil e as técnicas clássicas de estabilização e enxertias ósseas, nem sempre fornecem resultados satisfatórios, culminando em cicatrização óssea tardia e não união óssea (JACKSON & MILLIS, 2007, BOUDRIEU, 2007).

Além do correto método de fixação, materiais biológicos como proteínas ósseas morfogenéticas, medula óssea, células tronco, plasma rico em plaquetas, entre outros são utilizados com o intuito de acelerar o processo de cicatrização óssea e minimizar complicações (MARX, 2004, BOUDRIEU, 2007, JACKSON & MILLIS, 2007).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido pela centrifugação de sangue total. É rico em fatores de crescimento (FC) e proteínas osteocondutoras (fibrina, fibronectina e vitronectina), que servem de matriz à migração celular, favorecendo osteocondução, epitelização e osteointegração (OBARRIO et al., 2000, HENDERSON et al., 2003, MARX, 2004). Para ser eficiente o PRP deve ter um incremento mínimo de 338% no valor basal da contagem de plaquetas (MARX et al., 1998).

O PRP aumenta principalmente a concentração de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs – aa, bb, ab), fator de crescimento transformador β (TGF- β 1 e β 2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), que estão nos grânulos α das plaquetas (MARX, 2001, SANCHEZ, 2003, WROTNIK et al., 2007). O PDGF e TGF- β foram demonstrados no PRP autólogo humano por meio de imunomarcagem. Células osteoprogenitoras e células-tronco da medula óssea obtidas em enxerto esponjoso com porção medular, foram marcadas com anticorpos de receptores de membrana para PDGFs e TGF- β ; confirmando assim, serem fatores que possuem ação na reparação do tecido ósseo (MARX et al., 1998).

Os FC estimulam angiogênese e proliferação de fibroblastos, proporcionando um aumento na síntese de colágeno. Estudos demonstraram que a utilização do PRP, associado ou não a outros tipos de enxerto, abrevia o tempo requerido para cicatrização óssea (MARX 2004, GERARD et al. 2006, WROTNIK et al. 2007).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a cicatrização óssea de fraturas experimentais do rádio de cães, tratadas ou não com o PRP autólogo, por meio de estudos radiográfico e densitométrico.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nas dependências do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal seguindo as recomendações do COBEA sob o protocolo 2007-008690.

Foram utilizados 11 cães sem raça definida, machos e fêmeas castrados, com idade entre um e cinco anos e

peso variando de quatro a seis quilos, oriundos de Centros de Controle de Zoonoses do estado de São Paulo. Após um período de adaptação nos canis da Instituição, foram realizados exames físicos e complementares (sorologia para leishmaniose, hemograma completo e contagem total de plaquetas). Os cães foram vermifugados, vacinados, mantidos com coleira repelente (Scalibor[®]) e medicados com ectoparasiticida (Fipronil) mensalmente, com o intuito de evitar a ocorrência de doenças concomitantes que interferissem na conduta do experimento.

Constituíram-se dois grupos experimentais de forma aleatória: o grupo controle (G-controle) com seis animais e o grupo PRP (G-PRP) contendo cinco animais. Todos foram submetidos à osteotomia transversal em toda circunferência do rádio direito gerando-se um *gap* de 2,0 mm, com o intuito de promover uma falha óssea e mimetizar uma situação clínica de fratura com tendência a cicatrização óssea tardia. Em seguida, foi realizada estabilização da fratura por meio de fixador esquelético externo uniplanar bilateral com pinos de 1,5 mm (Cãomédica[®]). Os cães do G-PRP tiveram a falha óssea preenchida com 1,0 mL do gel contendo o PRP, que foi previamente processado em laboratório; enquanto no G-controle o *gap* permaneceu vazio.

