

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Luis Ernesto Campos Torres

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN-VITRO* DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) SOBRE A MICROBIOTA OCULAR DE EQUINOS HÍGIDOS
DE MINAS GERAIS.**

Belo Horizonte

Escola de Veterinária - UFMG

2022

Luis Ernesto Campos Torres

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN-VITRO* DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) SOBRE A MICROBIOTA OCULAR DE EQUINOS HÍGIDOS
DE MINAS GERAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Pino Albuquerque Maranhão

Belo Horizonte

2022

T693a Torres, Luis Ernesto Campos, 1994 -
Atividade antimicrobiana in-vitro do plasma rico em plaquetas (PRP) sobre a microbiota ocular de equinos hípidos em Minas Gerais / Luis Ernesto Campos Torres . -2022.
63.:il.

Orientadora: Renata de Pino Albuquerque Maranhão.
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência animal
Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinária.
Bibliografia: f. 49 a 60.

1. Equino - Teses - 2. Antimicrobianos - Teses - 3. Veterinária - Teses - I. Maranhão, Renata de Pino Albuquerque - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - LUIS ERNESTO CAMPOS TORRES

Às 14:00 horas do dia 30 de maio de 2022, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

"ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN-VITRO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) SOBRE A MICROBIOTA OCULAR DE EQUINOS HÍGIDOS DE MINAS GERAIS"

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgia Veterinária**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Renata de Pino Albuquerque Maranhão**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Renata de Pino Albuquerque Maranhão	x	
Jorge Uriel Carmona Ramírez	x	
Priscila Fantini	x	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	x	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 01 volume encadernado da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de maio de 2022.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Renata de Pino Albuquerque Maranhão, Professora do Magistério Superior**, em 09/06/2022, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Fantini, Cidadão**, em 09/06/2022, às 19:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Uriel Carmona Ramírez, Usuário Externo**, em 09/06/2022, às 20:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1474106** e o código CRC **E2B9B1DD**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUIS ERNESTO CAMPOS TORRES

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 Veterinária.

Aprovado(a) em 30 de maio de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Renata de Pino Albuquerque Maranhão - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Jorge Uriel Carmona Ramírez

Dr.(a). Priscila Fantini



Documento assinado eletronicamente por **Renata de Pino Albuquerque Maranhão, Professora do Magistério Superior**, em 07/06/2022, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Fantini, Cidadão**, em 09/06/2022, às 19:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Uriel Carmona Ramírez, Usuário Externo**, em 09/06/2022, às 20:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1474173** e o código CRC **B8497CD8**.

Dedico

A toda minha família, que sem o apoio deles, nada disso teria acontecido. Também para aquelas pessoas que vi por última vez na Colômbia e agora que voltar não vou ver mais.

AGRADECIMENTOS

Quiero dar las gracias primeramente a toda mi familia, que me dieron las alas para volar hasta donde estoy ahora. En especial a mi madre Elizabeth Torres, mi hermana Katherine Campos, mi hermano Jhon Campos, mi papá Luis Campos, mi padrino Fabian Barrios y sus hijos, mi tía Olga Torres y todos los demás familiares y amigos que siempre desde la lejanía me brindaron su apoyo incondicional y desearon lo mejor para mí. Agradezco también a mis casi hermanos y roomies que me regalo esta experiencia en Brasil, Jennifer Castro y Camilo Osorio, que fueron piezas claves e incondicionales en estos años.

Quero dar um agradecimento especial para minha orientadora, Profa. Renata de Pino Albuquerque Maranhão, por ter me acolhido como seu orientado, pela oportunidade, pela paciência, pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos, por ser a luz nesses momentos de escuridão durante essa caminhada. Também quero dar um agradecimento a minha colega Jéssica Guerra pela ajuda e o apoio incondicional que me brindo neste processo, para que tudo fora possível. A minha outra mão esquerda e colega da pós-graduação Camilo Osorio, pela ajuda, acompanhamento e amizade real neste processo. À Profa. Priscila Fantini por sua amizade, seu apoio, seu conhecimento em todos os momentos do mestrado. À Profa. Fabíola Paes Leme por ter me aberto um espaço no laboratório da unidade multidisciplinar de pesquisa animal (MULTILAB), pela ajuda e ensinamentos. A Profa. Kelly Moura Keller pela ajuda no esclarecimento de dúvidas, pelo apoio e pelo acesso ao laboratório de micologia e toxinas (LAMICO). A Prof. Carmona, que além de ser um pesquisador exemplar, desde a Colômbia me brindo assessoria incondicional. A Profa. Ilza Santos, que sempre desde a distância sua ajuda, apoio e gentileza foi presente. A Profa. Rafaella Teixeira por todos os conhecimentos transmitidos e por ser esse docente inspirador. A Prof. Jorge Tibúrcio pela amizade, pelo apoio e pelos ensinamentos no transcurso de seu projeto de Doutorado. Aos jovens cientistas Henrique Lobato e Giovanna Debeche que me acompanharam durante todo o experimento. A todo o pessoal do grupo de estudos EMIE e o pessoal do galpão de equinos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio com a bolsa de estudos durante o período do mestrado.

Só tenho palavras de gratidão para as pessoas que fizeram parte deste processo, e desejo o melhor para todos.

*A nossa recompensa está no esforço, não
no resultado.*

Um esforço total é uma vitória completa.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Na oftalmologia equina, as ceratites ulcerativas estão entre as afecções mais comuns e, em geral, surgem como consequência a algum trauma sofrido. Apesar do trauma ser a causa primária, a contaminação subsequente por bactérias patogênicas ou residentes da microbiota ocular do cavalo pode ter consequências não desejáveis. Em condições fisiológicas, a microbiota normal coexiste com o estado imunológico do hospedeiro. Serve como barreira, garantindo a saúde da superfície ocular e inibindo a proliferação de agentes patogênicos. No entanto, no desequilíbrio das barreiras imunes, a microbiota normal pode se tornar patogênica e levar a infecção, agindo como um agente oportunista. O objetivo do presente estudo é demonstrar o efeito antimicrobiano do Plasma rico em plaquetas (PRP), seu tempo de ação e sua correlação com a concentração dos seus mesmos componentes *in-vitro* sobre *Staphylococcus sciuri*, bactéria com alta prevalência na microbiota ocular normal de cavalos hígidos do município de Minas Gerais, avaliando diversos testes antimicrobianos na busca de métodos mais rápidos, mais sensíveis e com dados com maior estabilidade. Para a confecção do PRP, foram utilizados oito equinos adultos da raça Quarto de Milha (QM) que forneceram apenas o sangue para processamento. Após a coleta de sangue, foi realizado hemograma, obtendo: contagem plaquetária, contagem de hemácias e leucócitos em hemocítmetro de impedância. O PRP individual foi elaborado pelo protocolo de dupla centrifugação e em seguida, os PRPs foram somados em um *pool*, seguindo a ser testado sua interação em cultivo com caldo *Brain heart infusion* (BHI) em diferentes diluições frente a seis cepas coletadas de diferentes animais. Após 3, 6, 12 e 18 horas, foi avaliada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placa de ágar sangue de equino 5%, e a leitura da densidade óptica pelo método de espectrofotometria de massa, para cada tempo. Nosso estudo demonstrou que o *Staphylococcus sciuri*, é mais susceptível que a cepa padrão “American Type Culture Collection” (ATCC) *Staphylococcus aureus*, micro-organismo patógeno, utilizado para a validação de nosso estudo. O efeito antibacteriano apresentado neste estudo foi bacteriostático por até 6 horas. Onde nossas diluições mais concentradas de PRP 1:1 (5) e 1:2 (6) foram as mais efetivas, garantindo que esse efeito antibacteriano é dependente do volume.

Palavras chaves: PRP, equino, *Staphylococcus sciuri*, atividade antimicrobiana, UFC, bacteriostático, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

In equine ophthalmology, ulcerative keratitis is among the most common affections and, in general, arises as a consequence of some trauma suffered. Although trauma is the primary cause, subsequent contamination by pathogenic or resident bacteria of the horse's ocular microbiota can have undesired consequences. Under physiological conditions, the normal microbiota coexists with the host's immune status. It serves as a barrier, ensuring the health of the ocular surface and inhibiting the proliferation of pathogens. However, in the imbalance of immune barriers, the normal microbiota can become pathogenic and lead to infection, acting as an opportunistic agent. The aim of the present study is to demonstrate the antimicrobial effect of platelet-rich plasma (PRP), its time of action and its correlation with the concentration of its same components in-vitro on *Staphylococcus sciuri*, a bacterium with high prevalence in the normal ocular microbiota of horses. in the municipality of Minas Gerais, evaluating several antimicrobial tests in the search for faster, more sensitive methods with more stable data. For the preparation of the PRP, eight adult Quarter Horse (QM) horses were used, which only supplied the blood for processing. After blood collection, a complete blood count was performed, obtaining platelet count, erythrocyte and leukocyte count in an impedance hemocytometer. The individual PRP was prepared by the double centrifugation protocol and then the PRPs were added into a pool, followed by testing their interaction in culture with Brain heart infusion (BHI) broth at different dilutions against six strains collected from different animals. After 3, 6, 12 and 18 hours, was evaluated the colony forming units (UFC) count on a 5% horse blood agar plate, and the optical density reading by spectrophotometry, were evaluated for each time. Our study demonstrates that *Staphylococcus sciuri*, commensal microorganism of the ocular microbiota of healthy horses in the municipality of Minas Gerais, is more susceptible than the standard "American Type Culture Collection" (ATCC) strain *Staphylococcus aureus*, a pathogenic microorganism, used for the validation of our study. The antibacterial effect presented in this study was bacteriostatic for up to 6 hours. Where our most concentrated dilutions of PRP 1:1 (5) and 1:2 (6) were the most effective, ensuring that this antibacterial effect is volume dependent.

Keywords: PRP, horse, *Staphylococcus sciuri*, antimicrobial activity, CFU, bacteriostatic, *Staphylococcus aureus*.

ISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medianas de UFC/ml das cepas em cada tempo, considerando-se todas as medianas das diluições.	40
Tabela 2 - Medianas das UFC/ml das diluições de acordo à tempo considerando-se todas as cepas.	41
Tabela 3 - Medianas da Absorbância (A_{620}) das cepas ao longo do tempo considerando-se todas as medias das diluições	42
Tabela 4 - Medianas da absorbância (A_{620}) das diluições ao longo do tempo considerando-se todas as cepas.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho dos subgrupos de cada tratamento 37

Figura 2 - Médias de UFCs/ml das cepas ao longo do tempo considerando-se todas as medias das diluições. Fonte: pessoal. ***C1-6** Staphylococcus sciuri, **CP** Staphylococcus aureus. Letras maiúsculas especificam diferenças entre cepas para um mesmo tempo e minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma cepa, com nível de significância de 5%..... 40

Figura 3 – Médias de UFC/ml das diluições ao longo do tempo considerando-se as medias das cepas. Letras maiúsculas especificam diferenças entre diluições para um mesmo tempo. Letras minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma diluição, com nível de significância de 5%. Fonte: pessoal. *(**3**) controle, (**5**) 1:1, (**6**) 1:2, (**7**) 1:4, (**8**) 1:8, (**9**) 1:16. 41

Figura 4 – Médias de UFC/ml das diluições consideranso-se todas as medias das cepas e tempos agrupadas. Fonte: pessoal. *(**3**) controle, (**5**) 1:1, (**6**) 1:2, (**7**) 1:4, (**8**) 1:8, (**9**) 1:16.... 42

Figura 5 – Médias da Absorbância (A_{620}) das cepas ao longo do tempo considerando-se todas as medias das diluições. Letras maiúsculas especificam diferenças entre cepas para um mesmo tempo. Letras minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma cepa, com nível de significância de 5%. Fonte: pessoal. ***C1-6** Staphylococcus sciuri, **CP** Staphylococcus aureus..... 43

Figura 6 – Médias da Absorbância (A_{620}) das diluições ao longo do tempo considerando-se as medias das cepas. Letras maiúsculas especificam diferenças entre diluições para um mesmo tempo. Letras minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma diluição, com nível de significância de 5%. Fonte: pessoal. *(**5**) 1:1, (**6**) 1:2, (**7**) 1:4, (**8**) 1:8, (**9**) 1:16. 44

Figura 7 – Médias da Absorbância das diluições considerando-se todas as medias das cepas e tempos agrupados. Fonte: pessoal. *(**5**) 1:1, (**6**) 1:2, (**7**) 1:4, (**8**) 1:8, (**9**) 1:16. 45

LISTA DE ABREVIATURAS

%T: Porcentagem de transmissão

ADP: Adenosina difosfato

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosina trifosfato

BHI: Brain heart infusion

CaCl₂: Cloruro de cálcio

CP: Concentrado plaquetário

CTAP3: Peptídeo ativador do tecido conjuntivo

DO: Densidade óptica

EGF: Fator de crescimento epidermal

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FC: Fatores de crescimento

FcγRII: Receptor de baixa afinidade para fragmentos de imunoglobulina G

FGF: Fator de crescimento fibroblástico

IGF: Fator de crescimento derivado de insulina

IL-1β: Interleucina 1 beta

L-PRP: Plasma rico em plaquetas e leucócitos

MIC: Concentração mínima inibitória

MK: Megacariócitos

MMP: Metaloproteinase

MPO: Mieloperoxidase

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MRSE: *Staphylococcus epidermis* resistente à meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

MSSE: *Staphylococcus epidermis* sensível à meticilina

NAP2: Peptídeo ativador de neutrófilos

PBS: Solução buffer fosfato salina

PBP: Proteína básica plaquetária

PDGF: Fator de crescimento derivado das plaquetas

PF-4: Fator plaquetário 4

pH: Potencial hidrogeniônico

PMP: Proteínas antimicrobianas plaquetárias

PPP: Plasmas pobre em plaquetas

PPR: Peste des petites ruminants

PRGF: Plasma rico em fatores de crescimento

PRP: Plasma rico em plaquetas

QM: Quarto de milha

TGF- β : Fator de crescimento beta transformante

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colônias

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

SUMARIO

RESUMO	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Plasma rico em plaquetas.....	16
2.2 Plaquetas.....	18
2.3 Atividade antimicrobiana do PRP.....	20
2.4 Microbiologia do crescimento bacteriano.....	25
2.4.1 Condições físicas e químicas.....	25
2.4.2 Meios de cultura e método de contagem em placa.....	26
2.4.3 Espectrofotometria.....	28
2.5 Conjuntiva ocular e sua microbiota.....	29
2.5.1 <i>Staphylococcus sciuri</i>	30
2.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3. MATERIAIS E METODOS.....	33
3.1 Animais	33
3.2 Coleta e processamento do PRP	34
3.3 Preparação das Bactérias e inóculo.....	35
3.4 Desenho do estudo e ensaio antibacteriano <i>in-vitro</i>	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Animais e avaliação do sangue total comparado com o PRP	39
4.2 Comportamento das cepas e as diluições ao longo do tempo relacionadas com a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).....	39
4.3 Comportamento das cepas e as diluições ao longo do tempo relacionadas com a densidade óptica medida por absorbância.....	42
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
9. ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

As ceratites ulcerativas estão entre as afecções mais comuns na oftalmologia equina, em geral, surgem como consequência a algum trauma sofrido (CÁRDENAS e CACERES, 2017). Embora o trauma seja a causa inicial, a contaminação secundária por bactérias patógenas ou residentes da microbiota ocular do equino pode resultar em sequelas graves. Em situações fisiológicas, a microbiota normal vive em equilíbrio com a condição imune do hospedeiro. Ela cumpre uma função de barreira, mantendo a saúde da superfície ocular e evitando crescimento excessivo de agentes patogênicos. Porém, diante da redução das barreiras imunes, a microbiota normal pode tornar-se patogênica e levar a infecção, cursando como um agente oportunista (JOHNS *et al.*, 2011; KHOSRAVI *et al.*, 2014). Os isolados bacterianos e fúngicos da conjuntiva normal podem variar conforme a localização geográfica, clima, idade, sexo e habitação dos animais. Mais comumente predominam as bactérias Gram-positivas aeróbias (ANDREW *et al.*, 2003; KHOSRAVI *et al.*, 2014): *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp. (BARAN *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2017; HAMPSON *et al.*, 2018). Concordando com esses estudos, Oliveira (2019) isolou micro-organismos de cavalos hígidos em dois municípios de Minas Gerais onde um dos agentes com mais prevalência foi o *Staphylococcus sciuri* sendo compatível também com outros estudos na espécie (ANDREW *et al.*, 2003; JOHNS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; HAMPSON *et al.*, 2018). Os *Staphylococcus* são um dos principais gêneros envolvidos nas alterações oculares de equinos (WADA *et al.*, 2010; KELLER e HENDRIX, 2005).

Os tratamentos para ceratite ulcerativa, muitas vezes, apresentam resultados limitados. Por isso, surge a necessidade de encontrar novas estratégias terapêuticas que sejam de ação múltipla, menos artificiais e sem potenciais alérgenos, como conservantes ou outros produtos que, em curto ou longo prazo, possam induzir toxicidade na superfície ocular, que é muito vulnerável (RIBEIRO *et al.*, 2017). Nesse contexto o plasma rico em plaquetas (PRP) que é um produto biológico derivado do sangue, utilizado para a promoção de melhor reparo tecidual, por meio de seus fatores de crescimento (FC) contidos na sua composição, cumpre com a maioria dos objetivos terapêuticos para este tipo de patologias oculares. Bezerra *et al.*, (2020) demonstrou a efetividade do PRP frente à ceratite ulcerativa em um equino, em que houve redução do tempo de consolidação e maior qualidade da cicatrização. Além das vantagens terapêuticas já citadas, seu potencial antimicrobiano vem recebendo atenção. Bielecki *et al.*, (2007) e Moojen *et al.*, (2008) reportaram que o concentrado de plaquetas humanas tem atividade antimicrobiana contra bactérias como *Staphylococcus aureus* (Resistente e sensível à meticilina), *Escherichia coli* e outros. Álvarez *et al.*, (2011) e López *et al.*,

(2014) comprovaram também este efeito dos derivados das plaquetas do equino em um modelo *in-vitro* frente a *Staphylococcus aureus* resistente e sensível à meticilina. Esses estudos chegaram à conclusão de que a combinação dos componentes do PRP como as plaquetas e seus grânulos alfa que liberam algumas proteínas microbicidas e fatores de crescimento, como os leucócitos e o plasma que contém complemento e proteínas de ligação ao complemento, produz uma substância com efeitos antimicrobianos (BLAIR e FLAUMENHAFT, 2009; ALVARES *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014).

Esse estudo tem como objetivo, demonstrar o efeito antimicrobiano do Plasma rico em plaquetas (PRP), seu tempo de ação e sua correlação com a concentração dos seus mesmos componentes *in-vitro* sobre *Staphylococcus sciuri*, bactéria com alta prevalência na microbiota ocular normal de cavalos hípidos do município de Minas Gerais. Até o presente momento, não foram encontrados estudos que tenham relatado a ação antimicrobiana do PRP em bactérias isoladas da microbiota ocular normal do equino, nem *in-vitro* nem *in vivo*. Para esse estudo aplicaram-se diversos testes antimicrobianos, onde um dos objetivos deste fato foi a busca de técnicas que pudesse reduzir a instabilidade da variável UFC, teste padrão ouro para avaliar crescimento bacteriano (TORTORA *et al.*, 2017), para aquilo optou-se por utilizar também a espectrofotometria para avaliar o padrão de crescimento bacteriano das diferentes diluições testadas.

