

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

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA ENTRE SORO AUTÓLOGO E  
LISADO PLAQUETÁRIO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E TEMPOS  
DE ARMAZENAMENTO**

**CAMILO OSORIO FLOREZ**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2022**

**CAMILO OSORIO FLOREZ**

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA ENTRE SORO AUTOLOGO E  
LISADO PLAQUETARIO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E TEMPOS  
DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária, 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

F634c Florez, Camilo Osorio, 1996 -  
Caracterização comparativa entre soro autólogo e lisado plaquetario sob diferentes temperaturas e sob diferentes temperaturas e tempos de armazenamento / Camilo Osorio Florez . – 2022. 58f.: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 Mestrado.  
Bibliografia: f. 47 a 55.

1. Equino - Teses - 2. Plaquetas - Sangue - 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

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILO OSORIO FLOREZ

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). Priscila Fantini

Dr.(a). Jorge Uriel Carmona Ramírez



Documento assinado eletronicamente por **Renata de Pino Albuquerque Maranhão, Professora do Magistério Superior**, em 07/06/2022, às 10:13, 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 20:36, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1477627** e o código CRC **235BF2A9**.



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - CAMILO OSORIO FLOREZ

Às 09:30 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:

“CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA ENTRE SORO AUTOLOGO E LISADO PLAQUETÁRIO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO”

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	
Priscila Fantini	X	
Jorge Uriel Carmona Ramírez	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 14:14, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1477598** e o código CRC **48B749BA**.

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo y logro a mis padres Mario Osorio y Adalgiza Florez, a mi hermana Valentina Osorio Florez, por siempre ser esa llama, de fortaleza y clareza en los momentos más difíciles, de este camino de aprendizaje que fue la maestría. Por motivarme a continuar, por ser una ayuda constante en cada paso de mi vida.*

*A mi abuela Flor María, por su forma incondicional de ser conmigo, por el amor el cariño y la guía que siempre me dio para verme progresar.*

*A mis abuelos Alejandro Florez y Octavio Osorio, que recientemente dejaron este plano terrenal, que en vida me aconsejaron, guiaron, para siempre mejorar como ser humano.*

*A los seres más importantes de mi vida, que los llevo en mi corazón.*

## AGRADECIMENTOS

A mi familia, mi padre Mario Osorio, mi madre Adalgiza Florez, mi hermana Valentina Osorio Florez, por darme la oportunidad de estar aquí, por el soporte, la confianza de alcanzar mis metas profesionales, fuera de mi país de origen. También por el amor, el cariño y la fortaleza que siempre me dieron desde la distancia.

A Jennifer Jazmín Castro Palma e Luis Ernesto Campos Torres, que más que mis amigos, se convirtieron, en mi segunda familia aquí en Brasil, acompañándome en los momentos de tristeza y de felicidad, haciendo la estadía aquí mucho más amena y emocionante.

Aos meus conterrâneos colombianos, pela amizade, pelos bons momentos e conselhos. Felipe Colmenares, Sebastian Gutierrez, Natalya Maldonado.

A professora Renata de Pino Albuquerque Maranhão, por me aceitar como orientado aqui no Brasil, por me mostrar como funciona a pesquisa, por me dar tranquilidade nos momentos de tensão, e que apesar das dificuldades da pandemia, sempre achou um jeito de avançar, e culminar da melhor forma o processo do mestrado.

Aos professores e colegas da escola de veterinária que contribuíram no meu desenvolvimento pessoal e profissional, tornando-se companheiros de profissão e de vida. Renata Maranhão, Priscila Fantini, Raffaella Teixeira, Fabiola Paes Leme, Jorge Tibúrcio, Jessica Guerra. Muito obrigado.

Aos colegas de graduação, Henrique Lobato e Giovanna Debeche, sua ajuda e disposição foi muito importante, fazendo com que o desenvolvimento pratico da pesquisa acontecera sempre da melhor forma. Muito obrigado.

Aos professores Jorge Uriel Carmona e Catalina López da *Universidade de Caldas*, Colômbia, por sempre estar dispostos em compartilhar seu conhecimento e ajudar e responder dúvidas relacionadas ao projeto de pesquisa.

Aos companheiros e amigos que o Brasil me deu, que me permitiram a oportunidade de conhecer da cultura, das comidas, do jeito de ser das pessoas, e que me fizeram passar momentos muito legais, neste país irmão.

A Escola de Veterinária da UFMG pela acolhida durante o estágio obrigatório e durante o mestrado, pela oportunidade desenvolver meus estudos, e pela ajuda para realizar a pesquisa.

A CAPES pelo suporte financeiro durante minha estadia no brasil.