Para realização da osteotomia e osteossíntese os cães foram submetidos a jejum alimentar e hídrico de 12 e duas horas, respectivamente. Como medicação pré-anestésica utilizou-se Cloridrato de Morfina (0,5 mg/Kg) e Midazolam (0,2 mg/Kg) por via intramuscular; seguida da indução anestésica intravenosa com Propofol (4 mg/Kg) associado ao Midazolam (0,2 mg/Kg), e mantidos sob anestesia geral inalatória com Isoflurano em circuito semifechado com vaporização inicial de 3V% e que variou ao longo do procedimento de acordo com o requerimento anestésico individual. Ato contínuo foi realizado bloqueio do plexo braquial (o volume total foi baseado na dose de Lidocaína 7 mg/Kg e dividido na proporção 1:1 com Bupivacaína ambas com vasoconstritor) (TRANQUILLI et al., 2007). Concomitantemente, foi administrado antibiótico (Cefalotina 30mg/Kg) por via intravenosa no momento da indução anestésica para profilaxia da infecção.

Depois de decorridos 15 minutos da medicação pré-anestésica, houve colheita de 8,0 mL de sangue por venopunção da jugular em tubo contendo 2,0 mL de citrato de sódio como anticoagulante para o preparo do PRP autólogo. Separou-se uma alíquota do sangue para a contagem total de plaquetas, submetendo o restante à primeira centrifugação (160 G/20 minutos). Em seguida, todo o sobrenadante juntamente com a capa leucocitária e mais dois milímetros de hemácias foram transferidos para outro tubo para realização da segunda centrifugação (400 G/15 minutos), obtendo-se um volume de 1,0 mL de PRP. Ao final do processamento uma nova contagem de plaquetas foi realizada para confirmação de um incremento mínimo de 338% do valor basal. No momento de utilização o PRP foi adicionado a cloreto de cálcio 10% para gelificação e ativação do mesmo, em banho maria, que ficou pronto para uso no trans-operatório.

Foi realizada tricotomia e antisepsia, seguidas de abordagem cirúrgica do rádio direito por acesso medial, até visualização da diáfise para osteotomia total, segundo Piermattei & Flo (1999). A fratura foi realizada empregando-se disco diamantado acoplado a uma caneta de baixa rotação, deixando um *gap* de 2,0 mm, que foi preenchido, em esquema duplo cego, com o PRP no grupo G-PRP. Concomitantemente, foi aplicado o fixador externo seguido da síntese dos planos cirúrgicos e curativo.

Ao final do procedimento cirúrgico repetia-se o bloqueio do plexo braquial para complementação analgésica. Como medidas pós-operatórias utilizou-se Cloridrato de Morfina (0,5 mg/Kg, SC a cada quatro horas durante as primeiras 12 horas), seguido de Cloridrato de Tramadol (4 mg/Kg a cada oito horas, durante cinco dias), e Meloxicam (0,2 mg/Kg a cada 24 horas, durante três dias) para promover analgesia. Ainda, antibioticoterapia com Cefalexina (30 mg/Kg a cada 12 horas, durante dez dias) e curativos diários até a retirada do implante, quando os cães puderam ser adotados.

Os exames radiográficos e densitométricos realizaram-se no pós-operatório imediato, aos 14, 21, 28, 35, 45 e 60 dias de pós-operatório (M0, M14, M21, M28, M35, M45 e M60). As radiografias foram realizadas com uma escada de alumínio colocada paralela ao rádio e em seguida escaneadas. Para obtenção dos valores densitométricos em milímetros de alumínio (mmAl) foram analisadas com o auxílio de um programa computacional (Imaje J[®]) (LOUZADA et al., 2001). Para avaliação radiográfica adotou-se um escore modificado segundo Wilson et al. (2006) (0)- linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, sem proliferação óssea; (1)- linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, com proliferação óssea, sem calo em ponte; (2)- linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, com proliferação óssea, com calo em ponte; (3)- linha de fratura de < 1,0 mm, sem proliferação óssea; (4)- linha de fratura < 1,0 mm, com proliferação óssea, sem calo em ponte; (5)- linha de fratura < 1,0 mm, com proliferação óssea, com calo em ponte (união clínica) e (6)- ausência de linha de fratura.