Caso o efeito antimicrobiano nessa situação se confirme, poderá reduzir-se o uso de antimicrobianos para tratamentos oculares em equinos, utilizando-se uma terapia biológica de fácil obtenção, sem efeitos colaterais relatados. Além disso, essa terapia, provavelmente, também apresentará vantagens na modulação da inflamação e reparo tecidual, assim como tem sido observado para outros tecidos e doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) ou também chamado concentrado de plaquetas, é um produto biológico derivado do sangue, de forma autógena, atóxica que apresenta em sua composição, plaquetas, fatores de crescimento, proteínas plasmáticas, células mesenquimais circulantes, proteínas séricas e algumas hemácias e leucócitos (ÁLVAREZ *et al.*, 2011; FANTINI, 2014; MARQUES, 2014; SEIDEL, 2017).

O PRP para receber essa denominação, deve possuir uma concentração de plaquetas significativamente maior quando comparado com as basais do sangue total (TEXTOR, 2011).

Anitua *et al.* (2004) e Yamada *et al.* (2012) pontuam que uma concentração mínima de 300.000 plaquetas/ μL deve ser encontrada para receber essa denominação. No entanto, Baksh *et al.* (2013), observou que a concentração plaquetária descrita na literatura para o uso do PRP em tendões variou de 1,5 a 10 vezes no PRP em relação à concentração original do sangue total. Fontenot *et al.* (2012) ressaltam que a contagem plaquetária no sangue total de equinos está entre uma das mais baixas dentre os mamíferos e que, valores extrapolados da literatura de seres humanos, sugeridos como concentrações ideais no PRP, podem não se adequar à espécie equina. Esses autores ainda frisam que essa extrapolação da literatura humana também não leva em consideração a distinta fisiologia dos mecanismos de degranulação e do conteúdo de fatores de crescimento por plaqueta da espécie equina (MIRANDA, 2016).

Na medicina veterinária, o uso do PRP iniciou-se no campo da medicina esportiva (CAMARGO *et al.*, 2021) sendo utilizado como tratamento para doenças musculoesqueléticas crônicas, como a osteoartrite (CARMONA *et al.*, 2009a), tendinite (CARMONA *et al.*, 2009b), desmiste do ligamento suspensório e supraespinhoso (WASELAU *et al.*, 2008; FANTINI, 2014) e feridas cutâneas (MONTEIRO *et al.*, 2009). A racionalidade atrás do uso do PRP, reside no fato que as plaquetas possuem no seu citoplasma grânulos alfa (α), densos e lisossomais, organelas contendo moléculas bioativas que provêm as propriedades cicatrizantes plaquetária. Os grânulos- α contém diversos fatores de crescimento (FC) que são liberados após a ativação plaquetária. O efeito combinado desses fatores cria um elaborado processo autócrino e parácrino que posteriormente resulta em resposta tissular regenerativa (WROBLEWSKI *et al.*, 2010). Dentre os principais FC, estão: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento beta transformante (TGF- β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento derivado de insulina I (IGF-I). Dentre eles, os dois primeiros são os mais reconhecidos e estudados (TEXTOR, 2011).

Os FC que foram descobertos na década dos 80 por Kaplan *et al.*, (1979) têm propriedades que incluem modulação da inflamação, analgesia, aumento da capacidade regenerativa dos tecidos, indução de quimiotaxia, neovascularização, deposição de matriz celular, proliferação, diferenciação celular e antimicrobiano (CARMONA *et al.*, 2009b, TEXTOR, 2011; FANTINI, 2014; ANITUA *et al.*, 2015; RUSHTON *et al.*, 2017; SEGABINAZZI *et al.*, 2021).

Devido aos efeitos clínicos positivos deste tratamento no sistema musculoesquelético, e seus diversos potenciais efeitos terapêuticos, o PRP também tem sido estudado como alternativa terapêutica nas enfermidades dos demais sistemas (TEIXEIRA, 2014; ANITUA *et al.*, 2015; RUSHTON *et al.*, 2017; CARDENAS, 2017; SEGABINAZZI *et al.*, 2021).

Nos últimos anos os concentrados plaquetários (CP) incluindo entre eles o PRP, têm sido estudados com resultados clínicos positivos em tratamento de úlceras de córnea que não cicatrizam e que são resistentes à terapia medicamentosa, e seu uso em ceratites ulcerativas, obtendo redução do tempo de consolidação e maior qualidade da cicatrização (BEZERRA *et al.*, 2010; ALIO *et al.*, 2012, ANITUA *et al.*, 2015; CARDENAS, 2017; RUSHTON *et al.*, 2017).

Anitua *et al.*, (2015) verificou que o Plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) um derivado do PRP, estimula a regeneração em cicatrizes da superfície ocular *in-vitro*. Os efeitos benéficos do PRGF e do PRP na cicatrização de feridas na córnea têm sido atribuídos à alta quantidade de fatores de crescimento (RUSHTON *et al.*, 2017). Uma das características mais interessantes desta terapia na oftalmologia é a habilidade angiogênica. Diversos fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento epitelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento beta transformante (TGF- β), fator de crescimento epidermal (EGF) e angiopoietinas, sinalizam e mediam a atividade pró-angiogênese do PRP, o que abre uma nova janela de aplicações terapêuticas desse rico material biológico (MAMMOTO *et al.*, 2013; TEIXEIRA, 2014).

2.2 Plaquetas

As plaquetas ainda que careçam de núcleo, são fragmentos derivados do citoplasma dos megacariócitos (MKs), que possuem componentes estruturais, metabólicos e de sinalização, próprios de células nucleadas (FANTINI, 2014; TEIXEIRA, 2014). Meyers *et al.* (1982) propuseram o conceito das plaquetas serem consideradas como células secretoras, com armazenamento de diversas substâncias em seus grânulos alfa. Esse conceito está sendo retomado na literatura mais atual, posto que as plaquetas se demonstram cada vez mais presente na fisiopatologia de algumas doenças na medicina equina, nos casos de endotoxemia, laminite e afecções do trato gastrointestinal (PAES LEME *et al.*, 2006; SEGURA *et al.*, 2006; PICCIONE *et al.*, 2010). Assim, a composição molecular das plaquetas e sua multiplicidade de funções atribuídas recentemente, apoiam a decisão de ser consideradas células complexas, multifuncionais e com capacidade imunomoduladora (MCFARLAND *et al.*, 2005; HAMZEH-COGNASSE *et al.*, 2015).

As plaquetas surgem da fragmentação do citoplasma dos MKs que se desenvolvem a partir de células mieloides progenitoras pluripotenciais CD 34+ que residem no tecido hematopoiético e na corrente sanguínea (MARQUES, 2014). O processo de trombopoese é estimulado e regulado por citocinas, principalmente as interleucinas 1, 3, 6 e 11, e pelo hormônio trombopoietina que regula o desenvolvimento dos MKs e a liberação das plaquetas (REBAR *et al.*, 2003).

A vida útil das plaquetas está entre uma faixa de 5 a 9 dias na circulação sanguínea, sendo eliminadas por apoptose após alterações em sua estrutura de superfície, que ocorre predominantemente por meio das células de Kupffer e hepatócitos (SEIDEL, 2014). Segundo Zago *et al.* (2001) 80% das plaquetas se encontram na circulação e o restante fica armazenado no baço, com movimentação livre entre estes dois compartimentos. Na circulação as plaquetas são suscetíveis a sofrerem alterações físicas, bioquímicas e funcionais, o que colabora para sua heterogeneidade. A resposta funcional é variável e relacionada ao tamanho e idade, sendo atribuída às maiores e mais jovens, a maior capacidade hemostática (KARPATKIN, 1978; HARTLEY, 2007; PEREIRA 2008).

Morfologicamente, as plaquetas dos equinos apresentam forma discoide, medindo aproximadamente 5 a 7 μ m de comprimento, largura inferior a 3 μ m, apresentam formato lentiforme e podem alcançar até 20 μ m de diâmetro (PEREIRA, 1993; FELDMAN *et al.*, 2000; ARGÜELLES *et al.*, 2006). São compostas por três camadas: glicocalix que é a mais externa e contém receptores glicoproteicos que atuam no processo de ativação e adesão plaquetária. Nesta camada também estão os antígenos de membrana das plaquetas, divididos em três famílias, sendo eles as integrinas, proteínas ricas em leucina e as selectinas. A segunda camada é a bicamada fosfolipídica que contém glicoproteínas atuantes na interação entre células e fosfolipídios necessários para a coagulação. A terceira camada é a submembranosa que está formada por microtúbulos de actina, atuando como um citoesqueleto que mantém a forma discoide da plaqueta em repouso e permite a alteração de forma pós ativação (HALE *et al.*, 1996; TABLIN, 2000). As plaquetas de mamíferos possuem em seu citoplasma três tipos de grânulos: alfa, lisossomais e densos. Os grânulos alfa (α) são organelas secretoras de proteínas reguladoras de processos biológicos, incluindo, adesão e agregação plaquetária, coagulação, quimiotaxia, proliferação e inflamação (LALKO *et al.*, 2003). Entre estas proteínas se encontram citocinas, quimiocinas, FC, fator plaquetario-4, tromboglobulina, albumina, condroitina, fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator V, fator Va e fator Von Willebrand (ANITUA *et al.*, 2004). Os grânulos densos armazenam componentes de baixo peso molecular serotonina, catecolamina, cálcio, fosforo, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP). O ADP induz a migração plaquetária e em combinação com a serotonina produz contração das artérias lesionadas, e o ATP antagoniza a ação do ADP (MARQUES, 2014; PELAGALLI *et al.*, 2003). Os grânulos lisossomais contém hidrolases ácidas, guanina, fosfolipases, e quinases, que atuam como enzimas proteolíticas e hidrolíticas (MARQUES, 2014; LALKO *et al.*, 2003).

Segundo GACHET (2005) as plaquetas em condições fisiológicas encontram-se num estado quiescente, protegidas de ativação prematura. Disfunções no endotélio e alterações na liberação de fatores antiplaquetários podem levar ao aumento da ativação das plaquetas. Carmona *et al.* (2007)

afirmam que as plaquetas podem ser ativadas por agentes fisiológicos (serotonina, epinefrina, trombina, ADP, tromboxano, colágeno) ou farmacológicos (cloreto de cálcio, ionoforo de cálcio). Após ativação, as plaquetas mudam sua forma e apresentam projeções membranosas chamadas de pseudópodes (HOFFBRAND *et al.*, 2004; FANTINI, 2014), responsáveis pela agregação plaquetária liberando todas as suas organelas e componentes para o tecido, entre eles os FC. Além de atuar no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização, as plaquetas por meio do potencial terapêutico dos FC promovem potencialização da quimiotaxia, proliferação, diferenciação e secreção celular (FOSTER *et al.*, 2009), além de estimular a angiogênese e a proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporcionam um aumento na síntese de colágeno (MARX, 2004).

2.3 Atividade antimicrobiana do PRP

As propriedades antimicrobianas de diversos concentrados plaquetários tem sido demonstrada em humanos contra *Staphylococcus aureus* (BIELECKI *et al.*, 2007; MOOJEN *et al.*, 2008; MARIANI *et al.*, 2014; INTRAVIA *et al.*, 2014, DRAGO *et al.*, 2014) e *Escherichia coli* (BIELECKI *et al.*, 2007) em ensaios clínicos (YUAN *et al.*, 2008) e *in-vitro* (BIELECKI *et al.*, 2007; MOOJEN *et al.*, 2008). Também foi evidenciada a inibição do crescimento *in-vitro* com o uso do PRP contra *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus oralis* (DRAGO *et al.*, 2013, 2014), *S. epidermidis* e *Propionibacterium acnes* (INTRAVIA *et al.*, 2014). Na medicina veterinária equina poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano dos hemocomponentes. O efeito antimicrobiano foi comprovado frente ao *Staphylococcus aureus* sensível à Meticilina e *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (ÁLVAREZ *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014) e *Escherichia coli* (AKTAN *et al.*, 2013).

Até o momento, os componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana dos concentrados de plaquetas permanecem pouco compreendidos. Vários fatores antimicrobianos têm sido propostos, no caso das plaquetas, tem atribuído seu efeito antimicrobiano a proteínas antimicrobianas plaquetárias (PMP), componentes de grânulos- α plaquetários, espécies reativas de oxigênios (EROs) liberadas pelas mesmas e precursores que participam da ativação da via do complemento (BLAIR e FLAUMENHAFT, 2009; AKTAN *et al.*, 2013; DRAGO *et al.*, 2014). Uma hipótese sugerida é que as plaquetas são capazes de se ligar, agregar e internalizar microrganismos, além de apresentarem funções citotóxicas, liberando uma variedade de peptídeos com efeito antimicrobiano direto (TANG *et al.*, 2002; TRIER *et al.*, 2008).

As plaquetas são consideradas sentinelas do sistema vascular devido ao seu elevado número

na circulação e à gama de imunorreceptores funcionais que expressam. As plaquetas expressam uma ampla gama de potenciais receptores bacterianos, incluindo receptores de complemento, receptor de baixa afinidade para fragmentos constantes de imunoglobulina G (FcγRII), receptores *Toll-like*, mas também integrinas convencionalmente descritas na resposta hemostática, como GPIIb-IIIa ou GPIb (HAMZEH-COGNASSE *et al.*, 2015).

Existem três mecanismos de interação entre bactérias e plaquetas que foram descritos: (1) A ligação indireta de bactérias a uma proteína plasmática (fibrinogênio), que por sua vez é um ligante de um receptor plaquetário (GPIIb-IIIa) (OHSHIMA *et al.*, 1991; PETERSEN *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2011); (2) a ligação direta de bactérias a receptores de plaquetas (GPIIb-IIIa ou GPIb) (PLUMMER *et al.*, 2005; BRENNAN *et al.*, 2009; MIAJLOVIC *et al.*, 2010) e (3) a ligação de produtos bacterianos secretados, particularmente toxinas, às plaquetas (ARVAND *et al.*, 1990; BRYANT *et al.*, 2005; FITZPATRICK *et al.*, 2009).

As bactérias se ligam a esses receptores direta ou indiretamente via fibrinogênio, fibronectina, ou receptores de plaquetas. O destino dessas bactérias ligadas às plaquetas é questionado (HAMZEH-COGNASSE *et al.*, 2015). Clawson *et al.* (1975) estudaram a interação entre plaquetas e bactérias, onde ocasionalmente observaram a internalização de *Staphylococcus aureus* em algumas plaquetas. Esses fragmentos derivados do citoplasma dos megacariócitos tem maior capacidade de internalização quando ativadas por um agonista convencional (ADP ou trombina) o que ressalta um mecanismo comum entre ativação plaquetária e internalização (HAMZEH-COGNASSE *et al.*, 2015).

Li *et al.* (2008) confirmaram a internalização de *S. aureus* em plaquetas, mas somente após a ativação desta pelo ADP. O mesmo estudo mostra que *Porphyromonas gingivalis* também pode ser internalizado nas plaquetas. Parece, no entanto, haver um mecanismo diferente de internalização em ação em ambas as bactérias. De fato, o *P. gingivalis* é capaz de induzi-lo sozinho, sem a adição de outro agonista plaquetário, pois os agregados plaquetários são adequados para a internalização da bactéria. Embora o resultado seja o mesmo, é possível que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possam ter mecanismos de internalização diferentes, sugerindo que uma delas tenha uma molécula adicional promovendo sua internalização.

O destino das bactérias internalizadas nas plaquetas permanece em discussão, sendo um meio de defesa do hospedeiro ou um mecanismo de fuga para as bactérias. No entanto, sem progredir para a internalização, a adesão das bactérias ou produtos bacterianos na superfície das plaquetas é suficiente para induzir uma resposta de defesa das plaquetas (HAMZEH-COGNASSE

et al., 2015). A mesma ativação plaquetária ou sua interação com a bactéria faz que as plaquetas tenham a capacidade de interagir com o sistema de complemento. Essa interação pode ser bivalente. Por um lado, as plaquetas podem auxiliar na destruição de bactérias aumentando a atividade do complemento, mas como se ligam às proteínas do complemento, elas próprias podem se tornar alvo da atividade lítica do complemento. Isto é notavelmente o que ocorre no caso de púrpura trombocitopênica (PEERSCHKE e GHEBREHIWET 2010). As plaquetas, no entanto, possuem um inibidor de C1 em seu grânulo α , que, durante a estimulação plaquetária, permitiria a modulação da ativação do complemento (SCHMAIER *et al.*, 1985).

De fato, embora a presença de fagolisossomas não tenha sido demonstrada em plaquetas, eles contêm PMP que se mostraram eficientes em *S. aureus* (YEAMAN 2010). As PMP são liberadas sob a indução de trombina ou pelas mesmas bactérias. Essa família de proteínas foi ampliada através da integração das quinocidinas, que inclui as citocinas plaquetárias que têm efeito bactericida direto. Elas são divididas em dois grupos, α -quinocidinas, que incluem as CXC-citocinas [fator plaquetário 4 (PF-4), proteína básica plaquetária (PBP), peptídeo ativador do tecido conjuntivo (CTAP3) e peptídeo ativador de neutrófilos (NAP2)], enquanto as β -quinocidinas são do tipo CC (RANTES) (YANG *et al.*, 2003).

As quinocidinas estão integradas nos mecanismos da imunidade inata, na medida em que conservam seu papel primário, que é a quimioatração de leucócitos, possibilitando a cooperação entre fatores plaquetários e leucocitários na depuração bacteriana (AGERBERTH *et al.*, 2006; GUANI-GUERRA *et al.*, 2010).

Além de todos esses mecanismos antibacterianos plaquetários estudados, os leucócitos também foram estudados como fator envolvido no efeito antimicrobiano dos concentrados plaquetários. Segundo Ciešlik-Bielecka *et al.* (2018) o efeito antibacteriano em um plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP) é causado por leucócitos, pois encontraram uma relação entre o aumento dos subtipos de leucócitos (Linfócitos T reguladores CD25, linfócitos T citotóxicos e *Células Natural Killer*) e o diâmetro da zona de inibição pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Os mesmos autores encontraram ainda uma associação negativa entre contagens aumentadas de monócitos e a atividade antimicrobiana.

D'asta *et al.* (2017) em uma revisão sistemática referente à contribuição dos leucócitos no efeito antimicrobiano nos concentrados plaquetários, não encontram evidência suficiente para atribuir esse efeito à presença de leucócitos nos hemocomponentes. Um dos fatores para afirmar isso foi que em estudos comparativos entre PRP e L-PRP *in-vitro* (LÓPEZ *et al.*, 2014; MARIANI

et al., 2014) ambos foram efetivos, mas não apresentaram diferença significativa em seu efeito antimicrobiano. No entanto, buscando resultados em cepas bacterianas específicas, Anitua *et al.* (2012b) mostraram que seu hemoderivado com concentração mais alta de leucócitos (quase quatro vezes a linha de base) foi a única preparação capaz de reduzir efetivamente o *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA). Além disso, Intravia *et al.* (2014) relataram que as preparações de L-PRP (com alta concentração de leucócitos) foram superiores ao PRP (sem leucócitos) contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermis* sensível à meticilina (MSSE) e *Propionibacterium acnes*. Também em comparação com o sangue total, ambas as preparações limitaram o crescimento bacteriano, mas para MSSA o L-PRP mostrou uma inibição mais longa (24 horas de duração). Além disso, López *et al.* (2014) mostraram que a preparação não ativada enriquecida com leucócitos apresentou melhor efeito bacteriostático contra MSSA (em 6 e 24 horas) em comparação com preparações pobres em leucócitos. Em contraste, a forma ativada da preparação com leucócitos parecia ter um desempenho melhor do que as outras preparações testadas em 24 horas contra MRSA.