*A dúvida é desagradável, mas a certeza é ridícula.*

*(Voltaire)*

*La duda es un estado incomodo, pero la certeza es un estado ridículo.*

*(Voltaire)*

## RESUMO

As terapias com soro autólogo e o lisado plaquetário têm se mostrado promissoras dentre os hemoderivados e produtos biológicos. Na oftalmologia, o soro autólogo constitui uma alternativa superior aos colírios tradicionais no tratamento de enfermidades oculares. Recentemente, o lisado plaquetário (LP) foi considerado uma alternativa mais interessante de tratamento para múltiplos tecidos por ter uma menor reação desfavorável que o plasma rico em plaquetas (PRP) tradicional, o qual o converte em um hemoderivado interessante para se usar na terapia ocular. Entretanto, a literatura veterinária não contempla uma comparação definitiva entre os dois, em relação ao conteúdo de Fator de Crescimento Transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1), proteínas, e outros elementos importantes para a utilização no tecido ocular, além da segurança respeito à contaminação durante um período de armazenamento. Assim, o objetivo desse estudo foi estimar a concentração do TGF- $\beta$ 1, um dos fatores de crescimento majormente envolvido na terapia ocular, assim como as proteínas com possível função terapêutica e a possível contaminação bacteriana do soro autólogo e do lisado plaquetário em equinos, ao longo de um período de armazenamento de 8 dias. Para produção do soro autólogo, foram coletados 63 ml de sangue por animal em 7 tubos de 9 ml sem anticoagulante. Para o lisado plaquetário, foram coletados 180 ml de sangue em 50 tubos de 3,6 ml com citrato de sódio ao 3,2%. O processamento foi desenvolvido com técnicas já estabelecidas na literatura, ademais de modificações adaptadas em nosso laboratório. As variáveis estudadas nesse período de armazenamento foram: concentração do fator de crescimento (FC), perfil proteico (proteína total e albumina) e crescimento bacteriano expressado em unidades formadoras de colônia (UFCs). Os achados relevantes foram a relação que tem as plaquetas basais, com o número de concentração plaquetária no PRP; a correlação entre o fator de crescimento e as plaquetas concentradas no PRP; maior quantidade de fator de crescimento no LP; maior quantidade de fator de crescimento para os dois produtos no grupo de armazenamento de temperatura a 37°C, maior concentração de proteínas no soro, tanto (proteína total e albumina). Em relação à contaminação bacteriana, obtivemos resultados de maior contaminação quando os produtos foram armazenados a 37°C e apesar de que a diferença não foi estatisticamente significativa, teve maior contaminação o LP em comparação ao soro autólogo.

**Palavras-chaves :LP, SA, equinos, fatores de crescimento, TGF- $\beta$ 1, regenerativa.**

## **ABSTRACT**

Therapies with autologous serum and lysed platelet-rich plasma have shown promise among blood products and biological products. In ophthalmology, the autologous serum is a superior alternative to traditional eye drops in the treatment of eye diseases. Recently, lysed platelet-rich plasma (LP) has been considered a more interesting alternative treatment for multiple tissues because it has a lower unfavorable reaction than traditional PRP, which converts it into an interesting blood product to be used in ocular therapy. However, the veterinary literature does not provide a definitive comparison between the two, regarding the content of transforming growth factor-beta 1, proteins, and other important elements for use in ocular tissue, in addition to safety regarding contamination during a storage period. Thus, the objective of this study is to estimate the concentration of TGF- $\beta$ 1, one of the growth factors most involved in ocular therapy, as well as proteins with possible therapeutic function and possible bacterial contamination of autologous serum and lysed platelet-rich plasma in horses, over a storage period of 8 days. For the production of autologous serum, 63 ml of blood were collected per animal in 7 tubes of 9 ml without anticoagulant. For lysed PRP, 180 ml of blood were collected in 50 3.6 ml tubes with 3.2% sodium citrate. Processing was performed using techniques already established in the literature, in addition to modifications adapted in our laboratory, the two blood products were aliquoted into three vials, one of 1.5 ml and two of 0.5 ml for further analysis. For each of the treatments, one of the vials was destined for analysis by a commercial FC ELISA kit (TGF beta-1) and the other two, for the measurement of proteins and plating on blood Ágar, respectively, at the following time intervals storage time: 0, 4 and 8 days. The variables studied in this storage period were: CF concentration, protein profile (total protein and albumin) and bacterial growth expressed in colony-forming units (CFUs). The results obtained were submitted to normality tests. Where the comparison between the averages of the level of platelet, leukocyte, growth factor, proteins, and amount of CFUs was performed. The relevant findings were the relationship between basal platelets and the number of platelet concentrations in PRP; the correlation between growth factor and PRP-concentrated platelets; the greater amount of growth factor in LP; the higher amount of growth factor for the two products in the temperature storage group at 37°C, a higher concentration of serum proteins, both (PTT and albumin); in terms of bacterial contamination, we obtained results of greater contamination when the products were stored at 37°C and although the difference was not statistically significant, the LP had more contamination compared to the autologous serum.

**Keywords:** LP, AS, equines, growth factors, TGF- $\beta$ 1, regenerative.

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Garrafa de lavagem da lavadora de microplacas .....	31
<b>Figura 2.</b> Lavadora de microplaca veterinário bioclin .....	31
<b>Figura 3.</b> TGF- $\beta$ 1 STARDAR Padrão TGF $\beta$ 1 .....	32
<b>Figura 4.</b> Leitor de ELISA e Fotômetro de Microplacas Multiskan FC .....	33
<b>Figura 5.</b> Tela do leitor de microplacas veterinário .....	33
<b>Figura 6.</b> Gráficos de dispersão, sendo (R) o valor da correlação de Spearman e P, o valor dessa correlação. Correlação estatística da concentração de plaquetas (PLT), leucócitos (WBC), eritrócitos (RBC) no PRP, em comparação com os valores das mesmas células presentes no sangue total. ....	36
<b>Figura 7.</b> Valores representado a frequência de unidades formadoras de colônias UFCs, em relação ao produto, e à temperatura, achando que a temperatura de 37°C teve maior contaminação para ambos os produtos com resultado significativo $p= 0.004$ . ....	38
<b>Figura 8.</b> Valores médios da proteína total e albumina, expressados (mg/mL) para cada um dos produtos, LP e soro autólogo. Mostrando maior concentração no SA para as duas proteínas, com valor para proteína total de $P=0.002$ e albumina $p= 0.005$ . ....	38
<b>Figura 9.</b> Valores da albumina e proteína total expressada em (mg/mL). Relacionando a influência do tempo (0,4,8 dias) e a temperatura (4°C) e (37°C) sobre as concentrações no LP e AS. ....	39
<b>Figura 10.</b> Valores representando a concentração do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 valores expressados em (pg/mLx10 <sup>3</sup> ), presente no LP e no SA. Em relação à temperatura (4°C) e (37°C); tempo de armazenamento (0, 4, 8) dias. ....	40
<b>Figura 11.</b> Gráfico de dispersão com os valores numéricos, sendo o valor da correlação $R= 0,8$ de Spearman e P, o valor $P= 0.333$ significativo dessa correlação. Correlação entre a concentração plaquetária e a concentração de fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 expressada em pg/mL .....	41