A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância com medidas repetidas (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias; teste de Friedman seguido do teste de Dunn para comparar os momentos em cada grupo e o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos em cada momento, adotando-se um nível de significância de 5%, empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os animais tratados observou-se um incremento mínimo de 338% de plaquetas, conforme recomendado por Marx et al. (1998) (Tabela 1). Portanto, a metodologia utilizada para o preparo do PRP foi eficaz na concentração plaquetária corroborando Dias et al. (2002) e Oyama et al. (2004) que utilizaram protocolos com rotação e tempo de centrifugação semelhantes. Diferentemente de Obarrio et al. (2000) e Marx (2004), que utilizaram equipamentos de elevado custo, neste estudo foi utilizada uma centrífuga laboratorial comum, comprovando ser uma técnica de fácil aplicação na rotina clínica.

A gelificação e ativação do PRP foram obtidas adequadamente com o uso isolado de cloreto de cálcio a 10% conforme descreveu Wilson et al. (2006). Este procedimento não gerou reações adversas sistêmicas e locais, conforme descrevera Sanchez et al. (2003) que utilizaram trombina bovina e relataram desenvolvimento de anticorpos contra fatores de coagulação. Silva et al. (2009) que utilizaram o cloreto de cálcio e tromboplastina (soluplastin[®]) também observaram reações do tipo corpo estranho que pode ter influenciado negativamente na ação do PRP. Barbosa et al. (2008) utilizaram soluplastin[®] sem descrição de reações adversas.

A preparação do PRP ocorreu simultaneamente ao procedimento cirúrgico para assegurar que pudesse ser utilizado logo após sua obtenção, uma vez que passadas três horas da centrifugação apenas o PDGF mantém sua concentração e o TGF-beta decresce consideravelmente (RUTKOWSKI, et al. 2008).

Tabela 1 - Valores da contagem de plaquetas basal e no PRP final dos cães do grupo tratado (G-PRP), com seu respectivo percentual de concentração

| Contagem de plaquetas/ μ L no grupo tratado (G-PRP) | | | |
|---|---------|-----------|--------------|
| Animal | Basal | PRP | Concentração |
| 1 | 202.500 | 875.000 | 432% |
| 2 | 275.000 | 1.445.000 | 525% |
| 3 | 172.500 | 1.082.500 | 628% |
| 4 | 187.500 | 1.540.000 | 821% |
| 5 | 310.000 | 1.047.500 | 338% |

PRP=Plasma rico em plaquetas

Tabela 2 - Mediana, valores mínimo e máximo do escore radiográfico (0-6) do radio de cães, segundo os grupos em cada momento de avaliação.

| Momento (dias) | G-controle | | G- PRP | |
|-------------------|----------------|-----------|--------|-----------|
| | Md | Min – Máx | Md | Min – Máx |
| M0 | 0b | 0 – 0 | 0 b | 0 – 0 |
| M14 | 1,5 | 0 – 3 | 3 b | 0 – 3 |
| M21 | 3 ^a | 1 – 4 | 3 | 1 – 4 |
| M28 | 1 B | 1 – 3 | 4 A | 1 – 4 |
| M35 | 1 B | 1 – 3 | 4 A | 4 – 4 |
| M45 | 1 B | 1 – 4 | 4 A | 4 – 4 |
| M60 | 1 B | 1 – 5 | 5 aA | 4 – 5 |

Medianas seguidas de letra distinta minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Média (\bar{x}) e erro padrão da média (EPM) dos valores densitométricos, em mmAl, do radio dos cães segundo os grupos em cada momento de avaliação.

| Momento (dias) | Valores densitométricos ($\bar{x} \pm \text{EPM}$) | |
|-------------------|--|--------------------|
| | G-controle | G-PRP |
| M0 | 5,04 \pm 0,42 | 5,18 \pm 0,21 b |
| M14 | 5,69 \pm 0,23 | 5,54 \pm 0,15 b |
| M21 | 5,27 \pm 0,24 | 5,54 \pm 0,22 b |
| M28 | 5,44 \pm 0,19 | 5,56 \pm 0,14 b |
| M35 | 5,16 \pm 0,25 | 5,80 \pm 0,34 |
| M45 | 5,28 \pm 0,13 B | 5,84 \pm 0,09 A |
| M60 | 5,19 \pm 0,19 B | 6,41 \pm 0,18 aA |