Embora haja controvérsia nesses estudos *in-vitro* sobre o papel que tem os leucócitos na atividade antimicrobiana dos CPs, se sabe que *in vivo*, os leucócitos em especial os neutrófilos e macrófagos são responsáveis pela fagocitose de patógenos estranhos. Esse sistema parece representar uma das defesas mais importantes do hospedeiro contra infecção (MOOJEN *et al.*, 2007). Os neutrófilos secretam peptídeos antimicrobianos: lactoferrina, defensinas, proteína bactericida que aumenta a permeabilidade, azurocidina/proteína de ligação à heparina, catelicidinas, fosfolipases A2 e calprotectina (CIESLIK-BIELECKA *et al.*, 2008), que desempenham os papéis mais importantes na defesa imune. Essas moléculas desempenham papéis biológicos que não são apenas antibacterianos, mas também antivirais, antiparasitários e antifúngicos. Essas proteínas antimicrobianas destroem os micróbios usando cargas positivas, o que permite que se liguem à superfície carregada negativamente da célula alvo (UVELL e ENGSTRÖM 2007). Ao interagir com o corpo celular de bactérias gram-negativas, as proteínas antibacterianas reagem com lipopolissacarídeos, mas para bactérias gram-positivas, as proteínas reagem com ácido teicóico e peptidoglicano, suportando íons bivalentes (LOHNER, 2017; MISTOU *et al.*, 2016; MALANOVIC e LOHNER 2016)

Os neutrófilos também são ricos em grânulos contendo mieloperoxidase (MPO), que é liberado nos tecidos após ativação e degranulação. A MPO catalisa a oxidação do cloreto para gerar ácido hipocloroso e outros derivados reativos de oxigênio. Essas substâncias atuam como potentes oxidantes bactericidas e são tóxicas para micro-organismos e fungos (ARTANI, 2018).

Outro fator antimicrobiano do PRP estudado é o plasma e seus componentes como o complemento que é conhecido por desempenhar um papel importante na imunidade inata (DAHA, 2010). Drago *et al.* (2014) testaram diversos produtos como PRP concentrado em 2 e 4 vezes (PRP x2, PRP x4), plaquetas suspensas em tampão fosfato salino (PBS) e plasma pobre em plaquetas (PPP) frente a *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis* e *Staphylococcus aureus*, onde o grupo de concentrado de plaquetas suspenso em PBS não mostrou nenhuma atividade antibacteriana, e os outros grupos, PRP x2, PRP x4 e PPP inibiram o crescimento de todas as cepas testadas. Com esses resultados foi observado ainda que a atividade antimicrobiana do PRP não está associada só à concentração de plaquetas, uma vez que compararam duas concentrações diferentes e não houve diferença entre elas. Além disso esses resultados sugerem que a atividade antimicrobiana dos concentrados plaquetários é sustentada por uma cooperação de fatores derivados das plaquetas e os componentes do plasma, como o sistema de complemento que é um elemento do sistema imunológico essencial para os mecanismos de defesa humoral contra agentes infecciosos. A ativação da cascata do complemento determina a lise celular bacteriana e o recrutamento de leucócitos (VARSHNEY, 2019).

Burnouf *et al.* (2013) tentaram entender melhor quais componentes dos concentrados de plaquetas podem apresentar atividade antimicrobiana, testando amostras antes e após a inativação térmica do complemento plasmático a 56° C por 30 minutos. A ausência de qualquer inibição bacteriana por qualquer um dos componentes do plasma e das plaquetas, tratados termicamente, apoiou a hipótese de que o complemento plasmático (e/ou outros compostos sensíveis ao calor) desempenhava o papel principal nas propriedades bacteriostáticas dos concentrados de plaquetas.

A atividade antimicrobiana dos concentrados plaquetários está influenciada também pelo método de ativação deles. Ainda sejam controversos os resultados das possíveis relações entre esse efeito e a ativação das preparações, Drago *et al.* (2014) observaram que seus concentrados plaquetários sem ativação, não inibiram o crescimento das bactérias testadas *in-vitro*, sugerindo que a ativação da coagulação é uma etapa fundamental deste processo biológico. Burnouf *et al.* (2013) sugeriram que a ativação de plaquetas pelo cloreto de cálcio diminuiu as propriedades antimicrobianas contra cepas bacterianas selecionadas. Da mesma forma, Wu *et al.* (2013) mostraram que as preparações de PRP ativado por trombina têm menor atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em comparação com as preparações inativadas. Acredita-se que esses achados sejam devidos ao consumo de complemento durante a ativação da coagulação (BURNOUF *et al.*, 2013). Também López *et al.* (2014) indicaram que após 24 horas de incubação, as preparações de PRP ativado por gluconato de cálcio exibiram menos atividade

antimicrobiana contra MSSA em comparação com as preparações inativadas. Quando as preparações foram testadas contra MRSA em 6 horas, o efeito antimicrobiano mais forte contra MRSA foi exercido pela forma não ativada da preparação enriquecida com leucócitos. Controversamente outros estudos indicam que o PRP ativado com trombina leva à um aumento significativo da atividade inibitória sobre as bactérias (AKTAN *et al.*, 2013; CHENG *et al.*, 2013).

2.4 Microbiologia do crescimento bacteriano

Uma população microbiana em crescimento ativo, em meio nutritivo, constitui uma cultura (LARPENT e GOURGAUD, 1975). Após crescimento os micro-organismos agrupa-se em colônias (grupo de células que podem ser visualizadas sem a utilização de um microscópio). Essas colônias são formadas por uma célula viável, que é definida como aquela capaz de dividir-se, originando células filhas, e, na maioria das situações de contagens de células, são as células de maior interesse (MADIGAN *et al.*, 2016). Para o crescimento microbiano são necessárias uma combinação de nutrientes e certas condições que podem ser divididas em físicas e químicas (ALVES, 2006; PELCZAR *et al.*, 1997).

2.4.1 Condições físicas e químicas

Dentro das condições físicas necessárias para um cultivo bem-sucedido, encontra-se: a temperatura, o potencial hidrogeniônico (pH) e a pressão osmótica. A taxa de crescimento, que se traduz no número de divisões celulares por um devido tempo, está associada a temperaturas favoráveis. Os micro-organismos são classificados em três grupos primários de acordo com as variações de temperatura de crescimento (TORTORA *et al.*, 2017):

- Psicrófilos: Crescem a baixas temperaturas (Micro-organismos que podem crescer entre 0°C a 25°C).
- Mesófilos: Crescem a temperaturas moderadas (Micro-organismos que podem crescer entre 25°C a 40°C).
- Termófilos: Crescem em altas temperaturas (Micro-organismos que podem crescer entre 50°C a 60°C).

O pH influencia o meio físico de um micro-organismo pois, a maioria deles cresce bem em meios com uma faixa de pH entre 6,5 a 7,5, ainda que muitas espécies tolerem variações entre 4 a 9 (ALVES, 2006).

A pressão osmótica também exerce um papel importante no crescimento microbiano

influenciando o meio físico de um micro-organismo. A pressão osmótica é a força com a qual a água se move através da membrana citoplasmática de uma solução contendo uma baixa concentração de substâncias dissolvidas (solutos) para outra contendo uma alta concentração de solutos. Os meios de cultura com pressões osmóticas inferiores às do interior da bactéria, geralmente não afetam sua viabilidade, uma vez a rigidez da parede celular impede a entrada excessiva de água (TRABULSI e ALTHERTUM, 2015).

O conhecimento das necessidades nutricionais dos micro-organismos é importante para seu cultivo. As bactérias necessitam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes. Esses elementos são necessários tanto para a síntese como para funções normais dos componentes celulares. Os principais elementos químicos para o crescimento das células incluem carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo (TORTORA *et al.*, 2017).

2.4.2 Meios de cultura e método de contagem em placa

A sobrevivência dos micro-organismos depende do fornecimento adequado de nutrientes e condições favoráveis para seu crescimento. Os meios de cultura definem-se como uma solução nutriente utilizada para promover o crescimento de micro-organismos (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os meios de cultura podem ser líquidos, semissólidos ou sólidos. Um meio líquido sem agente solidificante é chamado de caldo nutritivo. O caldo nutritivo combinado com o agente solidificante, geralmente ágar, cria um meio semissólido ou sólido. O ágar é um extrato de algas marinhas, ele contém um carbo-hidrato complexo, na sua maioria, galactose e possui muito valor nutritivo. Ele é um excelente agente solidificante porque se liquefaz a 100°C e solidifica a 40°C. Devido a estas propriedades os micro-organismos podem ser cultivados a temperaturas de 37°C (ALVES, 2006).

Para o crescimento de micro-organismos em laboratórios há uma variedade de meios de cultura. Os mais utilizados na microbiologia são os meios definidos e meios complexos. Os meios definidos são preparados pela adição precisa de compostos químicos inorgânicos ou orgânicos, tendo uma composição exata e conhecida. Quando a composição do meio não é bem definida e se empregam componentes como produtos microbianos, animais e vegetais, ou várias substâncias nutritivas, esses meios são chamados de complexos (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA *et al.*, 2017).

Em situações particulares, especialmente na microbiologia diagnóstica, frequentemente os meios de cultura são produzidos de modo a tornar-se seletivos ou diferenciais (ou ambos). Sua

elaboração surge pela necessidade de determinar a presença de micro-organismos específicos associados a doenças ou com condições de pouca sanidade (TRABULSI e ALTHERTUM, 2015).

Os meios seletivos são elaborados para impedir o crescimento de bactérias indesejadas e favorecer o crescimento dos micro-organismos de interesse; por exemplo o ágar Sabouraud dextrose, com pH de 5,6, é utilizado para isolar os fungos que superam a maioria das bactérias neste pH (PELCZAR *et al.*, 1997). Os meios diferenciais facilitam a diferenciação das colônias de organismos desejados em relação a outras colônias crescendo na mesma placa; o ágar-sangue (que contém hemácias) é um meio utilizado com frequência pelos microbiologistas para identificar espécies bacterianas que destroem hemácias (SOUZA, 2008).

O método mais frequentemente utilizado para a mensuração de populações bacterianas é a contagem em placas ou também chamado contagem de células viáveis. O procedimento de contagem de células viáveis infere que cada célula viável é capaz de crescer e dividir-se, originando uma colônia. Assim, o número de colônias e o número de células são proporcionais. Uma desvantagem desse método é que são necessárias 24 horas ou mais para que colônias visíveis sejam formadas (MADIGAN *et al.*, 2016; TRABULSI e ALTHERTUM, 2015).

Tortora *et al.*, (2017) afirmam que não sempre essas células viáveis, originam por se só uma colônia, pois as bactérias frequentemente crescem unidas em agregados ou cadeias. Para refletir essa realidade, as contagens em placas são frequentemente reportadas como unidades formadoras de colônias (UFC).

Quando é efetuada uma contagem de colônias em placa, é importante que somente um número limitado de colônias se desenvolva na placa. Tendo excesso de colônias, algumas células são reprimidas e não podem se desenvolver, essas condições causam imprecisão na contagem. Uma recomendação pelos microbiologistas é a contagem de placas com somente 25 a 300 UFC. Para garantir que as contagens de colônias estejam nessa faixa, o inóculo inicial é diluído várias vezes, em um processo chamado de diluição seriada (ALVES, 2006).

Existem dois métodos de preparação das placas para contagem, método de incorporação em placa ou também chamado (Pour plate) e método de espalhamento em placa (PELCZAR *et al.*, 1997).

O método de incorporação em placa é feito com 1 ml a 0,1 ml das diluições da suspensão bacteriana, onde é introduzido na placa de Petri. O meio ágar é mantido em fase líquido a 50°C, e vertido sobre a amostra, que é então misturada com o meio por agitação lenta da placa. Quando o

ágar solidifica, a placa é incubada. Essa técnica tem algumas desvantagens, pois os microorganismos sensíveis a temperaturas altas podem ser danificados pelo ágar fundido, sendo incapazes de formar colônias. Além disso, o observar a aparência diferenciada da colônia na superfície é essencial para fins diagnósticos. As colônias que se formam abaixo da superfície da placa por incorporação não são adequadas para este teste (TRABULSI e ALTHERTUM, 2015).

O método de espalhamento em placa é muito mais efetivo e, porém, aplicado com mais frequência. Para esse método é colocado um inóculo de 0,1 ml das diluições da suspensão bacteriana, adicionando na superfície de um meio ágar previamente solidificado. O inóculo é espalhado de modo uniforme na superfície do meio com uma alça driglasky ou bastão de vidro, esterilizados (TORTORA *et al.*, 2017).

2.4.3 Espectrofotometria

Durante o crescimento bacteriano exponencial, todos os componentes celulares aumentam proporcionalmente. Um desses componentes é a massa celular. As células dispersam luz, e um método rápido e bastante útil para estimar a massa celular é a turbidez (MADIGAN *et al.*, 2016). A turbidez é a habilidade das partículas em suspensão para desviar radiação eletromagnética (BARON *et al.*, 1994).

O aparelho utilizado para mesurar a turbidez é o espectrofotômetro. No espectrofotômetro, um feixe de luz é transmitido através de uma suspensão bacteriana até um detector fotossensível. É uma das técnicas mais simples e frequentemente empregadas para culturas líquidas (KULSTAD *et al.*, 2004). Essa luz transmitida pelo prisma ou grade de difração deve ter um comprimento de onda específico. Os componentes de onda normalmente utilizados para medir turbidez bacteriana incluem 480 nm (azul), 540 nm (verde), 600 nm (cor de laranja) e 660 nm (vermelho). A sensibilidade é maior nos comprimentos de onda mais curtos, porém as medidas de suspensões celulares densas são mais precisas com o uso de comprimentos de onda mais longos. A unidade de medida da turbidez corresponde à densidade óptica (DO) no comprimento de onda especificado, como por exemplo, DO 540 para medidas de densidade óptica a 540 nm (TORTORA *et al.*, 2017).

A técnica utiliza a propriedade das soluções de absorver ou transmitir a luz para quantificar reações. Na prática, a quantidade de luz absorvida ou transmitida é proporcional à concentração da substância em solução (DIAZ *et al.*, 2016). A transmitância exprime a fração da energia luminosa que consegue atravessar uma determinada espessura de um material, sem ser absorvida. Ou seja, a capacidade de transmitir a luz. Por outro lado, a absorvância exprime a fração da energia luminosa que é absorvida por uma determinada espessura de um material. Ou seja, a capacidade de absorver

a luz. A absorvância de uma solução está relacionada com a transmitância. Quando a absorvância de uma solução aumenta, a transmitância diminui (XAVIER *et al.*, 2016).

2.5 Conjuntiva ocular e sua microbiota

A superfície ocular é formada pela conjuntiva bulbar, superfície das pálpebras inferior, superior e terceira pálpebra, com suas respectivas conjuntivas, limbo, epitélio da córnea e filme lacrimal (SILVA, 2014; OLIVEIRA, 2019).

A conjuntiva é uma delgada membrana mucosa, móvel, semitransparente, úmida, brilhante e ricamente vascularizada que recobre toda a superfície interna palpebral (conjuntiva palpebral), a esclera (conjuntiva bulbar) e toda a terceira pálpebra. O espaço formado entre a conjuntiva palpebral e bulbar é chamada de saco conjuntival (BROOKS, 2005; LEITES *et al.*, 2013; NETO, 2016). Histologicamente a conjuntiva palpebral é revestida por um epitélio colunar pseudoestratificado superficial, células caliciformes, cápsula de tenon e um epitélio escamoso estratificado não queratinizado que reveste a conjuntiva bulbar. (CARASTRO, 2004; GILGER, 2005).

A conjuntiva é uma estrutura resistente e altamente regenerativa que desempenha um papel na dinâmica lacrimal, na proteção imunológica do olho, nos movimentos oculares e na cicatrização da córnea, onde é usada com frequência para tratar lesões ulcerativas. (CARASTRO, 2004; NETO, 2016).

Entre os mecanismos de proteção da superfície ocular encontram-se as pálpebras que através do reflexo de piscar, realizam a proteção mecânica contra corpos estranhos e a remoção regular de partículas estranhas, restos celulares e bactérias. O filme lacrimal tem em sua composição macrófagos e substâncias bactericidas (lisozima, lactoferrina, fosfolipases e imunoglobulinas A), e efetua a remoção de debris e células esfoliativas através da drenagem (OLIVEIRA, 2019).

A conjuntiva está continuamente exposta a bactérias, fungos e vírus presentes no ambiente (SANTOS, 2011), mas nem todos os microrganismos adaptam-se ao colonizar um hospedeiro. Alguns falham em estabelecer uma interação e outros podem colonizar por períodos variáveis. Por isso, essa microbiota pode ser classificada em: microrganismos residentes, transitórios e patogênicos (HERITAGE *et al.*, 2003). A microbiota residente consiste em microrganismos não invasivos que conseguem se estabelecer por um período longo e indefinido, habitando a conjuntiva e a córnea. A formação desta microbiota residente se inicia no momento do parto, a partir de então será composta principalmente por microrganismos da pele e trato respiratório superior (OLIVEIRA, 2019). A microbiota transitória, são aqueles agentes que são adquiridos do meio ambiente que cerca o hospedeiro, em geral esses microrganismos não conseguem estabelecer uma colonização efetiva,

seja por competição com outros organismos ou por não conseguir superar o sistema de defesa do hospedeiro (HERITAGE *et al.*, 2003). Para conseguir classificar os micro-organismos em residentes ou transitórias, devesse realizar várias culturas, em diferentes períodos (SANTOS, 2011).

A maioria dos organismos da microbiota conjuntival não é considerada patogênica desde que haja a integridade da conjuntiva e do epitélio da córnea. Se ocorrer a quebra da barreira de proteção da superfície ocular, como uma abrasão da córnea, microrganismos residentes e transitórios podem infiltrar no estroma córneo e resultar em uma úlcera de córnea ou ainda, em casos de lesão da conjuntiva, causar uma conjuntivite bacteriana (ANDREW *et al.*, 2003).

A microbiota bacteriana ocular do equino tem predominância de microrganismos não patogênicos, principalmente as Gram-positivas aeróbicas (KHOSRAVI *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2019) *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* e *Corynebacterium spp.* (ANDREW *et al.*, 2003; JOHNS *et al.*, 2011; BARAN *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2015; HAMPSON *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2019). Espécies de bactérias Gram-negativas e fungos também são considerados normais, porém são tidos como microrganismos transitórios (ANDREW *et al.*, 2003). Pode-se ainda encontrar Gram-negativas potencialmente patogênicas, como *Pseudomonas spp.* (JOHNS *et al.*, 2011). Entre os fungos, os mais frequentes são *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.* e *Penicillium spp.* (ANDREW *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2011; BARAN *et al.*, 2015; HAMPSON *et al.*, 2018). Leveduras também podem ser encontradas em algumas regiões (KHOSRAVI *et al.*, 2014).