---

## LISTA DE TABELA

---

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos fatores de crescimento; características e função em diversos processos biológicos.	20
<b>Tabela 2.</b> Concentrações de diversos compostos presentes no lisado plaquetario, valores expressados em (mg/mL) e (ng/mL). (Burnouf et al., 2016)	22
<b>Tabela 3.</b> Concentrações de proteína total e albumina expressada em (mg/mL). Concentrações de TGF- $\beta$ 1 expressado em (pg/ml). Para a espécie equina, no soro autólogo e no lisado plaquetario.	27
<b>Tabela 4.</b> Concentrações do número de plaquetas, leucócitos, eritrócitos presentes no sangue total e a concentração plaquetária após o processamento do de PRP. Na espécie equina – Belo Horizonte- 2022	35
<b>Tabela 5.</b> Valores médios de plaquetas, eritrócitos, leucócitos por microlitro após o protocolo de LP, realizado por 3 ciclos de congelamento (-80°C), por 30 minutos em $\mu$ L trafrezzer, e descongelamento, a (37°C) por 10 minutos em banho maria, realizado na espécie equina.	36
<b>Tabela 6.</b> Valores médios de UFCs para ambos os produtos, na temperatura de 37 e 4°C	37
<b>Tabela 7.</b> Valores médios em (mg/mL) da concentração de proteína total (PTT) e albumina (ALB) para o LP e o soro autólogo para 7 animais.	38
<b>Tabela 8.</b> Mensuração da concentração média do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 em pg/mL para ambos os produtos, em relação aos três tempos, temperatura de armazenamento.	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP:** Adenosina difosfato

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EGF:** Fator de crescimento epidermal

**FC:** Fatores de crescimento.

**FGF:** Fator de crescimento de fibroblastos

**g:** Gauss

**GF:** Growth factor

**IgA:**

Imunoglobulina A

**IgE:**

Imunoglobulina E

**IGF:** Fator de crescimento insulínico tipo 1

**IgG:** Imunoglobulina G

**IgM:** Imunoglobulina M

**MALDI TOF:** Espectrometria de massa de luz de tempo de ionização de dessorção assistida por matriz

**MEC:** Matriz extracelular

**mg:**

Miligramas

**mL:** Mililitros

**NM:**

Nanômetros

**PDGF:** Fator de crescimento derivado das plaquetas.

**Pg:** Picogramas

**P-PRP:** Plasma rico em plaquetas puro **PRGF:**

Plasma rico em fatores de crescimento **PRP:**

Plasma rico em plaquetas

**LP:** Lisado plaquetário

**RPM:** Revoluções por minuto

**SA:** Soro autólogo

**TGF- $\beta$ 1:** Fator de crescimento transformante - beta 1

**UFC:** Unidades formadoras de colônias

**$\mu$ L:** Microlitros

**$\mu$ m:** Micrometros

**VEGF:** Fator de crescimento endotélio vascular.

## SUMARIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE TABELA</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 Plaquetas</b> .....	15
<b>2.2 Plasma rico em plaquetas</b> .....	16
<b>2.3 Fatores de crescimento.</b> .....	18
<b>2.4 Lisado Plaquetário</b> .....	22
<b>2.5 Processo de lise plaquetária.</b> .....	24
<b>2.6 Soro autólogo</b> .....	25
<b>3. MATERIAL E METODOS</b> .....	27
<b>3.1 Animais</b> .....	27
<b>3.2 Obtenção dos hemoderivados</b> .....	28
3.2.1 Obtenção de soro autólogo (SA).....	28
3.2.2 Obtenção de LP .....	28
3.2.3 Lisado plaquetário .....	29
<b>3.3 Mensuração de proteína total e albumina</b> .....	30
<b>3.4 ELISA TGF beta-1 humano</b> .....	30
3.4.1 Reagente tampão de lavagem .....	30
3.4.2 Reagentes tampão ensaio (1x) .....	31
3.4.3 Reagente conjugado de biotina.....	31
3.4.4 Reagente estreptavidina-HRP .....	31
3.4.5 Reagente padrão humano TGF- $\beta$ 1 .....	32
<b>3.5 Desenvolvimento da técnica</b> .....	32
<b>3.6 Contaminação bacteriana dos hemoderivados</b> .....	34
<b>3.7 Análise estatística</b> .....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	35
<b>4.1 Processamento e características dos produtos obtidos.</b> .....	35
<b>4.2 Contaminações bacterianas nos produtos LP e SA</b> .....	37
<b>4.3 Proteína total e albumina nos diferentes produtos LP e AS</b> .....	38
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>1. ANEXOS</b> .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história a medicina veterinária tem procurado alternativas terapêuticas para o correto manejo de distintas lesões nos animais. Os hemoderivados e concentrados plaquetários têm ganhado popularidade por seus efeitos na velocidade e qualidade na reparação de inúmeros tecidos (Maia e De Souza 2009).

Dentre os hemoderivados mais comumente utilizados, cita-se o PRP e o soro autólogo (SA). O PRP é basicamente um produto resultante da centrifugação do sangue total com anticoagulante, rico em plaquetas, citocinas e fatores de crescimento (De Souza et al., 2014). De igual forma, o SA é um hemoderivado extraído mediante a sedimentação e/ou centrifugação do sangue total sem anticoagulante (Ullah et al., 2008); rico em fatores de crescimento e outras moléculas com propriedades benéficas para o reparo tecidual (Lopez et al., 2007; Pan et al., 2017). Os fatores de crescimento são moléculas importantes para acelerar o processo de cicatrização de lesões e estimular a capacidade regenerativa dos tecidos afetados, isto devido ao aumento de mitoses e consequente hiperplasia do epitélio (Mandelbaum et al., 2003; Paganela et al., 2009).

O SA possui fatores de crescimento e outras moléculas com propriedades benéficas visando o reparo tecidual, com ênfase em enfermidades oftálmicas (Anitua et al., 2015a).