Médias seguidas de letra distintas minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

No que tange a avaliação radiográfica houve diferença estatística significativa entre os grupos a partir do 28º dia de pós-operatório (M28) (Tabela 2), corroborando Wilson et al. (2006) que também observaram diferença entre grupos controle e tratado com PRP em falhas ósseas de coelhos. Em contrapartida, Marx et al. (1998) em estudos de reconstrução mandibular e Silva et al. (2007) que avaliaram o uso do PRP associado à hidroxiapatita em falhas ósseas de radio de cães fixados com placas e parafusos, não observaram diferença estatística entre os grupos tratado e controle.

O método de fixação externa utilizado permite maior formação de calo ósseo periosteal e provavelmente maior quantidade de micro movimentos quando comparado às placas e parafusos (PIERMATTEI & FLO, 1999), o que justifica a aparência radiográfica dos rádios do G-controle que apresentaram um aumento da espessura da linha de fratura ao longo do tempo de pós-operatório. Provavelmente os vasos sanguíneos não estavam em número e organização suficientes para promover um ambiente oxigenado e estável para permitir diferenciação de osteoblastos e manutenção de osteócitos para cicatrização. Desta forma, houve reabsorção nas extremidades do foco de fratura

caracterizando uma união óssea retardada. Entretanto no G-PRP observou-se uma redução contínua da linha de fratura com organização e união do calo ósseo, indicando que o PRP aumentou a vascularização e celularidade permitindo deposição de matriz mineral precocemente.

Referente à avaliação subjetiva da imagem radiográfica, 80% (4/5) dos cães tratados atingiram união clínica com maior radiopacidade (Figura 1) discordando de Silva et al. (2009) que apontaram semelhança entre grupo PRP e grupo controle no tratamento de falhas ósseas em crânios de coelhos. A discordância de resultados deve-se provavelmente por tratarem-se de ossos distintos, uma vez que os ossos do crânio quando fraturados, reparam-se por um processo cicatricial mais lento e sem formação de calo ósseo.

À avaliação densitométrica observou-se diferença estatística significativa entre os grupos nos momentos M45 e M60 (Tabela 3), ao contrário de Silva et al. (2007) que não encontraram diferença entre os grupos mesmo aos 60 dias de pós-operatório. Entretanto o método de fixação utilizado (placa e parafuso) foi diferente ao que aqui se adotou e que sabidamente promove um tempo de consolidação mais longo e sem formação de calo periosteal exuberante. Assim o

método de fixação utilizado pode ter influenciado na diferença dos resultados.

Semelhante ao observado na avaliação radiográfica, os valores densitométricos não apresentaram diferença entre os momentos do G-controle, mas foi significativamente diferente entre M0 e M60 no G-PRP, atestando que o PRP aumentou a deposição óssea no foco de fratura elevando os valores de densidade mineral óssea. Silva et al. (2007) também obtiveram

maior média de densidade óssea no grupo tratado aos 45 dias porém sem significância estatística.

A superioridade do G-PRP em relação ao G-controle deveu-se, provavelmente, a uma vascularização mais intensa e precoce em função da presença dos fatores de crescimento, com estímulo a proliferação celular no foco de fratura, acelerando a deposição de matriz óssea levando a união clínica em 80% (4/5) dos animais aos 60 dias mesmo em fraturas experimentais com falha óssea de 2,0 mm.