2.5.1 *Staphylococcus sciuri*

Staphylococcus sciuri é uma das espécies bacterianas mais primitivas do gênero *Staphylococcus*, que atualmente compreende mais de 50 espécies e subespécies (NEMEGHAIRE *et al.*, 2014a). *S. sciuri* foi descrito pela primeira vez por (KLOOS *et al.*, 1980) quando cepas foram isoladas da pele de animais e humanos. Esse micro-organismo é coagulase-negativa, oxidase-positiva, resistente a novobiocina e oxacilina (metecilina) (BEIMS *et al.*, 2016); principalmente associada a animais, comumente presente na pele e superfícies mucosas. Além de encontra-se em uma ampla variedade de animais de estimação e animais de fazenda e selvagens (STEPANOVIC *et al.*, 2001; HAUSCHILD *et al.*, 2003), também é isolada em alimentos de origem animal (GARCIA *et al.*, 2002; PAPAMANOLI *et al.*, 2002) e no ambiente, como solo, areia, água e grama do pântano (KLOOS, 1980).

Embora *Staphylococcus sciuri* tenham se mostrado patógenos facultativos, esse micro-organismo possui alguns fatores de virulência que tem atividade (lipofílica, proteolítica ou

hemolítica) semelhantes às de outros estafilococos envolvidos em processos patogênicos como o *S. aureus* (STEPANOVIC *et al.*, 2001). Outros fatores de virulência estão tipicamente relacionados a outros estafilococos como enterotoxinas (de *S. aureus*) ou a toxina esfoliativa C (de *S. hyicus*).

Nemeghaire *et al.*, (2014a) demonstrou em uma revisão profunda sobre *S. sciuri* a capacidade desses micro-organismos carregar uma grande variedade de genes antimicrobianos e de virulência, indicando que essa espécie bacteriana contém um grande reservatório de genes trocáveis por transferência horizontal com outros estafilococos e outros gêneros bacterianos, o que pode fortalecer ainda mais o potencial patogênico dessas bactérias.

Porém seja uma bactéria com baixas taxas de isolamento nasofaringe, pele e trato urogenital na espécie humana, sua relevância clínica está aumentando, já que foi isolada em infecções, como endocardite (HEDIN e WIDERSTROM, 1998), peritonite (WALLET *et al.*, 2000), choque séptico (HORII *et al.*, 2001), infecção do trato urinário (STEPANOVIC *et al.*, 2003), doença inflamatória pélvica (STEPANOVIC *et al.*, 2005) e mais frequentemente em infecções de feridas (KOLAWOLE *et al.*, 1997; SHITTU *et al.*, 2004; STEPANOVIC *et al.*, 2002).

Na medicina veterinária o *S. sciuri* tem sido associada a vários casos de mastite bovina (LÜTHJE e SCHWARZ, 2006; NAM *et al.*, 2010; FREY *et al.*, 2013), bem como em caprinos que sofrem o vírus da peste de pequenos ruminantes ou também chamada “peste des petites ruminants” (PPR) (UGOCHUKWU e AGWU, 1991), em dermatite canina (HAUSCHILD e WÓJCIK, 2007; HAUSCHILD *et al.*, 2010), em surtos de epidermite exsudativa fatal em leitões (CHEN *et al.*, 2007; NEMEGHAIRE *et al.*, 2014b) e em ferida de pele de equino (BEIMS *et al.*, 2016).

Curiosamente Moodley e Guardabassi (2009) e Aslantas *et al.*, (2012) relataram uma transmissão entre animais domésticos saudáveis colonizados com *S. sciuri* foi observada repetidamente, o que respalda a hipótese de que pelo fato de ser uma bactéria que de vida livre a colonização desta bactéria na pele ou mucosas dos animais, pode ser promovida por insetos servindo como vetores de transmissão. Ao respeito, um relatório também sugeriu que a possível fonte de colonização de *S. sciuri* em feridas cirúrgicas pode ser moscas pousando em feridas abertas (KOLAWOLE e SHITTU, 1997). Assim, assume-se que o contato frequente com animais domésticos e de fazenda saudáveis pode também contribuir para uma colonização pelo menos temporária da pele e, posteriormente, das feridas, por *S. sciuri* (KLOOS, 1980; NEMEGHAIRE *et al.*, 2014b).

O gênero *Staphylococcus* é relatado sempre como 1º ou 2º gênero mais frequente da microbiota conjuntival equina, com ocorrências acima de 18%. Sua espécie *Staphylococcus sciuri* encontra-se dentro das bactérias mais predominantes dentro do gênero (ANDREW *et al.*, 2003; JOHNS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; HAMPSON *et al.*, 2018). Sendo este também uma das principais espécies envolvidas em alterações oculares em equinos (WADA *et al.*, 2010; KELLER; HENDRIX, 2005).

2.5.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo patógeno, multirresistente, coagulase – positivo, que é uma das causas mundiais mais frequentes de morbidade e mortalidade por agente infeccioso (CHEUNG *et al.*, 2021). No decorrer da história, esse patógeno adquiriu sua importância devido à ocorrência frequente de resistência a antibióticos em isolados, entre os quais *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) são os mais importantes clinicamente (CHEUNG *et al.*, 2021). Porém infecções causadas por *S. aureus* sensível à meticilina (MRSA), podem ter alta virulência, causando infecções fatais (BONESSO *et al.*, 2016; BOUILLER *et al.*, 2020).

A resistência a outros antibióticos também é comum em *S. aureus*. Por exemplo, a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos tradicionais (penicilina e derivados) que são sensíveis à beta-lactamase é praticamente onipresente em *S. aureus* (LOWY, 2003). Além disso, o *S. aureus* pode apresentar, muitas vezes na forma combinada, resistência a quase todos os antibióticos disponíveis.

Em contraste com muitos outros patógenos bacterianos, que muitas vezes dependem de apenas uma ou algumas toxinas para promover doenças, o *S. aureus* produz uma impressionante variedade de fatores de virulência. Estes incluem uma infinidade de toxinas e fatores de evasão imune, e uma vasta gama de fatores proteicos e não proteicos que permitem a colonização do hospedeiro durante a infecção (CHEUNG *et al.*, 2021).

Dentro de seus mecanismos de virulência mais importantes se encontra uma proteína chamada coagulase que permite a conversão de fibrinogênio a fibrina, interagindo com proteína de ligação ao fator de von Willebrand, que se liga à protrombina (fator II da cascata de coagulação), formando um complexo denominado estafilotrombina (FRIEDRICH *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2010) que em seguida, usa proteínas de ligação ao fibrinogênio, como o fator de agregação (A) para aderir aos coágulos de fibrina e formar agregados bacterianos contendo fibrina (MCADOW *et al.*, 2011). Esta membrana de fibrina faz que a bactéria por meio deste mecanismo possa resistir a

fagocitoses (BURNOUF *et al.*, 2013; CHEUNG *et al.*, 2021).

Outra das particularidades deste micro-organismo é a interação que realiza com as plaquetas. O *S. aureus* se liga com as plaquetas, diretamente pelo receptor de plaquetas (GPIIb-IIIa ou GPIb) (PLUMMER *et al.*, 2005; BRENNAN *et al.*, 2009; MIAJLOVIC *et al.*, 2010) ou indiretamente via fibrinogênio, que a sua vez é um ligante do receptor plaquetário (GPIIb-IIIa) (OHSHIMA *et al.*, 1991; PETERSEN *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2011). Trier *et al.* (2008) avalio a resposta antiestafilocócica plaquetária, onde reportaram que a ligação dos estafilococos com as plaquetas humanas ou de coelho lavadas *in-vitro* afeta a velocidade e a extensão da agregação plaquetária induzida por *S. Aureus*.

O gênero *Staphylococcus* são das bactérias mais estudadas, com o potencial de causar infecção em diversos tecidos do corpo. Na microbiota ocular equina é relatado sempre como 1º ou 2º gênero, com ocorrências acima de 18%. Além disso este gênero também faz parte dos agentes patológicos junto com os *Streptococcus* nos casos de ceratite ulcerativa em cavalos. Sendo o *Staphylococcus aureus* o agente patológico mais prevalente nos isolados (VERCRUYSSSE *et al.*, 2022).

3. MATERIAIS E METODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão Ética de Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o número de protocolo 231/2020 (Anexo 1). O experimento foi realizado na Escola de Veterinária, utilizando a estrutura dos laboratórios da unidade multidisciplinar de pesquisa animal (MULTILAB) no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (Anexo 2), no Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO), no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (Anexo 3) e no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais de Tração (LEPET), no Hospital Veterinário.

3.1 Animais

Para a produção do PRP, foram utilizados 8 animais jovens a adultos (4-13 anos) hípidos, da raça Quarto de milha (QM) (4 machos e 4 fêmeas) da região Ribeirão das Neves - Minas Gerais, abrigados em propriedade rural distante a 40 km (35 minutos) da Escola de Veterinária da UFMG. Os animais permaneceram na propriedade, em baias de 4 x 4m, com cama de maravalha de madeira, água *ad libitum*, sal mineral e alimentação a base de feno de gramínea e concentrado. Em nenhum momento do experimento, os animais foram retirados do seu ambiente de origem nem da sua rotina. Os critérios de exclusão no estudo foram: alterações no exame físico inicial, uso de recente de anti-inflamatórios e antibióticos (nos 7 dias anteriores), doença sistêmica recente ou viagem no último

mês.

No exame físico inicial, foram avaliados parâmetros como: comportamento, postura, condição física, condição corporal, anormalidades anatômicas, frequência respiratória, frequência cardíaca, pulso, temperatura retal, tempo de preenchimento capilar, cor das mucosas (oral, ocular e nasal), presença de linfonodos reativos, auscultação (cardíaca, respiratória e digestiva). Nenhum dos animais apresentou qualquer alteração. Além disso, todos os proprietários dos animais envolvidos no estudo receberam e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para permitir a coleta do material.

3.2 Coleta e processamento do PRP

Para a extração de sangue e processamento do PRP, foi utilizado um protocolo adaptado de ARGUELLES *et al.* (2006). Foi realizada coleta asséptica de sangue por venopunção da veia jugular externa, por meio do sistema de tubo a vácuo, com agulha vacutainer de 22 G (BD Vacutainer®) e tubos a vácuo (Biocon®). Em cada coleta, um total de 37 tubos por animal, extraíndo um volume de 130,6 ml de sangue por animal. Uma amostra foi coletada em um tubo de 1,0 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para realização do hemograma inicial. Essa amostra forneceu as seguintes informações de cada indivíduo: concentração plaquetária, contagem de hemácias e leucócitos. Em seguida, coletou-se 36 tubos de 3,6 ml com 3,2% de citrato de sódio (CIT) por animal, para posteriormente confeccionar o *pool* de PRP. As amostras foram homogeneizadas por inversão manual lenta dos tubos.

O sangue coletado em tubos com CIT foi processado utilizando-se protocolo de dupla centrifugação. Na primeira etapa, o sangue foi transferido para tubos falcon estéreis de 15 ml para otimizar o tempo de processamento e imediatamente centrifugado (*CENTRIBIO 80-2B®*, Biovera, Brasil), utilizando-se 120 g por 5 min com um repouso posterior de 10 min em posição vertical. A primeira fração de plasma sobrenadante (50%) foi aspirada desde a parte mais superficial para evitar o turbilhonamento das plaquetas e logo depois foi descartada. Os outros 50% de plasma foram aspirados à 4 mm acima da capa leucocitária com auxílio de pipeta graduada de até 1 ml e micropipeta de 200 μ L. Essa fração foi transferida para outros tubos falcon estéreis de 15 ml, sendo todo o processamento realizado sob condições assépticas, sob capela de fluxo laminar. Após a segunda centrifugação, realizada a 240 g por 5 min com repouso posterior de 10 min em posição vertical, descartou-se 75% da primeira fração da mesma forma que na primeira centrifugação. Os 25% restantes foram pipetados para dissolução do pellet formado na porção final do tubo. Esta última fração foi considerada como PRP após a contagem plaquetária final acima de 300.000/ μ L,

conforme o descrito por (YAMADA *et al.*, 2012; ANITUA *et al.*, 2004). Também foi realizada a contagem de hemácias e leucócitos por hemocítômetro de impedância (*Icounter Vet®*, DIAGNO, Brasil).

Finalmente, o PRP de cada indivíduo foi transferido a um Becker de polipropileno para obter um único *pool* de todos os animais, obtendo uma quantidade final de 66 ml de PRP. A partir desse *pool*, foi separada mais uma alíquota para obtenção da concentração plaquetária, da contagem de hemácias e de leucócitos em hemocítômetro de impedância do *pool*.

3.3 Preparação das Bactérias e inóculo

As cepas de *Staphylococcus sciuri* se encontravam armazenadas a -80°C , no setor da Medicina Preventiva da UFMG (Laboratório de Bacteriologia). As cepas utilizadas fazem parte de um banco de bactérias coletadas diretamente de olhos de cavalos hípidos (Oliveira, 2019), não se tratando de cepas padrão. Optou-se por utilizar essa bactéria por esse ter sido o agente mais isolado em animais saudáveis da região metropolitana de Belo Horizonte, que podem, portanto, ter importância clínica nas afecções oculares de equinos. Pela possível variabilidade individual das cepas, optou-se por trabalhar com seis cepas isoladas de diferentes animais, conservadas em caldo BHI + Glicerina para a replicação. Vinte e quatro horas antes de começar o estudo, as bactérias foram descongeladas por 20 minutos à -21°C , depois 10 minutos à 4°C e logo retiradas para ser totalmente descongeladas à temperatura ambiente e serem replicadas diretamente do caldo para as placas de petri com ágar sangue de equino 5%, sob condições assépticas, sob capela de fluxo laminar, sendo cultivadas por 24 horas a 37°C . Após o tempo de cultivo, observou-se suas características morfológicas descritas em placa, onde todas revelaram crescimento de colônias uniformes, não hemolíticas, brancas opacas, cumprindo com sua descrição (BEIMS *et al.*, 2016). Não foi necessário fazer teste de identificação, posto que estas bactérias foram isoladas em colônias purificadas e identificadas pelo método “matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight” MALDI-TOF (OLIVEIRA, 2019). Com o fim de garantir a confiabilidade dos resultados e a reprodutibilidade da experimentação (DRAGO *et al.*, 2013; D’ASTA *et al.*, 2017), utilizou-se simultaneamente uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* “American Type Culture Collection” (ATCC 29213), que passou por todas as etapas descritas para o *Staphylococcus sciuri*.

Para chegar à concentração desejada do inóculo para o estudo (1×10^5 UFC/ml), foi extraída uma alça das colônias de cada cepa bacteriana replicada na placa de petri e colocada em PBS 0,90%. Considerou-se a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml toda solução com densidade óptica de 0,5 na escala de McFarland. Dessa solução, foram extraídos 100 μL de cada tubo com PBS 0,90% da

solução inicial de bactérias e transferidos para um tubo Falcon com 15 ml de BHI, para chegar a uma concentração bacteriana de 1×10^6 UFC/ml. A partir dessa última diluição, foram transferidos 400 μ L para cada tubo experimental, cujo volume final foi de 4 ml para ter uma concentração final do inóculo de 1×10^5 UFC/ml.

3.4 Desenho do estudo e ensaio antibacteriano *in-vitro*

Para a determinação da ação antimicrobiana do PRP na microbiota ocular, foram testadas seis cepas de *Staphylococcus sciuri* coletadas por meio de um *swab* estéril no fórnice conjuntival inferior de diferentes animais e identificada pelo método “matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight” MALDI-TOF por Oliveira (2019).

Avaliou-se pelo método de macro-diluição em tubos com caldo de cultivo “Brain heart infusion” (BHI) (Brain heart infusion Broth®, KASVI, Brasil), a concentração mínima inibitória (MIC) para todos os tempos e amostras sendo inspecionados visualmente, conforme os padrões estabelecidos pelo “National Comite for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS) (2003). Para o estudo, se incluíram seis cepas de *Staphylococcus sciuri*, denominadas C1, C2, C3, C4, C5, C6, e uma cepa padrão (CP) de *Staphylococcus aureus* “ATCC 29213” que foi incluída como controle do experimento. Para cada cepa, se estabeleceram quatro controles (Controle negativo, controle PRP, controle positivo e controle ATB) onde um deles (Controle ATB) testou-se 3 posologias (1 μ L/ml; 0,5 μ L/ml; 0,25 μ L/ml) de Eritromicina purificada para teste de sensibilidade de antibiótico (Drogavet®, Brasil) determinadas como a MIC por (BEIMS *et al.*, 2016) para *Staphylococcus sciuri*, e conforme os padrões estabelecidos pelo “NCCLS” 2003 para *Staphylococcus aureus* “ATCC 29213”. Além dos controles, se estabeleceram cinco diluições experimentais do produto, neste caso PRP junto ao caldo BHI e 400 μ L de bactéria, conforme demonstrado na Figura 1.

Grupos experimentais	Conteúdo
(1) Controle Negativo	4 ml BHI
(2) Controle PRP	2 ml BHI + 2 ml PRP
(3) Controle Positivo	3,6 ml BHI + 400 μ L Bactéria
(4) Controle ATB	BHI + 400 μ L Bactéria + A) 1 μ L/ml; B) 0,5 μ L/ml; C) 0,25 μ L/ml.
(5) Diluição 1:1	3,6 ml PRP + 400 μ L Bactéria

(6) Diluição 1:2	1,6 ml BHI + 2 ml PRP + 400 µL Bactéria
(7) Diluição 1:4	2,6 ml BHI + 1 ml PRP + 400 µL Bactéria
(8) Diluição 1:8	3,1 ml BHI + 0,5 ml PRP + 400 µL Bactéria
(9) Diluição 1:16	3,35 ml BHI + 0,25 ml PRP + 400 µL Bactéria
Fonte: Torres, 2022.	

Figura 1 - Desenho dos subgrupos de cada tratamento

Todas as amostras foram incubadas à 37°C durante 24 horas. Para a realização do cultivo bacteriano, no transcurso das 24 horas de incubação no caldo das amostras foram extraídas alíquotas de 100 µL nos tempos 3, 6, 12 e 18 horas para cada diluição testadas do produto 5, 6, 7, 8 e 9 (Figura 1). Essas alíquotas foram diluídas em solução tampão fosfato salino (PBS 90%) até ter uma concentração final de 10^{-3} . Logo em seguida, semeou-se 100 µL da amostra dentro das placas de Petri com Ágar sangue de equino 5% (Agar sangue base®, KASVI, Brasil) e se semeou com uma alça Driglaski uniformemente sobre toda a superfície da placa. Todo o processamento foi feito em condições assépticas em capela de fluxo laminar. Essas placas foram marcadas e incubadas à 37°C por 24 horas para depois fazer a contagem de UFCs manualmente em cada placa. O maior crescimento observado para qualquer amostra foi limitado a 300 UFC/ placa para todas as diluições. O número de UFC / mL será determinado pela seguinte fórmula: $\text{UFC / mL} = \text{UFC / placa} \times 1/0,1 \text{ ml}$ (Fator alíquota) $\times 10^3$ (Fator de diluição) (LÓPEZ *et al.*, 2014).