O LP é um produto biológico sem composição celular ainda pouco estudado na medicina veterinária. Assim como o PRP, possui o potencial de ajudar no reparo tecidual, mas com menor capacidade imunogênica (Schallmoser et al., 2020; Soares et al., 2021). Ainda não foram realizados estudos que utilizem esse produto nas enfermidades oculares em equinos. Também não se conhece se o armazenamento, visando o uso ao longo do tratamento oftálmico, pode afetar a qualidade do produto final.

A detecção dos FCs tem sido realizada utilizando-se, em sua maioria, kits comerciais de ELISA, previamente validados para equinos em estudos anteriores (Penha et al., 1997; Argüelles et al., 2006; Watts e Rose, 2010). Dentre os FCs estudados, TGF-  $\beta$ 1 é conhecido por ter efeitos quimiotáticos, mitogênicos e de síntese de matriz nos tecidos (Sundman et al., 2011).

Porém, um dos fatores que afetam negativamente o uso desses hemoderivados é o desconhecimento das concentrações de alguns fatores de crescimento, assim como o conteúdo de proteínas e possível contaminação bacteriana que possa acontecer no processamento e dentro dos períodos de armazenamento. Assim, o objetivo desse estudo foi demonstrar e comparar os efeitos do armazenamento sob diferentes temperaturas nos aspectos de contaminação e

composição proteica e do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 do SA e do LP, visando o uso de um produto seguro desde o ponto de vista microbiológico, assim como sua caracterização dos compostos benéficos para o tecido oftálmico em equinos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Plaquetas**

As plaquetas, para diferentes autores, são fragmentos citoplasmáticos não celulares derivados dos megacariócitos provenientes da medula óssea (Everts et al., 2006a; Wroblewski, 2010). A literatura mais recente, porém, afirma que as plaquetas são pequenos fragmentos discoides celulares anucleados, que junto com as hemácias, são as células mais abundantes na circulação sanguínea (Heijnen e Korporaal, 2017), com meia vida no leito vascular de 7 dias nos humanos (Everts et al., 2006a).

A morfologia e o tamanho plaquetário é complexo, podendo variar entre o mesmo animal e as diferentes espécies. No passado, Max Schultze (1865) apresentou que as plaquetas humanas possuíam um tamanho aproximado de 1 -2  $\mu$ m. Mais tarde, outros pesquisadores tentaram obter um dado mais preciso mediante a microscopia, corando as plaquetas com May-Grünwald-Giemsa, o que revelou um diâmetro médio de  $1,7 \pm 0,1 \mu$ m dessas células em repouso nos indivíduos saudáveis (Branchog et al., 1975). Italiano (2003), em seus estudos da morfologia plaquetária, relatou que a plaqueta é uma estrutura de forma discoide, com diâmetro de aproximadamente 4  $\mu$ m e uma espessura de 1  $\mu$ m isto sendo avaliado e visualizado com microscopia eletrônica.

Por outro lado, as plaquetas na espécie equina, são definidas como estruturas discoides que variam de 5-7  $\mu$ m de comprimento e 1-3  $\mu$ m de largura (Leven, 2000; Paes-Leme et al., 2006; Carmona, 2011). Para Gordon et al. (2017), são estruturas ovais ou alongadas que medem de 2,5-3,5 $\mu$ m. No entanto, devido à variedade de tamanho relatada na literatura é possível achar plaquetas > 20  $\mu$ m na corrente sanguínea (Argüelles et al., 2006).

Diversas estruturas e compostos proteicos desempenham diferentes funções no organismo. As principais partes desta célula são descritas: anel de microtúbulos contráteis (citoesqueleto) ao redor de sua periferia, contendo actina, miosina e espectrina (Everts et al., 2006a), além de membrana plasmática, sistema canalicular aberto (ausente na espécie equina), rede de membrana reticular ou retículo endoplasmático liso e organelas citoplasmáticas como mitocôndrias. As anteriores proporcionam à plaqueta suporte para manter sua forma discoide e sua correta movimentação e funcionamento no endotélio vascular (Italiano, 2003; Everts et

al., 2006a; White e Krumwiede, 2007). Além disso, internamente possui grânulos alfa, densos e lisossomais (Pelagalli et al., 2002 e Krumwiede 2007). Morgenstern (1997) afirma que os grânulos alfas são os mais abundantes dentro das plaquetas (50-80 grânulos), constituindo 10% do volume total destas células. A superfície desses grânulos contém uma variedade de proteínas e moléculas (citocinas, quimosinas, fatores de crescimentos, fatores de coagulação, fibronectina) encarregadas de funções como hemostasia primária, modulação inflamatória, e síntese da matriz extracelular, processos de vital importância na cicatrização de feridas (Anitua et al., 2004 e Carmona, 2011). Os grânulos densos (8-10 grânulos por plaqueta) armazenam ATP e ADP, cálcio, fósforo, serotonina que auxiliam e induzem a migração plaquetária e a contração de tecido vascular lesionado (Pelagalli et al., 2002 e Ruiz, 2004). Por último, os grânulos lisossomais contém hidrolases ácidas, guanina, fosfolipases e quinases, que atuam como enzimas proteolíticas e hidrolíticas (Lalko et al., 2003).

## **2.2 Plasma rico em plaquetas**

O Plasma rico em plaquetas (PRP), é um produto biológico, dentre os mais comumente utilizados dentro das terapias regenerativas na medicina humana e veterinária Giraldo et al., (2015). Trata-se de um volume plasmático concentrado em plaquetas, resultante da centrifugação do sangue total coletado com anticoagulante, obtendo assim um hemoderivado rico em citosinas, fatores de crescimento e proteínas benéficas para diversos tratamentos (De Souza et al., 2014; Hauschild 2017).