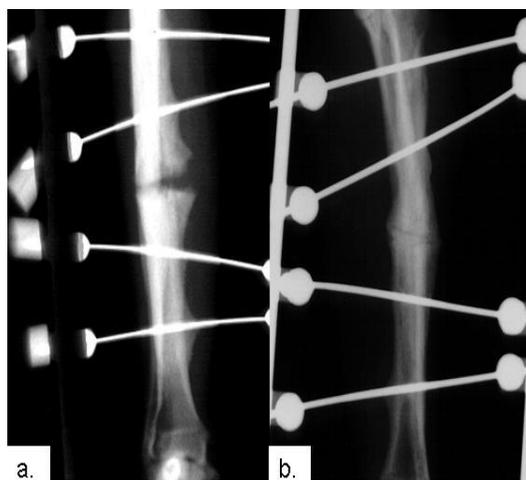


Figura 1 (a.) - Imagem radiográfica de um cão do G-controle aos 60 dias de pós-operatório (M60) com visível linha de fratura, proliferação periosteal sem formação de calo em ponte e área de reabsorção na lacuna de fratura; **(b.)** - Imagem radiográfica de um cão do G-PRP aos 60 dias de pós-operatório (M60) com discreta linha de fratura e calo em ponte (união clínica).

CONCLUSÃO

Conclui-se, nas condições deste estudo, que o Plasma Rico em Plaquetas pode ser utilizado como terapia adjuvante, pois promove cicatrização óssea precoce em fraturas experimentais (*gap* de 2,0 mm) do rádio de cães tratadas com fixador esquelético externo.

AGRADECIMENTOS

A professora Silvia H. V. Perri e ao professor Mario J. Q. Louzada pela colaboração na realização da estatística e da densitometria óssea respectivamente. Aos meus pais e a Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (FUNDUNESP) pelo financiamento à pesquisa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C., OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural*, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.

BOUDRIEAU, R. J. Fraturas do rádio e da ulna, In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. v.2. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. p.1953-1973.

DIAS, E. C. L. C. M.; BARROS, M. A. A.; ANDRADE, R. Plasma Rico em Plaquetas. *RBP: Revista Brasileira de Implantodontia Prótese Sobre Implante*, v.8, n.3, p.36-38, 2002.

GERARD, D.; CARLSON, E. R.; GOTCHER, J. E.; JACOBS, M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dog. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.64, n.3, p.443-451, 2006.

HENDERSON, J. L.; CUPP, C. L.; ROSS, E. V.; SHICK, P. C.; KEEFE, M. A.; WESTER, D. C.; HANNON, T.; MCCONNELL, D. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear, Nose and Throat Journal*, v.82, n.8, p.598-602, 2003.

JACKSON, A. M., MILLIS, D. L. Uniões tardias, não-uniões e má-uniões. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. v.2. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. p.1849-161.

- LOUZADA, M. J. Q.; NOGUEIRA, G. P.; GARCIA JUNIOR, I. R.; CARVALHO, C. A.; PAULA, G. A. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. **FOL Faculdade de Odontologia de Lins/UNIMEP**, v.13, n.1, p.33-38, 2001.
- MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M., SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.4, p.489-496, 2004.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v.10, n.4, p.225-228, 2001.
- OBARRIO, J. J.; ARAÚZ-DUTARI, J. I.; CHAMBERLAIN, T. D.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology: case reports. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.20, n.5, p.487-497, 2000.
- OYAMA, T.; NISHOMOTO, S.; TSUGAWA, T.; SHIMIZU, F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**. v.62, p.555-558, 2004.
- PIERMATTEI, D. L.; FLO G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1999. 694p.
- RUTKOWSKI, J. L.; THOMAS, J. M.; BERING, C. L.; SPEICHER, J. L.; RADIO, N. M.; SMITH, D. M.; JOHNSON, D. A. An Analysis of a rapid, simple, and inexpensive technique used to obtain platelet-rich plasma for use in clinical practice. **Journal of Oral Implantology**, v.34, n.1, p.25-33, 2008.
- SANCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? Current Review. **The international journal of oral and maxillofacial implants**, v.18, n.1, p.93-103, 2003.
- SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTÉRIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.129-134, 2009.
- SILVA, S. B.; FEERIGNO, C. R. A.; ATERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B. B.; YASBEK, K. V.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação de calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.37, n.4, p.1045-1051, 2007.
- TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 4.ed. Australia: Blackwell. 2007. 1096p.
- WILSON, L. M. T.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.4, p.208-212, 2006.
- WROTNIAK, M.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T. S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. **Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja**, v.9, n.3, p.227-238, 2007.