Com objetivo de se testar uma técnica que pudesse reduzir a instabilidade da variável UFC, optou-se por utilizar também a espectrofotometria para avaliar o padrão de crescimento bacteriano das diferentes diluições testadas. Para a realização da leitura da densidade óptica no espectrofotômetro, no transcurso das 24 horas de incubação das amostras, foram extraídas alíquotas de 400 µL nos tempos 0, 3, 6, 12 e 18 horas para cada diluição testada do produto (5, 6, 7, 8 e 9) (Figura 1). Essas alíquotas foram lidas em microcubeta de quartzo, pelo método de espectrofotometria (*Spectrophotometer 35 D*®, Coleman, Brasil) em absorbância, com um comprimento de onda de 620 nm, utilizando caldo BHI para zerar o aparelho e logo depois fazer as leituras das amostras.

Ao cumprir as 24 horas de cultivo para o Controle ATB (Figura 1) e suas três dosagens MIC de antibióticos, se realizou primeiro uma leitura visual procurando formação de massa bacteriana ou turbidez das amostras, para logo depois semear em placa de petri para avaliar o crescimento bacteriano e a efetividade do antibiótico nestes micro-organismos.

No tempo 0 horas, foram selecionadas ao acaso algumas amostras dos controles 1 e 2 (Figura 1) tanto para fazer a leitura no espectrofotômetro como para fazer semeadura e cultivo em placa de petri e validar a esterilidade dos produtos.

Após a primeira fase experimental e com o objetivo de se comparar com a curva de crescimento das diversas diluições do PRP, optou-se por selecionar 4 cepas (C1, C3, C5 e CP) do “controle positivo (3) – Figura 1” para avaliar a curva de crescimento normal da bactéria nos tempos 3, 6, 12 e 18 à mesma concentração bacteriana que foram inoculadas (1×10^5 UFC/ml) as amostras testadas com o PRP.

3.5 Análise Estatístico

Nesse estudo, o equino não constitui a unidade experimental, pois o caráter individual não será considerado, principalmente porque será realizado um *pool* dos diferentes PRPs. O número de animais utilizados para coleta de sangue foi definido baseando-se apenas na quantidade de sangue necessário para todas as análises, utilizando-se volume bem menor que ao máximo permitido por animal (8% do peso vivo). GILBERTIE *et al.* (2018), estudando o efeito do PRP lisado sobre sinoviócitos, também utilizaram *pool*, composto por 6 animais doadores de 240ml de sangue cada.

Para testar as diferenças entre cepas, entre tempos e entre diluições, foram ajustados modelos de regressão linear. As distintas cepas, tempos e diluições foram utilizados como variáveis preditoras. Foi necessário aplicar a transformação logarítmica às variáveis resposta para controlar a variância e reduzir o impacto dos pontos discrepantes. Após o ajuste do modelo, calcularam-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança e gráficos ilustrativos foram construídos. Testes de comparações múltiplas (*pairwise*) foram realizados aplicando-se a correção de Sidak. Para todos os testes, utilizou-se um nível de significância de 5%.

Foi calculada a correlação não paramétrica de Spearman entre a densidade óptica e UFC. Um gráfico de dispersão foi construído.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

4. RESULTADOS

Uma das cepas (C2) foi retirada da análise de dados de UFC/ml e densidade óptica por apresentar inatividade bacteriana no transcurso do experimento.

4.1 Animais e avaliação do sangue total comparado com o PRP

Os resultados dos hemogramas dos indivíduos se encontraram dentro dos valores de referência para a espécie equina e sua respectiva raça descritos por (GRONDIN e DEWITT, 2010; MATTOSINHO, 2018). As médias dos hemogramas foram de $6,57 \times 10^6 \pm 0,38$ células/ μL para contagem de hemácias, $11,02 \times 10^3 \pm 2,5$ células/ μl para contagem de leucócitos, e $187 \times 10^3 \pm 47,4$ células/ μL para contagem de plaquetas.

O protocolo utilizado foi adequado para produção de PRP nos parâmetros estabelecidos pela literatura. Os PRPs dos 8 animais apresentaram valores médios de $0,01 \times 10^6 \pm 0,002$ células/ μL para hemácias, $2,62 \pm 0,80 \times 10^3$ células/ μL para leucócitos (redução de 4,2 x) e $344,4 \times 10^3 \pm 13,2$ células/ μL para plaquetas.

Depois de aferir os valores individuais de PRP, os mesmos foram agrupados em um *pool* que foi definido como o produto final a ser testado. Os valores desse *pool* foram: $0,01 \times 10^6$ células/ μL de hemácias, $2,06 \times 10^3$ células/ μL para contagem de leucócitos e 382×10^3 células/ μL para contagem de plaquetas, observando-se uma concentração plaquetária de 2,05 vezes maior em relação à concentração basal.

4.2 Comportamento das cepas e as diluições ao longo do tempo relacionadas com a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

As 5 cepas de *Staphylococcus sciuri* e a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* selecionadas para o estudo foram analisadas conforme seu comportamento nos diversos tempos, considerando-se as médias das diluições do PRP testadas (5, 6, 7, 8, 9) para as contagens de UFC. Na Tabela 1, encontram-se os valores das medianas e seus respectivos quartilhes. Os valores registrados no estudo como $>300 \times 10^4$ foram transformados em 300×10^4 .

No tempo 0, foram calculadas médias descritivas para os grupos controles (1), (2) e (3) tanto para *Staphylococcus sciuri* como para *Staphylococcus aureus*. Para os dois micro-organismos, os valores das médias obtidas nos grupos controles (1) e (2) foram de $0,0 \times 10^4$ UFC/ml e $0,0 \times 10^4$ UFC/ml respectivamente, o que reflete que para todos os grupos controles (1) houve esterilidade na elaboração do caldo BHI, para o grupo controle (2) demonstra que o PRP não se contaminou na sua elaboração e para os grupos controles (3) com um valor de 8×10^4 UFC/ml o que demonstra a vitalidade das bactérias e sua capacidade de replicação.

Tabela 1 - Medianas de UFC/ml das cepas em cada tempo, considerando-se todas as medianas das diluições.

Cepas	Tempo 3			Tempo 6			Tempo 12			Tempo 18		
	1° Quartil	Mediana	3° Quartil									
C1	0,0 x 10 ⁴	0,0 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴	46 x 10 ⁴	54 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴
C3	0,0 x 10 ⁴	0,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	0,0 x 10 ⁴	38 x 10 ⁴	153 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	239 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴
C4	0,0 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	10 x 10 ⁴	62 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴
C5	0,0 x 10 ⁴	0,0 x 10 ⁴	0,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	14 x 10 ⁴	70 x 10 ⁴	136 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴				
C6	0,0 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	20 x 10 ⁴	0,0 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	147 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴				
CP	104 x 10 ⁴	117 x 10 ⁴	154 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴	88 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴	300 x 10 ⁴

C1-6 *Staphylococcus sciuri*, CP *Staphylococcus aureus*.

Na Figura 2, observa-se o gráfico linear que representa o comportamento da variável UFC de cada cepa ao longo do tempo.

Comparando as diferenças entre cepas para um mesmo tempo, observou-se que no tempo 3 a CP “ATCC *Staphylococcus aureus*” teve um maior crescimento bacteriano ($P < 0,05$) do que todas as demais cepas de *Staphylococcus sciuri* (Fig. 2). Dentro dos demais tempos (6, 12 e 18), não houve diferença de crescimento bacteriano entre cepas, independentemente das diluições.

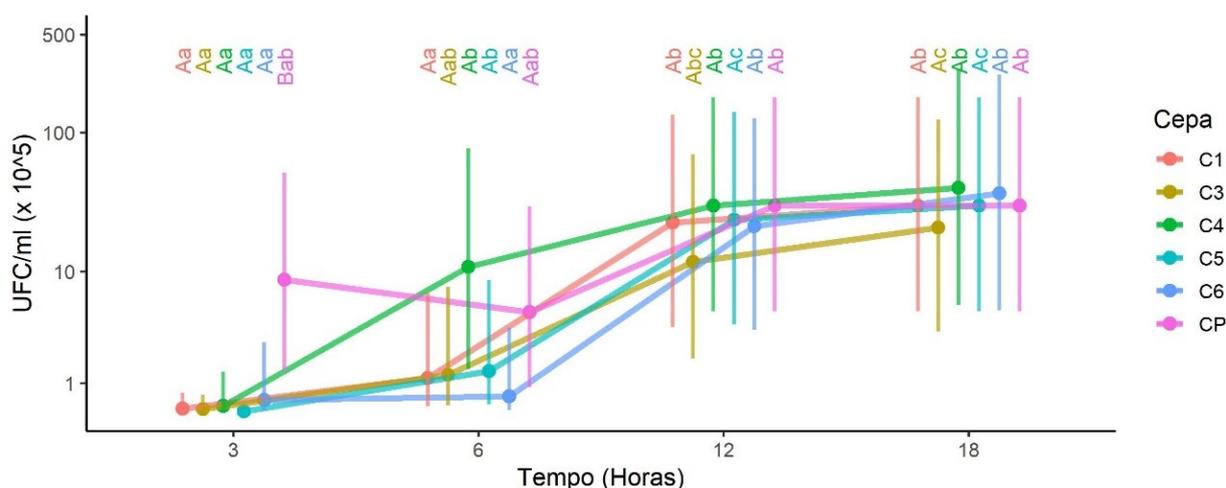


Figura 2 - Médias de UFCs/ml das cepas ao longo do tempo considerando-se todas as medias das diluições. Fonte: pessoal. *C1-6 *Staphylococcus sciuri*, CP *Staphylococcus aureus*. Letras maiúsculas especificam diferenças entre cepas para um mesmo tempo e minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma cepa, com nível de significância de 5%.

Comparando-se as diferenças entre tempos para uma mesma cepa na (Fig. 2), observou-se que as cepas C1, C3 e C6 apresentaram crescimento bacteriano significativo ($P < 0,05$) a partir do

tempo 12. As cepas C4 e C5 passaram a crescer de forma significativa ($P<0,05$) mais cedo, a partir do tempo 6. A cepa C6 continuo crescendo significativamente ($P<0,05$) mesmo após o tempo 6. A CP mostrou, ao longo do tempo, um comportamento de crescimento instável.

As 5 diluições testadas 1:1 (5), 1:2 (6), 1:4 (7), 1:8 (8) e 1:16 (9) de nosso produto (PRP) e a diluição controle (3), também foram analisadas e comparadas entres elas ao longo do tempo considerando todas as medias das cepas para as contagens de UFC. Na Tabela 2, encontramos os valores das medianas e seus respectivos quartilhes.

Tabela 2 - Medianas das UFC/ml das diluições de acordo à tempo considerando-se todas as cepas.

Variável	Tempo 3			Tempo 6			Tempo 12			Tempo 18		
	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	1° Quartil	Mediana	3° Quartil
(3)	$32,5 \times 10^4$	38×10^4	$110,5 \times 10^4$	300×10^4								
(5)	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	72×10^4	300×10^4	300×10^4	239×10^4	300×10^4	300×10^4
(6)	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$0,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	25×10^4	300×10^4	300×10^4	66×10^4	300×10^4	300×10^4
(7)	$0,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	14×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4
(8)	$0,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	154×10^4	46×10^4	88×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4
(9)	$0,0 \times 10^4$	14×10^4	$23,0 \times 10^4$	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4	300×10^4

*(3) controle, (5) 1:1, (6) 1:2, (7) 1:4, (8) 1:8, (9) 1:16.

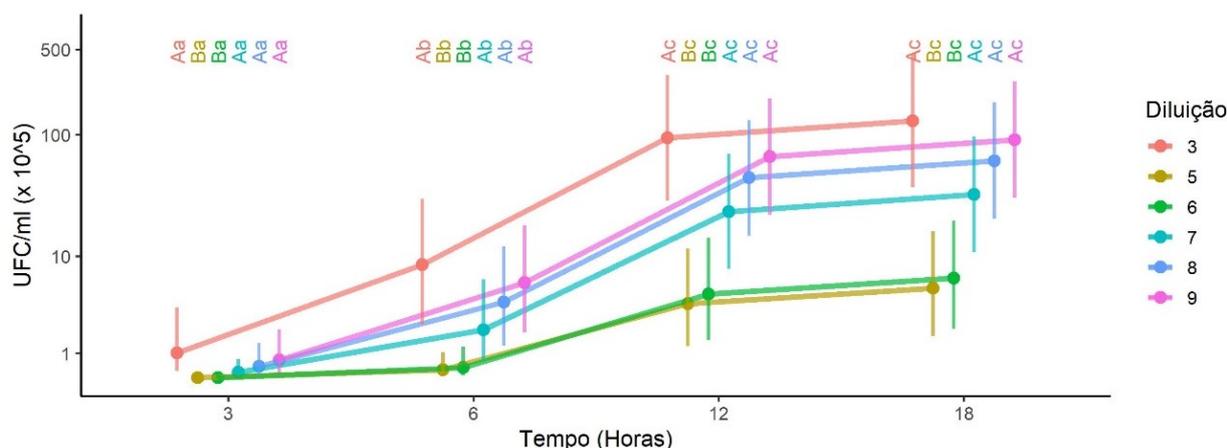


Figura 3 – Medias de UFC/ml das diluições ao longo do tempo considerando-se as medias das cepas. Letras maiúsculas especificam diferenças entre diluições para um mesmo tempo. Letras minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma diluição, com nível de significância de 5%. Fonte: pessoal. *(3) controle, (5) 1:1, (6) 1:2, (7) 1:4, (8) 1:8, (9) 1:16.

Na Figura 3, comparou-se as diferenças do crescimento bacteriano (UFC/ml) entre as diluições do PRP testadas e o controle ao longo do tempo. Houve menor crescimento de UFCs ($P<0,05$) e por conseguinte um maior efeito antimicrobiano nas diluições 1:1 e 1:2 quando comparado com a diluição 1:4 em diante e o controle (3), em todos os tempos. Isso também foi

observado na Figura 4, considerando todas as medias unificadas das cepas e tempo. Por sua vez, quando comparadas as diferenças entre tempos para uma mesma diluição (Fig. 3), observa-se que todas as diluições apresentaram crescimento bacteriano ($P < 0,05$) nos tempos 3, 6 e 12.

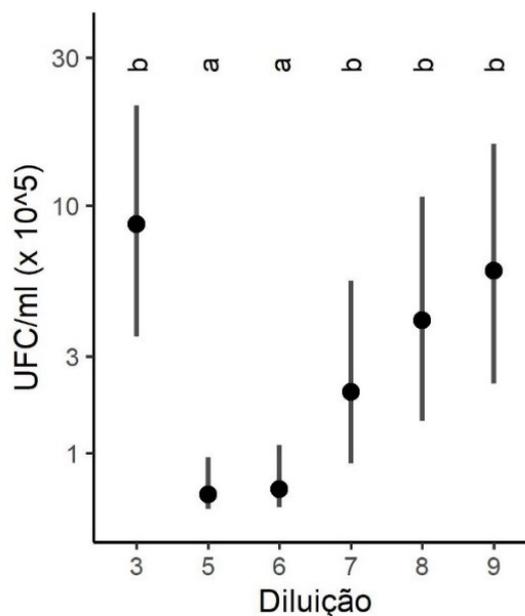


Figura 4 – Medias de UFC/ml das diluições considerando-se todas as medias das cepas e tempos agrupadas. Fonte: pessoal. *(3) controle, (5) 1:1, (6) 1:2, (7) 1:4, (8) 1:8, (9) 1:16.

4.3 Comportamento das cepas e as diluições ao longo do tempo relacionadas com a densidade óptica medida por absorbância.

As 5 cepas de *Staphylococcus sciuri* e a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* selecionadas para o estudo foram analisadas conforme seu comportamento nos diversos tempos, considerando-se as medias das diluições do PRP testadas para a absorbância, medida de densidade óptica das amostras realizada no espectrofotômetro a uma onda de 620 nm. Na Tabela 3, apresentou-se os valores descritivos das medianas e seus respectivos quartis.

Tabela 3 - Medianas da Absorbância (A_{620}) das cepas ao longo do tempo considerando-se todas as medias das diluições

Variável	Tempo 0			Tempo 3			Tempo 6			Tempo 12			Tempo 18		
	1° Qua	Mediana	3° Qua	1° Qua	Mediana	3° Qua	1° Qua	Mediana	3° Qua	1° Qua	Mediana	3° Qua	1° Qua	Mediana	3° Qua
C 1	0,2800	0,4300	0,6200	0,0260	0,0310	0,0610	0,0020	0,0170	0,1160	0,0120	0,0195	0,0250	0,0080	0,0685	0,0700
C 3	0,0470	0,0635	0,0730	0,0060	0,0240	0,0460	0,0200	0,0720	0,0850	0,0460	0,0625	0,0770	0,0500	0,0765	0,0800
C 4	0,0230	0,0575	0,0700	0,0220	0,0320	0,0710	0,0400	0,0700	0,1000	0,0180	0,0510	0,0640	0,0500	0,0725	0,0880
C 5	0,0450	0,0575	0,1050	0,0040	0,0300	0,0490	0,0360	0,0600	0,0970	0,0580	0,0950	0,1170	0,0580	0,0860	0,1120
C 6	0,0400	0,0890	0,1350	0,0150	0,0530	0,0880	0,0500	0,0530	0,0890	0,0600	0,0765	0,1220	0,0460	0,0870	0,1220
C P	0,0280	0,0600	0,0770	0,0020	0,0280	0,0740	0,0050	0,0070	0,0260	0,0240	0,0390	0,0760	0,0370	0,0835	0,1210

Fonte: pessoal. *C1-6 *Staphylococcus sciuri*, CP *Staphylococcus aureus*.

Na Figura 5, o gráfico representa o comportamento da absorvância das cepas ao longo do tempo.

Comparando as diferenças entre cepas para um mesmo tempo na Figura 5, encontramos que a C1 apresentou absorvância maior ($P < 0,05$) que as cepas C3, C4, C5 e CP ao tempo 0, em qualquer das diluições. Dentro dos demais, não houve diferença entre as leituras de densidade óptica nos tempos.