O PRP deve cumprir no mínimo com uma característica básica: possuir uma quantidade de plaquetas acima da linha de base do sangue total (Arnoczky et al., 2011). Ainda existe controvérsia sobre o número de plaquetas necessário para auxiliar no tratamento de diferentes lesões (Da Fontoura et al., 2013), porém, diversos autores propõem valores mínimos para obter um PRP. Marx (2004) e Smith et al. (2006) recomendam que a concentração de plaquetas viáveis seja de 3 à 5 vezes superior à presente no sangue total. Arnoczky et al. (2011) sugeriram uma concentração de 1 milhão de plaquetas/ $\mu$ l para indivíduos saudáveis com quantidade de plaquetas basais de 150.000 a 350.000 plaquetas/ $\mu$ l. Anitua et al. (2004) recomendam quantidade mínima de 300.000 plaquetas/ $\mu$ l. Vendruscolo et al. (2012) e De Souza et al. (2014) atingiram uma concentração de 2,6 vezes em relação à quantidade basal, 350.000 plaquetas /  $\mu$ l e 320.000 plaquetas/ $\mu$ l respectivamente. Segundo Marx (2004) pode se considerar como PRP o produto biológico com uma concentração plaquetária viável de 2 vezes a quantidade basal.

O resultado do hemoderivado vai depender do protocolo utilizado, além dos valores basais do paciente (Boswell et al. 2012; De Souza et al., 2014), assim como o tipo de anticoagulante. como Citrato de sódio a 3.2 %, é conhecido por ser um dos anticoagulantes mais indicados para preparar o PRP, uma vez que preserva de melhor forma a integridade da membrana plaquetária em comparação aos demais tipos de anticoagulantes (Trindade-Suedam et al., 2007). Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, e portanto, ainda não se tem um protocolo padronizado para a obtenção do PRP (Carmona, 2011). A técnica utilizada vai depender da concentração celular esperada, do objetivo do tratamento, da disponibilidade econômica e de equipamentos. Dentre as técnicas descritas estão os manuais, as semiautomatizadas e as automatizadas, sendo as três validadas também para a espécie equina (Zimmermann et al., 2003; Carmona et al., 2008; Carmona, 2011). Para a realização da técnica automatizada, faz-se necessário grandes quantidades de sangue, equipamentos tecnológicos avançados, e pessoal experiente, mas os riscos de contaminação são baixos, o que resulta em um produto de ótima qualidade (Weibrich et al., 2002). O sistema semiautomatizado, permite uma boa concentração de plaquetas e fatores de crescimento, além de uma menor contaminação quando comparado ao método do tubo, porém concentram uma alta quantidade de leucócitos. Estudos sugerem que os leucócitos podem ser prejudiciais para alguns tecidos (Zimmermann et al., 2003; Vasconcelos, 2003; Wibrich et al., 2005). O método manual utilizando os tubos, é simples, econômico, mas precisa ser feito de maneira cuidadosa para evitar possíveis contaminações durante o processamento (Alvarez et al., 2010a).

Dependendo das concentrações celulares (plaquetas, leucócitos) e as características do produto (líquido ou gel), sua denominação e tecido para o qual foi preparado mudam Ehrenfest et al. (2012). Alguns autores têm proposto terminologia mais precisa, como plasma rico em plaquetas puro (P-PRP), plasma rico em plaquetas rico em leucócitos (L-PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF). O P-PRP e o L-PRP são obtidos na forma líquida usando anticoagulantes. O PRF é um concentrado plaquetário de segunda geração que não necessita de anticoagulante para sua elaboração. O P-PRP equino exibe contagens de plaquetas ligeiramente mais altas (1,3 -4 vezes as basais) e contagens de leucócitos (WBC) (0,5-2 vezes as basais). O L-PRP deve ter contagem de plaquetas 5 vezes maior e de leucócitos 3 vezes maior ou mais, quando comparado ao sangue total. Quando os concentrados plaquetários são ativados pela adição de trombina ou um sal de cálcio, eles formam um polímero de fibrina e são conhecidos como géis de plaquetas (PG). Assim, o PG do P-PRP é denominado gel rico em plaquetas puro (P-PRG) e o PG do L-PRP é denominado gel rico em plaquetas de leucócitos (L-PRG) (Ehrenfest et al., 2009; Carmona et al., 2013b; Giraldo et al., 2013; Garbín et al., 2021).

Relato de seus primeiros usos clínicos na medicina humana foi realizada no ano de 1998, utilizado como ajuda a um enxerto ósseo esponjoso na reconstrução de defeitos mandibulares (Marx et al., 1998a), também no tratamento de ceratite ulcerativa (Anitua, 2015b), bioestimulação facial, alopecia, odontologia (Moya et al., 2015).

Mais tarde na medicina esportiva equina foi utilizado para lesões tendíneas, ligamentosas (Maia et al., 2009a; Carmona et al., 2009a; Bosch et al., 2010; Fantini, 2014), cicatrização de feridas (De Rossi et al. 2009), fraturas ósseas (Da Fontoura et al., 2013), no tratamento de laminite crônica e distúrbios na parede do casco (Carmona et al., 2018). Nos últimos anos ganhou popularidade para tratar a endometrite persistente induzida na reprodução natural, e melhorar a fertilidade em éguas com endometrite degenerativa crônica (Segabinazzi et al., 2021), o anterior relacionado com as endometrites bacterianas concorda com o proposto por Burnouf, (2013) que relata atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do PRP.

### **2.3 Fatores de crescimento.**

Os fatores de crescimentos são proteínas biologicamente ativas com enlaces polipeptídicos, secretados maiormente pelos grânulos alfa das plaquetas Qiao (2017). Segundo Weibrich et al. (2003) existe uma liberação de fatores de crescimento por parte dos leucócitos mediante sua interação com as plaquetas dita ideia é apoiada por (Carmona et al., 2013 b) o qual propõe que os FC são derivados das plaquetas e os leucócitos.

Para a liberação dos fatores de crescimento é necessário que a plaqueta sofra um processo de ativação, lise ou degranulação (Mcclain, 2019). Após a lises, muitos dos fatores de crescimento benéficos no PRP, sequestrados nos grânulos alfa das plaquetas são liberados, permitindo assim, que ditas proteínas ajudem na regeneração tecidual, proliferação celular, sínteses da matriz extra Celular (MEC) além de reduzir as citocinas catabólicas que degradam a matriz, como interleucinas e metaloproteinases (Bazzano et al., 2013 e McClain, 2019).

O processo de ativação plaquetária e liberação dos fatores de crescimento no PRP devem ser controlados de forma precisa. Baseado no trabalho de Seidel et al., (2019) é importante evitar uma ativação prematura das plaquetas, para assim garantir a presença de fatores de crescimento no PRP no momento de uso na lesão. Pietrzak e Eppley (2005) e Seidel et al. (2019) afirmam que os fatores de crescimento têm uma meia-vida curta após a sua liberação (minutos ou poucas horas). Marx (2004) e McLellan e Plevin (2014) propõe que a liberação começa nos primeiros 10 minutos e o 95% dos fatores de crescimento são liberados passada 1 hora. Harrison et al, (2011) sugere um tempo médio de duas horas quando as

plaquetas são ativadas pelo colágeno. Por esse motivo é recomendado fazer uso do PRP imediatamente após sua ativação, de outra forma a maioria dos fatores de crescimento podem se tornar inativados antes da aplicação no tecido alvo Harrison et al. (2011).

As plaquetas durante sua circulação normal no leito vascular permanecem em um estado inativo discoide. Os processos implicados na ativação e liberação dos fatores de crescimento estão divididos e influenciados por eventos endógenos, exógenos, químicos e físicos fortemente regulados (Textor e Tablin, 2012). Dentre os endógenos temos algumas substâncias produzidas pelo corpo como serotonina, tromboxano, (Boswell et al., 2012); P- selectina (Segura et al., 2007) trombina autóloga (Waselau e Wesley, 2008); colágeno tipo 1 (Fufa et al., 2008); epinefrina, adenosina difosfato (ADP) (Textor et al., 2011). Estas substâncias estão envolvidas em acontecimentos fisiológicos e patológicos importantes na medicina humana e veterinária em resposta a eventos inflamatórios como na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), na cascata da coagulação (Segura et al., 2007 e Weyrich et al., 2003), na laminite e na endotoxemia (Kingston, 1999), e ainda existem reportes da ativação plaquetária após o exercício (Dolente et al., 2002).

Dentre as substâncias exógenas mais comumente utilizadas para a ativação plaquetárias está a trombina bovina, cuja ativação é realizada em recipiente de plástico ou polipropileno à temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos (Zimmerman, 2003; Eppley et al., 2004; Textor, 2011; Textor e Tablin, 2012; Carmona 2013 b), os sais como o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), o qual tem um efeito antagonico em relação ao anticoagulante, recalcificando o PRP e promovendo a formação de coágulo, ativando o produto. Neste último o processo ocorre em um recipiente de vidro, à temperatura corporal  $37^\circ\text{C}$ , durante 30 a 45 minutos (Textor e Tablin, 2012; Carmona, 2013b). Estudo realizado por Shiga et al. (2017) demonstrou que 80% das plaquetas foram ativadas usando a trombina bovina ou cloreto de cálcio, isto foi determinado mediante a citometria de fluxo. Porém, diversos autores não recomendam a ativação com trombina bovina quando o PRP vai ser utilizado clinicamente. Coppinger et al. (2004) no seu estudo sobre a caracterização das proteínas, baseado em uma abordagem proteômica, identificou mais de 300 proteínas liberadas após a ativação com trombina, e muitas das proteínas identificadas estão relacionadas com efeitos inflamatórios. Textor et al. (2013) demonstraram dito efeito em um estudo com PRP ativado com trombina bovina 10  $\mu\text{L}$  em 7 equinos, que gerou uma inflamação intra-articular exagerada, comprometendo a mobilidade da articulação durante 96 horas após injeção, no mesmo trabalho utilizando ( $\text{CaCl}_2$ ) para ativar o PRP, não foi evidenciado nenhum efeito sobre a articulação.

Dentre as formas de ativação por meios físicos encontramos os choques por força g e por temperatura, apesar do relatado por Maia et al. (2009) que quanto maior a força g, maior a quantidade de concentração de plaquetas. Dugrillon et al. (2002) e Augustine et al. (2016) afirmam que baixas forças de centrifugação preservam a integridade das plaquetas, enquanto altas forças ativam prematuramente as plaquetas. O outro método utilizado para a ativação e lises é submeter o hemoderivado a ciclos de temperatura, congelando e descongelando as plaquetas. Trata-se de um método bem conhecido, eficaz e seguro posto que não utiliza aditivos para sua ativação, além de induzir a liberação dos fatores de crescimento (Handin, 1972; Tablin, 2008; Textor, 2011a). Este processo de ativação foi verificado pelo aumento na expressão de marcadores proteicos como CD62P e CD63, presentes no PRP após ciclos de congelamento e descongelamento (Johnson et al., 2011).

Os principais fatores de crescimento contidos no PRP incluem fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo I entre outros (De Pascale, 2015). Dentre suas principais funções temos a regulação da inflamação, o anabolismo e catabolismo tecidual, angiogêneses, analgesia e bacteriostases (Lopez et al., 2014 e Carmona et al., 2018). Atuando por mecanismo parácrinos, autócrinos, endócrinos que afetam a dinâmica celular como consequência de sua ligação a receptores específicos da superfície celular ou proteínas da MEC dessa forma ajudam com os processos fisiológicos de reparação tecidual (Barrientos et al., 2008). A ligação a esses receptores desencadeia processos complexos que controlam proteínas do ciclo celular, além de padrões de diferenciação necessários para uma correta reparação e regeneração de tecidos (Sivamani et al., 2007).