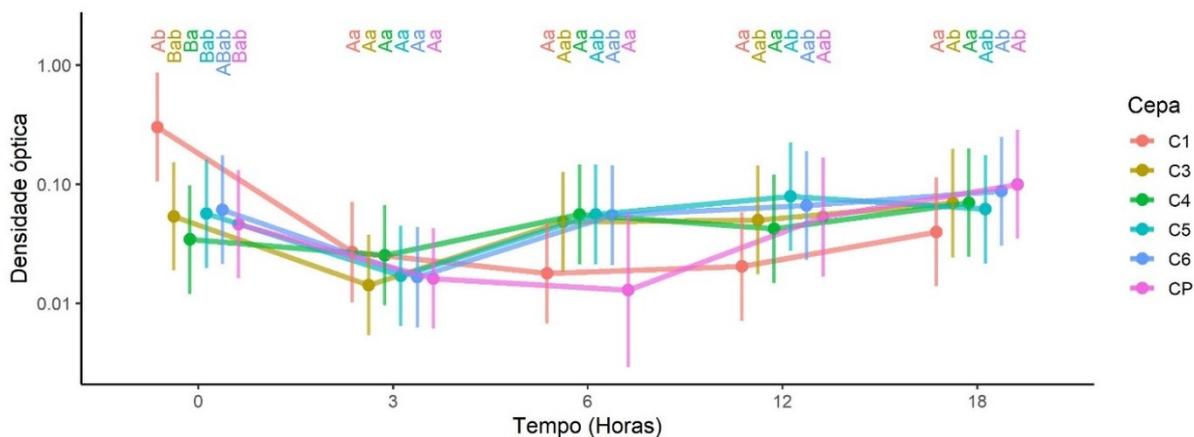


Figura 5 – Médias da Absorvância (A_{620}) das cepas ao longo do tempo considerando-se todas as medias das diluições. Letras maiúsculas especificam diferenças entre cepas para um mesmo tempo. Letras minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma cepa, com nível de significância de 5%. Fonte: pessoal. *C1-6 *Staphylococcus sciuri*, CP *Staphylococcus aureus*.

Comparando-se as diferenças entre tempos para uma mesma cepa na (Fig. 5), independente das diluições, observamos que a C1 iniciou no tempo 0 a leitura com uma absorvância mais alta que se reduziu ($P < 0,05$) logo ao tempo 3, se mantendo assim até o final. O aumento da absorvância do C3, C6 e CP somente se tornou significativa ($P < 0,05$) no tempo 18. Na C5, isso aconteceu no tempo 12.

Na Tabela 4, encontramos os valores descritivos das medianas e seus respectivos quartis de cada diluição ao longo do tempo, considerando-se as medias das cepas.

Tabela 4 - Medianas da absorvância (A_{620}) das diluições ao longo do tempo considerando-se todas as cepas.

Variável	Tempo 0			Tempo 3			Tempo 6			Tempo 12			Tempo 18		
	1º Qua	Mediana	3º Qua	1º Qua	Mediana	3º Qua	1º Qua	Mediana	3º Qua	1º Qua	Mediana	3º Qua	1º Qua	Mediana	3º Qua
(5)	0,0700	0,0770	0,1050	0,0460	0,0610	0,1160	0,0850	0,1290	0,1350	0,0730	0,0760	0,1220	0,0880	0,1220	0,1410
(6)	0,0230	0,0580	0,1350	0,0240	0,0530	0,1160	0,0700	0,0845	0,1090	0,0250	0,0600	0,1250	0,0780	0,1120	0,1220
(7)	0,0470	0,0570	0,0980	0,0430	0,0490	0,0740	0,0410	0,0710	0,0890	0,0240	0,0600	0,0810	0,0240	0,0460	0,0700
(8)	0,0280	0,0400	0,0750	0,0070	0,0260	0,0300	0,0400	0,0550	0,0590	0,0140	0,0230	0,0530	0,0270	0,0320	0,0580
(9)	0,0110	0,0280	0,0450	0,0100	0,0130	0,0310	0,0050	0,0200	0,0510	0,0150	0,0390	0,0720	0,0170	0,0670	0,0790

Fonte: pessoal. *(3) controle, (5) 1:1, (6) 1:2, (7) 1:4, (8) 1:8, (9) 1:16.

Na Figura 6, considerando-se todas as médias das cepas, comparou-se as diferenças da absorvância como medida de densidade óptica entre as diluições do PRP testadas ao longo do tempo, e na Figura 7 considerando-se todas as médias das cepas e tempos agrupados.

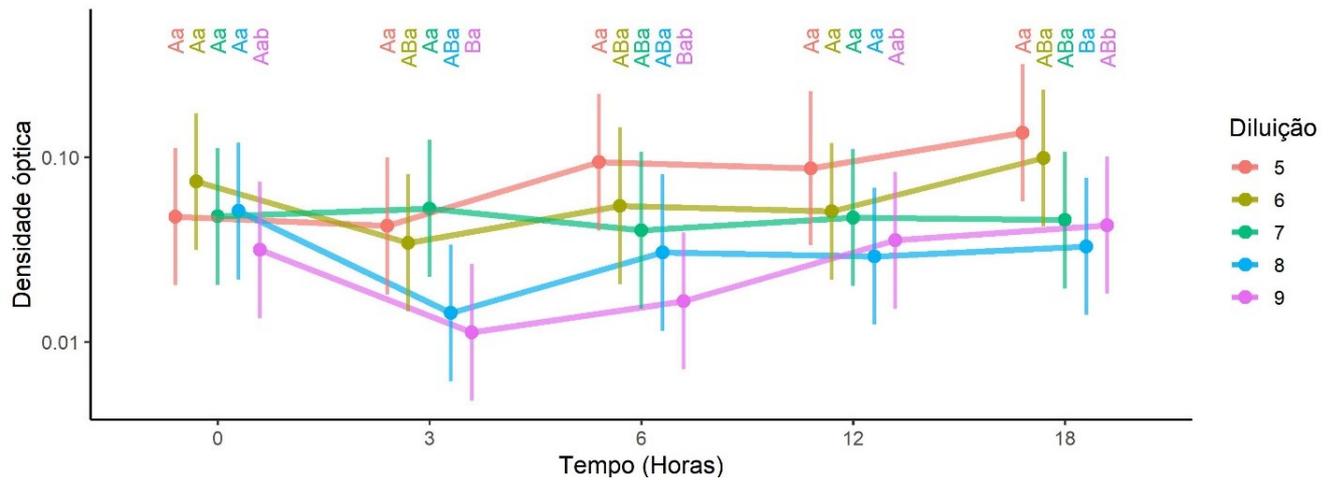


Figura 6 – Médias da Absorvância (A_{620}) das diluições ao longo do tempo considerando-se as médias das cepas. Letras maiúsculas especificam diferenças entre diluições para um mesmo tempo. Letras minúsculas especificam as diferenças entre tempos para uma mesma diluição, com nível de significância de 5%. Fonte: pessoal. *(5) 1:1, (6) 1:2, (7) 1:4, (8) 1:8, (9) 1:16.

Na Figura 6, comparando as diferenças entre diluições para um mesmo tempo, observa-se que a diluição 1:1 teve absorvância maior ($P < 0,05$) no tempo 3 e 6 que a diluição 1:16. A diluição 1:4 também apresentou absorvância maior ($P < 0,05$) no tempo 3 que a diluição 1:16. Além disso, a diluição 1:1 teve uma absorvância significativamente ($P < 0,05$) maior no tempo 18 que a diluição 1:8 (8). Por outro lado, comparando as diferenças entre tempos para uma mesma diluição, apenas a diluição 1:16 apresentou menor absorvância no tempo 3 em relação ao tempo 18 ($P < 0,05$).

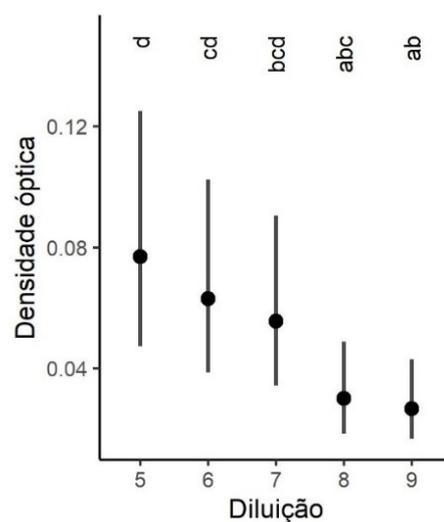


Figura 7 – Médias da Absorbância das diluições considerando-se todas as medias das cepas e tempos agrupados. Fonte: pessoal. *(5) 1:1, (6) 1:2, (7) 1:4, (8) 1:8, (9) 1:16.

Na Figura 7, observa-se que a absorbância da diluição 1:1 foi maior do que as diluições 1:8 e 1:16. Para a diluição 1:2 teve uma densidade óptica significativamente ($P < 0,05$) maior quando comparado à diluição 1:16.

5. DISCUSSÃO

A contagem plaquetária do PRP obtido neste estudo, foi em média de 344.400 plaquetas/ μL para os 8 equinos utilizados e 382.000 plaquetas/ μL para o *pool*. A relação entre a concentração ideal de plaquetas e leucócitos no PRP e seus efeitos terapêuticos na oftalmologia equina ainda não foi definida. A concentração absoluta de plaquetas é, geralmente, extrapolada de trabalhos realizados em seres humanos, desconsiderando as variações interespecies na contagem plaquetária, fisiologia da degranulação e constituição de fatores de crescimento (FONTENOT *et al.*, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2014; GARMIN *et al.*, 2021). Em equinos, Fontenot *et al.* (2012) estimaram que concentrações plaquetárias superiores a 250.000 plaquetas/ μL no PRP seriam clinicamente relevantes. Outros autores recomendam que concentrações maiores ou iguais a 300.000 plaquetas/ μL são adequadas para equinos, expressando uma concentração suficiente de fatores de crescimento e sendo eficazes quando utilizadas em diferentes terapias (ANITUA *et al.*, 2004; FOSTER *et al.*, 2009; McCARREL e FORTIER, 2009; CARMONA *et al.*, 2011; YAMADA *et al.*, 2012).

O método manual utilizado neste estudo para a elaboração do PRP produziu concentração satisfatória de valores de leucócitos $2,62 \pm 0,80 \times 10^3$ leucócitos/ μL para a média de todos os indivíduos e $2,06 \times 10^3$ leucócitos/ μL para a contagem de leucócitos do *pool*, conforme a literatura. Vendruscolo *et al.* (2012), ao testar dez protocolos diferentes de PRP, obtiveram em média uma concentração maior, $3,214 \times 10^3$ leucócitos/ μL . Fontenot *et al.* (2012) definiram como concentração ótima de leucócitos o valor de $< 3,0 \times 10^3$ leucócitos/ μL , para menor efeito catabólico nos tecidos tratados.

É importante lembrar que a contagem automática por impedância apresenta limitações. Uma vez que a técnica considera apenas o volume celular (HARRISON *et al.*, 2000), fragmentos de eritrócitos, micrócitos e complexos imunológicos podem ser erroneamente contados como plaquetas, excedendo o seu número real em casos de trombocitopenia. Outras técnicas têm sido adotadas para este fim. De acordo com Teixeira (2014), a contagem de plaquetas na câmara de

Neubauer no PRP é considerada *padrão ouro*, na ausência de citometria de fluxo. Em seu estudo, os autores compararam as contagens de plaquetas de PRP autólogos e heterólogos por impedância e contagem manual na câmara de Neubauer. A correlação entre as técnicas foi moderada, mas significativa ($P < 0,05$), em que as contagens na câmara de Neubauer apresentaram valores mais altos de plaquetas. Assim, pode-se inferir que a contagem plaquetária encontrada aqui poderia ser superior caso houvesse sido realizada a contagem manual. Por outro lado, a contagem manual é uma técnica demorada e laboriosa, o que dificulta sua aplicabilidade em um grande volume de amostras. A citometria de fluxo, por sua vez, apresenta um custo muito alto, o que limita sua utilização em muitos cenários. Por esses motivos, a impedância tem sido amplamente aceita nos estudos de PRP (ÁLVAREZ *et al.*, 2011; ANITUA *et al.*, 2012b; DRAGO *et al.*, 2013; DRAGO *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2014)

Em relação a aplicação de PRP nas enfermidades oculares em equinos, há muito ainda a ser definido. Anitua (1999) publicou o uso de um *kit* comercial para produção de PRP enriquecido para tratamento oftálmico em humanos. Em seguida, foram realizados estudos avaliando o *kit* para uso na medicina veterinária em diversos tecidos (VILAR *et al.*, 2013; RUSHTON *et al.*, 2017; LOPEZ *et al.*, 2019). No presente estudo, o PRP não foi produzido por meio de *kit* comercial, o que se constitui uma vantagem, pois trata-se de técnica facilmente acessível e replicável com equipamentos básicos. Nesse contexto, Rushton *et al.* (2017) compararam os efeitos *in-vitro* do soro autólogo ao PRGF e PRP em células da córnea equina. Tal estudo demonstrou que o PRP produzido teve menor concentração de leucócitos ($2,32 \times 10^3$ leucócitos/ μL). Esse valor foi superior ao encontrado no presente estudo ($2,06 \times 10^3$ leucócitos/ μL). Ainda não está clara a relação da concentração leucocitária no PRP e seu comportamento no reparo de tecido ocular equino. Em humanos, Sudman *et al.* (2011) e McCarrel *et al.* (2012) afirmam que preparações de PRP com altas concentrações de leucócitos devem ser evitadas em tendão e articulações, porque sua presença aumenta a concentração das citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e metaloproteinases MMP-9 e MMP-13. Embora o presente estudo não tenha avaliado a capacidade de reparo em tecidos oculares, o PRP produzido se encaixa nas características de baixa concentração leucocitária. Nosso PRP pode ser classificado como plasma puro rico em plaquetas (P-PRP) (CARMONA *et al.*, 2013) ou como concentrado de plaquetas leucoreduzido (GIRALDO *et al.*, 2013; DOHAN *et al.*, 2012), o que valida seu uso na oftalmologia equina.

O gênero *Staphylococcus* é relatado sempre como 1º ou 2º gênero mais frequente da microbiota conjuntival equina, com ocorrências acima de 18%. O *Staphylococcus sciuri* é uma espécie que se encontra dentro das bactérias mais predominantes dentro do gênero (ANDREW *et*

al., 2003; JOHNS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; HAMPSON *et al.*, 2018, OLIVEIRA, 2019). Uma vez que a microbiota comensal pode atuar como patogênica frente a uma lesão primária (JOHNS *et al.*, 2011), foi testado o efeito do PRP produzido sobre cepas selvagens de *Staphylococcus sciuri* isoladas da microbiota conjuntival de equinos hígdos.

Observou-se que a CP (*S. aureus*) teve maior crescimento às 3 horas, o que faz sentido considerando-se o fato de ser um agente patogênico (CHEUNG *et al.*, 2021). As demais cepas (C1-C6) são cepas da microbiota ocular de animais hígdos, portanto, possivelmente não possuem a mesma eficiência de replicação e colonização. Ficou claro que o PRP foi eficaz na inibição dessas bactérias já às 3 horas. A inibição do PRP sobre a CP ocorreu somente a partir do tempo 6 horas, o que pode significar que os fatores inibidores presentes no PRP precisaram de maior tempo para apresentar efeito. Do ponto de vista clínico, isso pode ser particularmente importante quando se pretende identificar o *S. aureus* como agente causador de ceratite ulcerativa em cavalos (VERCRUYSSSE *et al.*, 2022). Resultados diferentes foram observados por outros pesquisadores. López *et al.* (2014) cultivaram o PRP e outros hemoderivados, em uma concentração bacteriana de 1×10^6 UFC/ml de MSSA e MRSA direto na placa de ágar sangue, sem ser cultivado previamente em caldo como em nosso estudo. Eles fizeram leitura das placas às 6 horas e 24 horas comparando seus tratamentos e o controle entre eles. Na leitura após 6 horas de cultivo no caso do PRP ele inibiu totalmente o crescimento bacteriano comparado com seu grupo controle. Às 24 horas os valores de UFC/ml do PRP foram menores que os obtidos no grupo controle. Porém, os últimos autores não semearam nos tempos 3, 6, 12 e 18 h após cultivo no caldo. Além disso, nosso estudo apresentou outras variáveis que podem ter influenciado o crescimento bacteriano. Ao cultivar primeiro o PRP com a bactéria em caldo BHI, pode ter ocorrido a diluição dos componentes do PRP. Também foi observada coagulação das amostras da CP de todos os subgrupos desde o tempo 3. Esse fato encontra respaldo na literatura. O *Staphylococcus aureus* possui uma proteína chamada coagulase que permite a conversão de fibrinogênio a fibrina, interagindo com proteína de ligação ao fator de von Willebrand, que se liga à protrombina (fator II da cascata de coagulação), formando um complexo denominado estafilotrombina (FRIEDRICH *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2010) que em seguida, usa proteínas de ligação ao fibrinogênio, como o fator de agregação (A) para aderir aos coágulos de fibrina e formar agregados bacterianos contendo fibrina (MCADOW *et al.*, 2011). Esta membrana de fibrina faz que a bactéria por meio deste mecanismo possa resistir a fagocitoses (BURNOUF *et al.*, 2013; CHEUNG *et al.*, 2021). Esse mecanismo demonstra claramente que houve interação do PRP com a bactéria, o que não poderia ter sido demonstrado em curvas de MIC com antibióticos. Possivelmente, tal mecanismo influenciou no maior crescimento bacteriano da CP no

tempo 3 quando comparado às cepas de *Staphylococcus sciuri*. Também é possível que a redução de UFCs de CP apenas ao tempo 6, embora não significativa, possa ser atribuída a um atraso na efetividade do PRP, devido aos mesmos mecanismos.

Embora o presente estudo tenha se proposto também a analisar e definir uma MIC para o PRP pelo método de macro-diluição em caldo BHI, essa não se mostrou uma técnica efetiva para avaliação dos efeitos do PRP na metodologia utilizada. No presente estudo, foi utilizada uma concentração bacteriana mais alta (1×10^5 UFC/ml) em relação a estudos anteriores (DRAGO *et al.*, 2014). Além disso, nosso estudo se propôs a fazer observações em intervalos de tempo mais curtos e não apenas após 24 horas de cultivo. Outro fator de importância foi o fato de a densidade do PRP dificultar a avaliação visual das amostras, especialmente dos subgrupos da CP ATCC de *S. aureus*, pela coagulação das amostras. Não foram encontrados estudos que tenham utilizado a metodologia de avaliação visual para definição da MIC em PRP equino. Assim, optou-se por interpretar os resultados das diluições nas contagens de UFCs, sendo este o teste padrão ouro para avaliar crescimento bacteriano (TRABULSI e ALTHERTUM, 2015; MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA *et al.*, 2017).

Neste estudo o PRP não foi ativado, porém demonstrou-se nos resultados, que houve de fato efeito inibidor, achado que gera controversa quando comparado com (DRAGO *et al.*, 2014) que afirmaram com seu estudo, que hemoderivados sem ativação previa, não apresentaram efeito inibitório. Por outro lado, Wu *et al.* (2013) e López *et al.* (2014) mostraram que as preparações de PRP ativado tiveram menor atividade antimicrobiana frente alguns micro-organismos testados em comparação com as preparações inativadas. Acredita-se que esses achados sejam devidos ao consumo de complemento durante a ativação da coagulação (BURNOUF *et al.*, 2013). A ativação plaquetária ficou evidente na CP, uma vez que ela promoveu coagulação das amostras após contato com o PRP. Esse acontecimento é respaldado pela literatura, posto que as plaquetas têm diversos mecanismos de interação com as bactérias, o que faz que elas se ativem (MIAJLOVIC *et al.*, 2010; PETERSEN *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2011; HAMZEH-COGNASSE *et al.*, 2015). Além disso, embora as cepas 1-6 não tenham alguns fatores de virulência para gerar a coagulação do PRP, ficou evidente a interação entre produto e bactéria pelos próprios resultados obtidos, apresentando inibição do crescimento bacteriano destas cepas, demonstrados na Figura 3.