**Tabela 1.** Classificação dos fatores de crescimento; características e função em diversos processos biológicos.

FATOR DE CRESCIMENTO	FUNÇÃO	REFERENÇA BIBLIOGRAFICA
<p><b>TGF-<math>\beta</math>1</b>  <b>Fator de crescimento transformante beta 1</b></p>	<p>Predomina na cicatrização de feridas cutâneas. quimiotático para neutrófilos e macrófagos, promove a angiogêneses, diferenciação de fibroblastos e miofibroblastos, inibe a formação de osteoclastos.</p>	<p>(Barrientos et al., 2008);            (Anitua et al., 2012a);            (De Pascale et al., 2015)</p>

<p><b>PDGF</b> <b>Fator de crescimento derivado das plaquetas</b></p>	<p>Ideal nos estágios iniciais da cicatrização incluindo a fase inflamatória, proliferativa e de remodelação. É quimiotático para neutrófilos e macrófagos, induz o TGF-B 1, mitogêno, aumenta produção de fibroblastos, miócitos, deposição de colágeno tipo 1.</p>	<p>(Textor et al., 2011a). (Anitua et al., 2012a); (Yuan et al., 2013)</p>
<p><b>EGF</b> <b>Fator de crescimento epidérmico</b></p>	<p>Tem um efeito mitogênico e quimiotático em fibroblastos e células epiteliais, acelera a migração dos queratinócitos, indutor da migração celular e estimulador para a formação de tecido de granulação. Aumenta a resistência de contração em feridas e sua remodelação além de promover a síntese de colágeno.</p>	<p>(Marui et al., 1997); (Barrientos et al., 2008); (Anitua et al., 2012a);</p>
<p><b>VEGF</b> <b>fator de crescimento endotelial vascular</b></p>	<p>Modula a angiogênese e promove a proliferação endotelial durante a inflamação e a cicatrização tecidual, também por meio das células endoteliais promove a homeostase dos vasos sanguíneos. É mitogênico, pró-apoptótico e promove a quimiotaxia e diferenciação de células epiteliais, renais, gliais e fibroblastos.</p>	<p>(Anitua et al., 2005) (Lee et al., 2007) (Anitua et al., 2012a)</p>
<p><b>FGF</b> <b>Fator de crescimento de fibroblastos</b></p>	<p>Promove a formação do tecido de granulação, reepitelização, remodelação tecidual, regula a síntese e deposição da matriz extracelular, aumenta a motilidade dos queratinócitos durante a reepitelização em presença do colágeno. Estimula e coordena a mitogênese das células-tronco mesenquimais para os fibroblastos, osteoblastos, condrócitos,</p>	<p>(Sogabe et al., 2006); (Anitua et al., 2012a)</p>

	células musculares lisas e mioblastos esqueléticos.	
<b>IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I</b>	Efeitos quimiotático, mitogênico e de síntese de matriz nos tecidos. Mediador inflamatório e promove enzimas catabólicas como metaloproteinase-9 (MMP-9). O fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF I) está fortemente associado à indução da formação óssea, estimulando a síntese de osteocalcina, condrócitos, fosfatase alcalina e colágeno tipo I pelos osteoblastos.	(Sundman et al., 2011)  (Meinel et al., 2003) (Anitua et al., 2012a)

## 2.4 Lisado Plaquetário

O LP (Lisado plaquetário) é um produto biológico inovador, estudado e caracterizado amplamente na medicina humana, mas com poucos estudos na medicina veterinária. Este hemoderivado é obtido a partir de concentrados plaquetários, os quais são submetidos a processos físicos ou químicos que vão lisar e romper as membranas plaquetárias produzindo assim um produto plasmático acelular rico em proteínas, fatores de crescimento e citocinas relacionadas com o reparo tecidual e crescimento celular (Schallmoser et al., 2020 e Soares et al., 2021). Em termos de conteúdo, o LP é semelhante a outros hemoderivados, diferenciando-se na concentração de alguns compostos.

**Tabela 2.** Concentrações de diversos compostos presentes no lisado plaquetario, valores expressados em (mg/mL) e (ng/mL). (Burnouf et al., 2016)

ANALITO LP	CONCENTRAÇÃO
Proteína total <b>mg/mL</b>	55-65
Albumina <b>mg/mL</b>	35-40
IgG <b>mg/mL</b>	8-12
Fibrinogênio <b>mg/mL</b>	1.5-3
PDGF AB <b>ng/mL</b>	50-300
TGF-β1, <b>ng/mL</b>	50-300

VEGF ng/mL	5-10
EGF ng/mL	0.5-10

Em seu uso na medicina baseado principalmente na espécie humana, verificou-se ser um produto inovador e vantajoso devido ao forte potencial para diminuir problemas associados à administração alogênica de hemoderivados, uma vez que todas as membranas celulares sanguíneas são removidas durante a preparação do lisado, diminuindo assim reações imunogênicas (Soares et al., 2021). A eficácia do LP está descrita para diversos tecidos mostrando bons resultados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Foi realizado um estudo comparando as concentrações de fatores de crescimento, citocinas e nanopartículas em um lisado de plaquetas e soro autólogo, onde descobriu-se que as preparações de plasma lisado tinham maior potencial do que o soro autólogo para proliferação de células epiteliais da córnea, isto foi evidenciado por um ensaio de fechamento de feridas epiteliais da córnea nas primeiras 0 a 6 horas após a lesão (Zhang et al., 2020). Estudo similar foi realizado *in vivo* em ratos onde foi provocado um desbridamento epitelial da córnea, e posteriormente aplicado soro periférico humano e plasma lisado humano, os resultados mostraram que ambos os tratamentos tiveram reparo do tecido córneo (Huang et al., 2017). Outro estudo *in vitro* em reparação óssea mostrou resultados promissórios, utilizando o LP como um coadjuvante. No referido estudo foi incorporado um LP junto com uma gelatina para imitar a formação de um coagulado sanguíneo, desempenhando assim a função de migração e diferenciação de células osteo progenitoras e endoteliais o qual facilitou a reconstrução do osso, apoiando assim a utilidade para a reconstrução óssea em um modelo experimental em ratos (Nadra et al., 2019). Estudos *in vitro* tem sido desenvolvido, mostrando resultados promissórios para o uso em humanos. Na pesquisa foi associada um LP como um andaime biológico mineral com o intuito de diminuir o tempo de reparação da ferida, assim como melhorar as características desse tecido, os resultados positivos foram outorgados à sinergia que fazem os diferentes fatores de crescimento, presentes no hemoderivado (Sandri et al., 2015).