O PRP neste estudo apresentou uma inibição do crescimento bacteriano de todas as cepas testadas durante as primeiras horas de incubação, mas sem chegar à quebra completa da carga microbiana, apresentando uma recuperação do crescimento bacteriano. Com isso pode-se indicar

que o PRP apresentou uma atividade inibitória bacteriostática ao invés de microbicida, sendo esses resultados, compatíveis com o falado por alguns autores que também avaliaram o potencial do PRP e outros hemoderivados (MOOJEN *et al.*, 2008; ANITUA *et al.*, 2012b; LÓPEZ *et al.*, 2014; MARIANI *et al.*, 2014; INTRAVIA *et al.*, 2014; VARSHNEY, 2019).

O tempo que o PRP testado neste estudo apresentou um efeito inibitório no crescimento bacteriano foi de até 6 horas tanto para *Staphylococcus sciuri* como para *Staphylococcus aureus*. Outros autores reportaram um tempo de efeito inibitório do PRP e outros hemoderivados frente a diversos micro-organismos entre uma faixa de 4 – 8 horas, sendo compatíveis com os obtidos neste estudo (MOOJEN *et al.*, 2008; ANITUA *et al.*, 2012; MARIANI *et al.*, 2014; INTRAVIA *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2014). Esse tempo inibitório pode ser variável e discrepantes por diversos fatores, entre eles as características intrínsecas das cepas bacterianas utilizadas, que podem apresentar uma suscetibilidade diferente aos concentrados de plaquetas, ou à sensibilidade diferente do teste utilizado para avaliar a atividade antibacteriana. Outras razões importantes para explicar a variabilidade dos resultados obtidos em diversos estudos, podem ser atribuídas aos tipos de concentrados de plaquetas utilizados, que podem diferir, bem como na concentração de plaquetas, conteúdo de leucócitos, o modo de ativação.

Levando em consideração os resultados obtidos neste estudo, podemos afirmar que o uso do PRP, pode ser utilizado tanto puro (1:1), como diluído até 1:2, apresentando um efeito bacteriostático de até 6 horas, frente a todas as cepas de *Staphylococcus sciuri* micro-organismo residente da microbiota conjuntival ocular de cavalos hípidos e frente a *Staphylococcus aureus* (CP), micro-organismo patógeno multirresistente. Com isso também pode-se inferir que as propriedades antimicrobianas do PRP são dependentes da concentração, sendo compatível com os resultados de (SEGABINAZZI *et al.*, 2021).

Embora esse estudo tenha-se proposto utilizar a absorvância como medida na densidade óptica por espectrofotometria na procura de um método mais rápido, mais sensível e com dados com maior estabilidade enquanto comparado com as UFCs. Essa busca foi restringida pelo comportamento estável das cepas (Figura 5), por conseguinte sem seguir nenhum padrão nem positivo, nem negativo no crescimento bacteriano e pelo fato de que o PRP ao ser um hemoderivado que contém uma mistura de plaquetas, leucócitos, fatores de crescimento, proteínas séricas e plasmáticas (ÁLVAREZ *et al.*, 2011; DRAGO *et al.*, 2014; FANTINI, 2014; MARQUES, 2014; SEIDEL, 2017), afeta diretamente o resultado da absorvância, fazendo a leitura de toda essa celularidade do PRP e além disso as bactérias estejam vivas ou mortas. Ademais o PRP apresento

em suas diluições 1:1 e 1:2 maior ($P < 0,05$) absorvância que as demais diluições, fato que apoia que a mesma concentração do PRP interferiu nos resultados deste teste. Um achado interessante neste teste, foi o fato de que a diluição 1:16, com a menor concentração de PRP, apresentou uma diferença significativa no crescimento bacteriano no tempo 3, tempo no qual tinha a menor absorvância, frente o tempo 18, tempo no qual apresentou seu maior valor de absorvância. Esse fato demonstra uma tendência desta cepa aumentar sua absorvância pelo mesmo fato que concentrações menores de PRP, não levam a um efeito antibacteriano efetivo como em concentrações maiores.

6. CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento, avaliando o efeito antimicrobiano do PRP frente a *Staphylococcus sciuri*, micro-organismo residente da microbiota ocular conjuntival normal de cavalos do município de Minas Gerais, pode se obter as seguintes conclusões:

- As cepas isoladas da microbiota conjuntival normal de *Staphylococcus sciuri* foram mais susceptíveis ao efeito antimicrobiano do PRP que a cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*.
- O PRP apresentou efeito antimicrobiano bacteriostático *in-vitro* até o tempo 6, nas diluições 1:1 (5) e 1:2 (6).
- O efeito antimicrobiano do PRP é dependente da concentração.
- A espectrofotometria não é um método aplicável para avaliar a interação e o comportamento das bactérias frente ao PRP.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de terapias que possam auxiliar ou substituir a ação dos antibióticos, visando na diminuição da resistência antimicrobiana aos fármacos é um esforço atual tanto na medicina humana quanto na veterinária. O PRP terapia biológica derivada do sangue utilizado com segurança para a regeneração tecidual, apresentou um efeito bacteriostático de 6 horas frente bactérias isoladas da microbiota ocular, acrescentando ainda outro benefício terapêutico na sua utilização já que contém moléculas com efeito antimicrobiano, podendo ser utilizado efetivamente até a diluição 1:2. Pesquisas *in-vitro* e *in-vivo* são necessárias na busca da contribuição de cada componente na ação antimicrobiana, e sua variabilidade de resposta frente as bactérias (Gram + e Gram -) e fungos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGERBERTH, B.; GUDMUNDSSON, G. H. Host antimicrobial defence peptides in human disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 306, p. 67–90, 2006.

AKTAN, Í.; DUNKEL, B.; CUNNINGHAM, F. M. Equine platelets inhibit E. coli growth and can be activated by bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid although superoxide anion production does not occur and platelet activation is not associated with enhanced production by neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 152, n. 3–4, p. 209–217, 2013.

ALIO, J.; ARNALICH-MONTIEL, F.; RODRIGUEZ, A. The Role of “Eye Platelet Rich Plasma” (E-Prp) for Wound Healing in Ophthalmology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 13, n. 7, p. 1257–1265, 2012.

ÁLVAREZ, M. E.; LÓPEZ, C.; GIRALDO, C. E.; et al. In-vitro bactericidal activity of equine platelet concentrates, platelet poor plasma, and plasma against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 43, n. 2, p. 155–161, 2011.

ALVES, M. G. *Método fundamentado em processamento digital de imagens para contagem automática de unidades formadoras de colônias*. 2006. Dissertação (Mestrado em ciencia da computação). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

ANDREW, S. E.; NGUYEN, A.; JONES, G. L.; et al. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Veterinary Ophthalmology*, v. 6, n. 1, p. 45–50, 2003.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 14, p. 529-535, 1999.

ANITUA, E.; ALKHRAISAT, M. H.; ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J of Control Rel*, v. 157, p. 29-38, 2012a.

ANITUA, E.; ALONSO, R.; GIRBAU, C.; et al. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®- Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 37, n. 6, p. 652–657, 2012b.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 91, n. 1, p. 4–15, 2004.

ANITUA, E.; DE LA FUENTE, M.; MURUZABAL, F.; et al. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Experimental Eye Research*, v. 135, p. 118–126, 2015.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 640, n. December 2017, p. 47–52, 2018.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Research in Veterinary Science*, v. 81, n. 2, p. 237–245, 2006.

ARVAND, M.; BHAKDI, S.; DAHLBACK, B.; et al. *Staphylococcus aureus* α -toxin attack on human platelets promotes assembly of the prothrombinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 24, p. 14377–14381, 1990.

- ASLANTAŞ, Ö.; TÜRKYILMAZ, S.; YILMAZ, M. A.; et al. Isolation and molecular characterization of methicillin-resistant staphylococci from horses, personnel and environmental sites at an equine hospital in Turkey. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 74, n. 12, p. 1583–1588, 2012.
- ASSOIAN, R. K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C. A.; et al. Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, n. 11, p. 7155–7160, 1983.
- BAKSH, N.; HANNON, C. P.; MURAWSKI, C. D.; et al. Platelet-Rich Plasma in Tendon Models: A Systematic Review of Basic Science Literature. *Arth: The J of Arth and Rel Surg*, v. 29, p. 596–607, 2013.
- BARAN, V.; ÖZAYDIN, I.; GENÇ, O.; et al. The Effects of High and Low Altitudes on Conjunctival Flora in Sport and Work Horses: A Field Study in the Northeast Anatolia Region of Turkey (Kars and Iğdır). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v.21, n.4, p.477-481, 2015.
- BARON, E. J. O.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. *Bailey e Scott diagnostic microbiology*. 9 ed. Saint Louis, USA: Mosby-Year Book, 1994. 244p.
- BEIMS, H.; OVERMANN, A.; FULDE, M.; et al. Isolation of staphylococcus sciuri from horse skin infection. *Open Veterinary Journal*, v. 6, n. 3, p. 242–246, 2016.
- BENITO, M.; VALVERDE, A. M.; LORENZO, M. IGF-I: A Mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 28, n. 5, p. 499–510, 1996.
- BEZERRA, N.; MOURA, L.; VAGO, B.; et al. Uso do plasma rico em plaquetas associado a colírios no tratamento de ceratite ulcerativa em equino. *Ciência Animal*, v.30, n.1, p.137- 144, 2020.
- BIELECKI, T. M.; GAZDZIK, T. S.; ARENDT, J.; et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: An in-vitro study. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, v. 89, n. 3, p. 417–420, 2007.
- BIKLE, D. D.; HARRIS, J.; HALLORAN, B. P.; et al. Expression of the genes for insulin-like growth factors and their receptors in bone during skeletal growth. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 267, n. 2 30-2, 1994.
- BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, v. 23, p.177-189, 2009.
- BONESSO M. F.; YEH, A. J.; VILLARUZ, A. E.; et al. Key Role of alpha-Toxin in Fatal Pneumonia Caused by *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398. *Am J Respir Crit Care Med.* v.193, n. 2, p. 217–220, 2016
- BORQUES, L. F.; SIQUEIRA, L. O. Validação da tecnologia 5 diff do analisador hematológico Symex XS-1000i para laboratório de pequeno/medio porte. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 31, n. 4, p. 247-251, 2009.
- BOSWELL, S. G.; COLE, B. J.; SUNDMAN, E. A.; et al. Platelet-rich plasma: A milieu of bioactive factors. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, v. 28, n. 3, p. 429–439, 2012.
- BOUILLER, K.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D.; et al. Human infection of methicillin-

- susceptible staphylococcus aureus cc398: A review. *Microorganisms*, v. 8, n. 11, p. 1–19, 2020.
- BRENNAN, M. P.; LOUGHMAN, A.; DEVOCELLE, M.; et al. Elucidating the role of Staphylococcus epidermidis serine-aspartate repeat protein G in platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, n. 8, p. 1364–1372, 2009.
- BRIGGS, C.; HARRISON, P.; MAC, H. Continuing development with the automated platelet count. *Int J Lab Hem*, v. 29, n. 2, p. 77-91, 2007.
- BROOKS, D. E. *Oftalmologia para veterinários de equinos*. 1ed. São Paulo, Editora Roca. 2005. p. 45-48.
- BRYANT, A. E.; BAYER, C. R.; CHEN, R. Z.; et al. Vascular dysfunction and ischemic destruction of tissue in Streptococcus pyogenes infection: The role of streptolysin O-induced platelet/neutrophil complexes. *Journal of Infectious Diseases*, v. 192, n. 6, p. 1014–1022, 2005.
- BURNOUF, T.; CHOU, M. L.; WU, Y. W.; et al. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion*, v. 53, n. 1, p. 138–146, 2013.
- CAMARGO, L.; LÓPEZ, C.; CARMONA, J. U. A Critical Overview of the Use of Platelet-Rich Plasma in Equine Medicine Over the Last Decade. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, n. March, p. 1–10, 2021.
- CÁRDENAS M, L; CACERES Y. N. Plasma rico en plaquetas: una alternativa terapéutica versátil en enfermedades oftálmicas. *Medicentro (Villa Clara)*, v. 21, n. 2, p. 90–100, 2017.
- CARMONA J. U.; ARGÜELLES, D.; PRADES, M.; et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Sci, Fort Collins*, v.27, p.167-170, 2007.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; GIRALDO, C. E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Arch Med Vet*, v.43, p.1-10, 2011.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Use of autologous platelet concentrates obtained by the tube method as a treatment for arthropathies in horses. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 41, n. 2, p. 175–179, 2009a.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SANDOVAL, A. Review of the currently available systems to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. *Recent Patents on Regenerative Medicine*, v. 3, n. 2, p. 148–159, 2013.
- CARMONA, J. U.; PRADES, M.; ARGUELLES, D. Concentrados autólogos de plaquetas como tratamiento de lesiones de tejidos blandos del aparato locomotor en caballos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 41, n. 1, p. 77–82, 2009b.
- CHEN, S.; WANG, Y.; CHEN, F.; et al. A highly pathogenic strain of Staphylococcus sciuri caused fatal exudative epidermitis in piglets. *PLoS ONE*, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2007.
- CHENG, A. G.; MCADOW, M.; KIM, H. K.; et al. Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 8, p. 19–20, 2010.
- CHEUNG, G. Y.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.
- CIESLIK-BIELECKA, A.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T. S.; et al. Improved treatment of

mandibular odontogenic cysts with platelet-rich gel. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 105, n. 4, p. 423–429, 2008.

CIEŚLIK-BIELECKA, A.; REICHERT, P.; SKOWROŃSKI, R.; et al. A new aspect of in-vitro antimicrobial leukocyte- and platelet-rich plasma activity based on flow cytometry assessment. *Platelets*, v. 30, n. 6, p. 728–736, 2019.

COX, D.; KERRIGAN, S. W.; WATSON, S. P. Platelets and the innate immune system: Mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 9, n. 6, p. 1097–1107, 2011.

D'ASTA, F.; HALSTEAD, F.; HARRISON, P.; et al. The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: A systematic review. *Platelets*, v. 29, n. 1, p. 9–20, 2018.

DAHA M. R. Role of complement in innate immunity and infections. *Crit Rev Immunol*, v. 30, p. 47-52, 2010.

DIAS, S. P.; VAGHETTI, J. P.; LIMA, É. C.; et al. *Química Analítica: Teoria e Prática Essenciais*. Bookman, 2016. p.122-125.

DOHAN, E. D.; BIELECKI, T.; MISHRA, A.; et al. In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 13, n. 7, p. 1131–1137, 2012.

DRAGO, L.; BORTOLIN, M.; VASSENA, C.; et al. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC microbiology*, v. 13, 2013.

DRAGO, L.; BORTOLIN, M.; VASSENA, C.; et al. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: An in-vitro study. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 2–6, 2014.

EVERTS, P. A. M. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. In: EVERTS, P. A. M. (ed.). Platelet-leukocyte enriched gel. basic and efficacy. *The Netherlands: DeL Graphics*, p. 23-60, 2007.

FANTINI, P. *Plasma rico em plaquetas: padronização em equídeos, criopreservação e efeito terapêutico na desmiste do ligamento supraespinhoso de equinos*. Minas Gerais, 2014. Dissertação (Doutorado em Ciencia animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott williams e Wilkins, 2000. p. 1344.

FERREIRA, A. R.; SANTANA, A. F.; ALMEIDA, A. C.; et al. Bacterial culture and antibiotic sensitivity from the ocular conjunctiva of horses. *Ciência Rural*, v. 47, n. 6, p. 1–6, 2017.

FITZPATRICK, R. E.; WIJEYEWICKREMA, L. C.; PIKE, R. N. The gingipains: Scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future Microbiology*, v. 4, n. 4, p. 471–487, 2009.

FONTENOT, R. L.; SINK, C. A.; WERE, S. R.; et al. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Can Vet J*, v. 53, p. 1266-1272, 2012.

FOSTER, T.E.; PUSKAS, B.L.; MANDELBAUM, B.R.; et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *American Journal of Sports Medicine*, v.37, p. 2259-2272, 2009.

- FREY, Y.; RODRIGUEZ, J. P.; THOMANN, A.; et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative Staphylococci from bovine mastitis milk. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 4, p. 2247–2257, 2013.
- FRIEDRICH, R.; PANIZZI, P.; FUENTES-PRIOR, P.; et al. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*, v. 425, n. 6957, p. 535–539, 2003.
- GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacology e Therapeutics*, v.108, p.180-192, 2005.
- GARCÍA, M. C.; RODRÍGUEZ, M. J.; BERNARDO, A.; et al. Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 23–33, 2002.
- GIANNOBILE, W.V. *Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfers*. In: Tissue Engennering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Illinois: Quintessense, 1999. p.231-243.
- GILBERTIE, J. M.; LONG, J. M.; SCHUBERT, A. G.; et al. Pooled platelet-rich plasma lysate therapy increases synoviocyte proliferation and hyaluronic acid production while protecting chondrocytes from synoviocyte-derived inflammatory mediators. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 5, n. JUL, p. 1–11, 2018.
- GILGER, B. C. *Equine Ophthalmology 1th ed. Equine ocular examination: basic and advanced diagnostic techniques*, Elsevier, Missouri, 2005. p. 25-27.
- GIRALDO, C. E.; LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. E.; et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research*, v. 9, 2013.
- GRONDIN, T. M.; DEWITT, S. F. Normal hematology of the horse and donkey. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Ed.) *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Iowa, Wiley-Brackwell, 2010. p. 821-828.
- GUANÍ-GUERRA, E.; SANTOS-MENDOZA, T.; LUGO-REYES, S. O.; et al. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*, v. 135, n. 1, p. 1–11, 2010.
- HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C.; et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.*, v.236, p.1-26, 1996.
- HAMPSON, E. C.; GIBSON, J. S.; BAROT, M; et al. Identification of bacteria and fungi sampled from the conjunctival surface of normal horses in South-East Queensland, Australia. *Veterinary Ophthalmology*, v. 22, n. 3, p. 265–275, 2019.
- HAMZEH-COGNASSE, H.; DAMIEN, P.; CHABERT, A.; et al. Platelets and infections - Complex interactions with bacteria. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 1–18, 2015.
- HARRISON, P.; HORTON, A.; GRANT, D.; et al. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol*, v. 108, n. 2, p. 228-235, 2000.
- HARTLEY, P. S. Platelet senescence and death. *Clinical laboratory*, v. 53, n. 3-4, p. 157-166, 2007.
- HAUSCHILD, T.; SCHWARZ, S. Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 50, n. 5, p. 241–246, 2003.

- HAUSCHILD, T.; ŚLIZEWSKI, P.; MASIEWICZ, P. Species distribution of staphylococci from small wild mammals. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 33, n. 8, p. 457–460, 2010.
- HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. *Research in Veterinary Science*, v. 82, n. 1, p. 1–6, 2007.
- HEDIN, G.; WIDERSTROM, M. Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v.17, p. 673–675, 1998.
- HERITAGE, J.; EVANS, E. G.; KETTINGTON, R.A. The human commensal flora. *Microbiology in Action. Cambridge University Press*, v. 6, p.121-130, 2003.
- HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. *Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia*. In: *Fundamentos em Hematologia*. Artmed, 2004. cap.18, p.244-257.
- HORRI, T.; SUZUKI, Y.; KIMURA, T.; et al. Intravenous catheter-related septic shock caused by *Staphylococcus sciuri* and *Escherichia vulneris*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 33, n. 12, p. 930–932, 2001.
- INTRAVIA, J.; ALLEN, D.A.; DURANT, T.J.; et al. In-vitro evaluation of the antibacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. *Muscles Ligaments Tendons Journal*, v. 8, n. 4(1), p. 79-84, 2014.
- JOHNS, I. C.; BAXTER, K.; BOOLER, H.; et al. Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Veterinary Ophthalmology*, v. 14, n. 3, p. 195–199, 2011.
- KAPLAN, D. R.; CHAO F. C.; STILES C. D.; et al. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood*. v. 53, n. 6 43–52, 1979.
- KAREY, P.; SIRBASKU, A. Human platelet-derived mitogens. II Subcellular localization of insulinlike growth factor I to the alpha-granule and release in response to thrombin. *Blood*. v. 74, n. 3, 1989.
- KARPATKIN, S. Heterogeneity of human plaquets. VI. Correlation of platelet function with platelet volume. *Blood*, v. 51, n. 2, p. 307-316, 1978.
- KELLER, R. L.; HENDRIX, D. V. H. Bacterial Isolates and Antimicrobial Susceptibilities in Equine Bacterial Ulcerative Keratitis (1993–2004). *Equine vet. J.*, v. 37, n. 3, p. 207-211, 2005.
- KHOSRAVI, A. R.; NIKAEIN, D.; SHARIFZADEH, A.; et al. Ocular fungal flora from healthy horses in Iran. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 24, n. 1, p. 29–33, 2014.
- KLOOS, W. E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 34, p. 559–592, 1980.
- KOLAWOLE, D. O.; SHITTU, A. O. Unusual recovery of animal *Staphylococci* from septic wounds of hospital patients in Ile-Ife, Nigeria. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 24, p. 87–90, 1997.
- KULSTAD, E. B.; KULSTAD, C. E.; LOVELL, E. O. A rapid quantitative turbimetric ddimer assay has high sensitivity for detection of pulmonary embolism in the ED. *American Journal Of Emergency Medicine*, v. 22, n. 2, p. 111-114, 2004.
- LALKO, C. C.; DEPPE, E.; ULATOWSKI, D.; et al. Equine platelet CD62P (P-selectin) expression: a phenotypic and morphologic study. *Vet Immunol Immunopathol*, v.2, p.119-134, 2003.
- LARPENT, J.; LARPENT-GOURGAUD, M. *Microbiologia Práctica*. Editora da Universidade de São Paulo, 1975. p. 130-132.

- LI, X.; IWAI, T.; NAKAMURA, H.; et al. An ultrastructural study of Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation. *Thrombosis Research*, v. 122, n. 6, p. 810–819, 2008.
- LOHNER K. Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents. *Curr Top Med Chem*. v. 17, n. 5, p. 508–519, 2017.
- LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. E.; CARMONA, J. U. Temporal bacteriostatic effect and growth factor loss in equine platelet components and plasma cultured with methicillin-sensitive and methicillin-resistant staphylococcus aureus: A comparative in-vitro study. *Veterinary Medicine International*, v.67, p.105-115. 2014.
- LOPEZ, S.; VILAR, J. M.; SOPENA J. J.; et al. Assessment of the Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Traumatic Canine Fractures. *Int J Mol Sci*. 2019
- LOWY, F. D. antimicrobial resistance: the example of SA. *Journal of Biolaw and Business*, v. 3, n. 3, p. 53–59, 2003.
- LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, n. 5, p. 966–969, 2006.
- MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; BENDER, S. K.; et al. *Microbiologia de Brock*. 14ª Edição. Porto alegre. Artmed, 2016.
- MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1858, n. 5, p. 936–946, 2016.
- MAMMOTO, T.; JIANG, A.; JIANG, E.; et al. Platelet rich plasma extract promotes angiogenesis through the angiopoietin1- Tie2 pathway. *Microvasc Re*, v. 89, p.15- 24, 2013.
- MARIANI, E.; FILARDO, G.; CANELLA, V.; et al. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in-vitro. *Cytotherapy*, v. 16, n. 9, p. 1294-304, 2014.
- MARQUES, A. P. *Plasma rico em plaquetas e mastite bovina: Protocolo de obtenção, atividade in-vitro e resposta da glândula mamária*. 2014. Dissertação (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio do Janeiro.
- MARSOLAIS, D.; FRENETT, J. Inflammation and tendon healing. *Médecine Sciences, Paris*, v. 21, n. 2, p. 180-186, 2005.
- MARX, R.E. Platelet-rich plasm: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.62, p.489-496, 2004.
- MATTOSINHO, O. R. *Alterações hematológicas e bioquímicas em equinos crioulos e quarto de milha durante a prova de laço comprido*. 2018. Dissertação de (Mestrado em Clinicas veterinarias) Universidade Estadual de Londrina.
- MCADOW, M.; KIM, H. K.; DEDENT, A. C.; et al. Preventing staphylococcus aureus sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 10, 2011.
- MCCARREL, T. M.; MINAS, T.; FORTIER, L.A. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Jt Surg Am*, v. 94, p. 1–8, 2012.
- MCCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal Growth Factor Release from Platelet-Rich Plasma, Trehalose Lyophilized Platelets, and Bone Marrow Aspirate and Their Effect of Tendon and Ligament Gene Expression. *J. Orthopaedic Res.*, v.27, p.1033-1042, 2009.

- MCFARLAND, D. C.; ZHANG, C.; THOMAS, H. C.; et al. Confounding effects of platelets on flow cytometric analysis and cell-sorting experiments using blood-derived cells. *Intern Society for Analytl Citol, Cytom Part A*, v. 69A, p. 84-94, 2005.
- MEINEL, L.; ZOIDIS, E.; ZAPF, J.; et al. Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone*, v. 33, n. 4, p. 660–672, 2003.
- MEYERS, K. M.; HOLMSEN, H.; SEACHORD, C. L. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J of Physiol*, v. 43, p. 454-461, 1982.
- MIAJLOVIC, H.; ZAPOTOCZNA, M.; GEOGHEGAN, J. A.; et al. Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of *Staphylococcus aureus* with the GPIIb/IIIa receptor on platelets. *Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 920–928, 2010.
- MIRANDA, A. L. *Influência do anticoagulante na obtenção e criopreservação do plasma rico em plaquetas em equinos e muares*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciencia Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MISTOU, M. Y.; SUTCLIFFE, I. C.; VAN SORGE, N. M. Bacterial glycobiology: Rhamnose-containing cell wall polysaccharides in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 40, n. 4, p. 464–479, 2016.
- MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O. M.; THEORET, C. L. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 70, n. 2, p. 277–282, 2009.
- MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci among horses, personnel and environmental sites at equine facilities. *Veterinary Microbiology*, v. 137, n. 3, p. 397–401, 2009.
- MOOJEN, D. J.; EVERTS, P. A.; SCHURE, R. M.; et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against staphylococcus aureus. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 26, n. 3, p. 404–410, 2008.
- NAM, H. M.; LIM, S. K.; KIM, J. M.; et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* v. 20, p. 1446-1449, 2010.
- NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. 6^a Ed Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically: Approved Standar. Pennsylvania: WAYNE. 2003.
- NEMEGHAIRE, S.; ARGUDÍN, M. A.; FESSLER, A. T.; et al. The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 342–356, 2014a.
- NEMEGHAIRE, S.; ARGUDÍN, M. A.; HAESBROUCK, F.; et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* in healthy chickens. *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 357–363, 2014b.
- NETO, H. S. *Estudo da citologia e microbiota conjuntival fúngica de éguas quarto de milha oriundas da zona da mata e agreste pernambucanos*. 2016. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- OLIVEIRA, J.G. *Caracterização da microbiota conjuntival de equinos hígidos, em diferentes*

- condições de manejo, em dois municípios de Minas Gerais*. 2019 Monografia de Residência em medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PAES LEME, F. O.; WURZINGER, L. J.; VASCONCELOS, A. C.; et al. Ativação de plaquetas de eqüinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 149–157, 2006.
- PAPAMANOLI, E.; KOTZEKIDOU, P.; TZANETAKIS, N.; et al. Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*, v. 19, n. 5, p. 441–449, 2002.
- PEERSCHKE, E.; YIN, W.; GHEBREHIWET, B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 13, p. 2170–2175, 2010.
- PELAGALLI, A.; BELISARIO, M. A.; TAFURI, S; et al. Adhesive Properties of Platelets from Different Animal Species. *J Comp Path*, v. 128, p. 127-131, 2003.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e aplicações*. 2ª Edição. Pearson Education do Brasil, 1997. p. 54-56.
- PEREIRA, J. Estructura, producción, cinética y función de las plaquetas. Em: Mezzano, D., Pereira, J. *Fisiología de la Sangre*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, p.145-176, 1993.
- PEREIRA, J. La Fisiopatología de la hemostasia: algunos aspectos sobre la vida y muerte de las plaquetas en la circulación, *Boletín Escuela de Medicina U.C.*, Pontificia Universidad Católica de Chile, v.33, p.5-19, 2008.
- PETERSEN, H. J.; KEANE, C.; JENKINSON, H. F.; et al. Human platelets recognize a novel surface protein, PadA, on *Streptococcus gordonii* through a unique interaction involving fibrinogen receptor GPIIb/IIIa. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 1, p. 413–422, 2010.
- PHAM, A.V.; TRAN, T. P.; LUONG, T. M. Antimicrobial Effect of Platelet-Rich Plasma against *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Dentistry*, v. 2019, 2019.
- PICCIONE, G.; CASELLA, S.; GIANETTO, C.; et al. Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse. *J of Equi Vet Sci*, v. 30, p. 371-375, 2010.
- PIERCE, G. F.; MUSTOE, T. A.; ALTROCK, B. W.; et al. Role of platelets-derived growth factoring wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.45, n.4, p.319-326, 1991.
- PLUMMER, C.; WU, H.; KERRIGAN, S. W.; et al. A serine-rich glycoprotein of *Streptococcus sanguis* mediates adhesion to platelets via GPIb. *British Journal of Haematology*, v. 129, n. 1, p. 101–109, 2005.
- PONTUAL, M. A.; MAGINI, R. S. *Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento*. São Paulo: Santos, 2003. p. 308.
- REBAR, A. H.; FELDMAN, B. F. *Guia de hematologia para cães e gatos*. 1 ed., São Paulo: Roca, 2003. p. 133-156.
- RIBEIRO, M. V.; MELO, V. F.; BARBOSA, M. E.; et al. The use of platelet rich-plasma in ophthalmology: A literature review. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 76, n. 6, p. 319–324, 2017.
- ROSIER, R. N.; O'KEEFE, R.J.; HICKS, D.G. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clinical Orthopaedics Related Research*, v.355, p.294-300, 1998.

- RUSHTON, J. O.; KAMMERGRUBER, E.; TICHY, A.; et al. Effects of three blood derived products on equine corneal cells, an in-vitro study. *Equine Veterinary Journal*, v. 50, n. 3, p. 356–362, 2018.
- SCHÄR, M. O.; DIAZ-ROMERO, J.; KOHL, S. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in-vitro. *Clin Orthop Relat Res.* v. 473, p. 1635–1643, 2015.
- SCHMAIER, A. H.; SMITH, P. M.; COLMAN, R. W. Platelet C1 - inhibitor. A secreted alpha-granule protein. *Journal of Clinical Investigation*, v. 75, n. 1, p. 242–250, 1985.
- SEGABINAZZI, L. G.T.M.; CANISSO, I. F.; PODICO, G.; et al. Intrauterine blood plasma platelet-therapy mitigates persistent breeding-induced endometritis, reduces uterine infections, and improves embryo recovery in Mares. *Antibiotics*, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2021.
- SEGURA, D.; MONREAL, L.; PÉREZ-PUJOL, S. et al. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *J Vet Intern Med*, v. 20, p. 581-588, 2006.
- SEIDEL, S. R. *Correlação entre concentrações plaquetarias e de fator de crescimento TGF- β presente em plasma rico em plaquetas de equinos*. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SHITTU, A.; LIN, J.; MORRISON, D.; et al. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 51–55, 2004.
- SILVA, L. R. *Classificação do Teste de Cristalização da Lágrima em Equinos Hígidos e sua Correlação Com a Avaliação da Superfície Ocular*. 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- SOUZA, G. P. *Avaliação de procedimentos para contagem de *saccharomyces cerevisiae* em sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)*. 2008. Dissertação de Mestrado (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas.
- STEPANOVIĆ, S.; DAKIĆ, I.; DJUKIĆ, S.; et al. Surgical wound infection associated with *staphylococcus sciuri*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 34, n. 9, p. 685–686, 2002.
- STEPANOVIC, S.; DIMITRIJEVIC, V.; VUKOVIC, D.; et al. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. *Vet. Microbiol.* v. 82, p.177–185, 2001.
- STEPANOVIĆ, S.; JEŽEK, P.; DAKIĆ, I.; et al. *Staphylococcus sciuri*: An unusual cause of pelvic inflammatory disease. *International Journal of STD and AIDS*, v. 16, n. 6, p. 452–453, 2005.
- STEPANOVIĆ, S.; JEŽEK, P.; VUKOVIĆ, D.; et al. Isolation of Members of the *Staphylococcus sciuri* Group from Urine and Their Relationship to Urinary Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 11, p. 5262–5264, 2003.
- SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*, v. 39, p. 2135–2140, 2011.
- TABLIN, F. *Platelet structure and function*. Schalman's Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2000. p.448-452.
- TANG, Y.Q.; YEAMAN, M.R.; SELSTED, M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infection and Immunity*, v. 70, p.6524-6533, 2002.

- TEXTOR, J. Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, v. 27, n. 2, p. 275–298, 2011.
- TORTORA, J. G.; FUNKE, R. B.; CASE, L. C. *Microbiologia*. 12ª Edição. Porto alegre, Artmed, 2017.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 6ª Edição. São Paulo, Atheneu, 2015.
- TRIER, D. A.; GANK, K. D.; KUPFERWASSER, D.; et al. Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X1 and P2Y12 receptor-induced activation and kinocidin release. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 12, p. 5706–5713, 2008.
- UGOCHUKWU, E. I.; AGWU, C. O. Aerobic bacteria from nasal discharge of goats suffering from clinical PPR: isolation and identification. *Microbios*. v. 65, p. 81-85, 1991.
- USUI, Y.; OHSHIMA, Y.; ICHIMAN, Y.; et al. Platelet Aggregation Induced by Strains of Various Species of Coagulase-Negative Staphylococci. *Microbiology and Immunology*, v. 35, n. 1, p. 15–26, 1991.
- UVELL, H.; ENGSTRÖM, Y. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends in Genetics*, v. 23, n. 7, p. 342–349, 2007.
- VARSHNEY, S.; DWIVEDI, A.; PANDEY, V. Antimicrobial effects of various platelet rich concentrates-vibes from in-vitro studies-a systematic review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, v. 9, n. 4, p. 299–305, 2019.
- VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A.M.; MORAES, L.F; et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pes. Ve. Bra.*, v.32, n.2, p. 106-110, 2012.
- VERCRUYSSSE, E. M.; NARINX, F. P.; RIVES, A. C.; et al. Equine ulcerative keratitis in Belgium: Associated bacterial isolates and in-vitro antimicrobial resistance in 200 eyes. *Veterinary ophthalmology*, Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vop.12985>, 2022.
- VILAR, J. M.; MORALES, M.; SANTANA, A.; et al. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Veterinary Research*, v. 9, 2013.
- VILELLA, D.L. *Terapia tópica de úlceras crônicas de perna com plasma rico em plaquetas (PRP): Revisão sistemática da literatura*. 2007. Dissertação (Mestrado em Enfermagem), Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- WADA, S.; HOBBO, S.; NIWA, H. Ulcerative Keratitis in Thoroughbred Racehorses in Japan from 1997 to 2008. *Vet. Ophthalmol.*, v. 13, n. 2, p. 99–105, 2010.
- WALLET, F.; STUIT, L.; BOULANGER, E.; et al. Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Scand. J. Infect. Dis.* v. 32, p. 697–698, 2000.
- WASELAU, M.; SUTTER, W. W.; GENOVESE, R. L.; et al. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 232, n. 10, p. 1515–1520, 2008.
- WU, X.; REN, J.; YUAN, Y.; et al. Antimicrobial properties of single-donor-derived, platelet-

- leukocyte fibrin for fistula occlusion: An in-vitro study. *Platelets*, v. 24, n. 8, p. 632–636, 2013.
- XAVIER, R. M.; DORA, J. M.; BARROS, E. *Laboratório na Prática Clínica*, 3ª edição. ArtMed, 2016.
- YAMADA, A. L.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, P. G.; et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: Avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 2, p. 318–322, 2012.
- YANG, D.; CHEN, Q.; HOOVER, D. M.; et al. Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 74, n. 3, p. 448–455, 2003.
- YEAMAN, Michael R. Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n. 4, p. 525–544, 2010.
- YUAN, T.; ZHANG, C. Q.; ZENG, B. F. Treatment of chronic femoral osteomyelitis with platelet-rich plasma (PRP): A case report. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 38, p. 167- 173, 2008.
- ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

9. ANEXOS

Anexo - 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

COMPROVANTE

Comprovamos o recebimento da solicitação de uso de animais para o projeto intitulado

"ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN-VITRO* DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA MICROBIOTA OCULAR NORMAL DE EQUINOS HÍGIDOS DE DOIS MUNICÍPIOS DE MINAS GERAIS.", protocolo do CEUA: 231/2020 sob a responsabilidade de Renata de Pino Albuquerque Maranhao que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino).

Belo Horizonte, 23/10/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo - 2

CARTA DE ANUENCIA

Eu, Fabiola Paez Lemes inscrito sob RG 20945432-5 SSP/SP e CPF 091.233.158-57 CRMV MG 9471 autorizo a realização do experimento intitulado “Atividade antimicrobiana *in-vitro* do plasma rico em plaquetas (PRP) na microbiota ocular normal de equinos hípidos de dois município de Minas Gerais” (protocolo CEUA/UFMG 231/2020), sob orientação da professora Renata de Pino Albuquerque Maranhão, no MULTILAB da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a ser conduzido pelo mestrando Luis Ernesto Campos Torres, RNM F065706-1, CPF 097.797.591-66, inscrito na pós-graduação em Ciência Animal da Escola de veterinária da UFMG.

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2020.

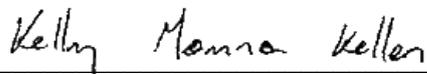


Assinatura do Responsável

Anexo - 3**CARTA DE ANUENCIA**

Eu, Kelly Moura Keller inscrito sob RG 12300170-3 e CPF 085.878.127-18 CRMV MG 13579 autorizo a realização do experimento intitulado “Atividade antimicrobiana *in-vitro* do plasma rico em plaquetas (PRP) na microbiota ocular normal de equinos hípidos de dois município de Minas Gerais” (protocolo CEUA/UFMG 231/2020), sob orientação da professora Renata de Pino Albuquerque Maranhão, no Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a ser conduzido pelo mestrando Luis Ernesto Campos Torres, RNM F065706-1, CPF 097.797.591-66, inscrito no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

Belo Horizonte, 19 de outubro de 2020.



Assinatura do Responsável