A medicina veterinária regenerativa está acompanhando o progresso humano em uma tendência translacional (Soares et al., 2021). Na medicina veterinária existem estudos similares para as diferentes espécies. Em caninos foi usado PRP e LP para tratamento de feridas de tecidos moles envolvendo uma grande quantidade de destruição tecidual, especialmente quando a cirurgia sozinha é ineficaz. Este estudo conclui que é possível usar os hemoderivados para melhorar a qualidade da regeneração do tecido e acelerar o processo de cicatrização (Zubin et al., 2015). Na espécie equina, os tratamentos com (LP) atualmente estão mais dirigidos a

tecidos e lesões articulares e músculo esqueléticas. Em estudo clínico e molecular com 23 cavalos de Sela Argentina com osteoartrite (AO), foi observado que a aplicação de 1ml de LP nos dias 0, 10, 30 e 60, foi benéfico diminuindo principalmente o grau de claudicação, a efusão sinovial e a dor à flexão forçada, além disso não foi encontrada presença da metalloproteinase 9 associadas com degradação da matriz extra celular (Perrone et al., 2020). Estudo similar foi realizado injetando 3 ml de LP na articulação interfalangeana distal com osteoartrites mostrando melhora 10 dias após a aplicação do hemoderivado, em 7 dos 10 cavalos tratados (Tyrnenopoulou et al., 2016). Também foram atribuída propriedades antimicrobianas frente bactérias gram positivas e gram negativas. O LP mostrou propriedades antibiofilme mantendo maior atividade do que PRP e PPP contra *S. aureus*, *S. zooepidemicus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, coletadas de articulações afetadas de equinos (Gilbertie et al., 2020)

## **2.5 Processo de lise plaquetária.**

A lises plaquetária é um processo realizado para induzir a liberação de fatores de crescimento e outros compostos bioativos mediante o rompimento da estrutura da plaqueta. A maneira mais comum, eficiente e econômica de induzir a lises é usar um ou mais ciclos de congelamento/descongelamento, com uma centrifugação opcional para sedimentar os detritos celulares (Burnouf et al., 2016).

Existem diversos protocolos para conseguir um lisado plaquetário. Dentre os mais comuns, está o lisado por temperatura; o protocolo de cinco ciclos de congelamento e descongelamento foi descrito por Paques et al. (1990). Com o passar do tempo, os protocolos têm sofrido algumas modificações para melhorar a qualidade do produto, recentemente tem trabalhos para obtenção e avaliação do lisado plaquetário para o tecido ocular na espécie equina, consiste em um protocolo simplificado, realizado três ciclos de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e descongelamento a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, seguida de uma centrifugação e filtração (Hagen et al., 2021). Tyrnenopoulou et al. (2016) descreve um protocolo similar para a obtenção de plasma lisado para articulação em equino, consta de um ciclo  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e um descongelamento a temperatura ambiente. O protocolo de lisado plaquetário com propriedades de antibiofilme bacteriano é feito de acordo com o reportado na literatura, cinco ciclos de congelamento  $-80^{\circ}\text{C}$  por 1 hora seguido descongelamento a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e uma centrifugação a 20.000 g por 20 minutos em temperatura ambiente para sedimentar os detritos (Gilbertie et al., 2020). Uma técnica de lisado plaquetário para proliferação de sinoviócitos in vitro foi realizada usando nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), 5 ciclos e uma

centrifugação final a 20.000 g por 20 minutos com um filtrado para remover os detritos. No entanto, os tempos de congelamento e descongelamento não são especificados para esta técnica (Gilbertie et al., 2018).

A ação de lises por sonificação baseia-se na transmissão de ondas através de um líquido, que provoca fenômenos térmicos e não térmicos com potencial de destruição plaquetária. Ondas de ultrassom com frequência superior a 20 kHz são rotineiramente usadas na medicina para liberar material citoplasmático e granular das plaquetas (Bernardi et al., 2013).

O protocolo de lises: “A bolsa 35 mL de PRP foi exposta à estimulação ultrassônica por 30 minutos usando um equipamento na frequência de 20 kHz para obter o lisado de plaquetas por sonicação. As ondas de ultrassom são transmitidas diretamente para o líquido plasmático. Uma alíquota de 1,5 mL foi coletada assepticamente a cada 5 minutos para avaliar o PL por contagem de número de plaquetas e medição dos níveis de citocinas no sobrenadante. O LP foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL após sonicação e centrifugado a 1600g por 15 minutos em temperatura ambiente, em seguida, o sobrenadante foi coletado e filtrado.” (Bernardi et al., 2013).

## **2.6 Soro autólogo**

O soro autólogo, é um hemoderivado, extraído mediante a sedimentação e/ou centrifugação do sangue total sem anticoagulante, obtendo como resultando o produto fluido do sangue sem a presença de seus fatores de coagulação e componentes celulares (Ullah et al. (2008). Seu início como terapia data de 1975 onde foi utilizado plasma e soro autólogo em perfusão continua para o tratamento da síndrome de olho seco em humanos, evidenciando em 5 pacientes a melhora no tecido ocular em termos de lubrificação e opacidade (Ralph et al., 1975). Mais tarde Fox et al. (1984), demonstraram em 15 pacientes humanos a superioridade do soro autólogo em comparação com as lágrimas artificiais para o tratamento de ceratoconjuntivite seca e olho seco. Nos pacientes houve melhora tanto nos sintomas clínicos como na aparência do tecido lesado. Seu uso surge pela necessidade de tratar patologias e lesões oculares, assim como lubrificar e nutrir a superfície do olho (Liu et al., 2005). Na oftalmologia, o soro autólogo constitui uma alternativa superior aos colírios tradicionais (Quinto et al., 2009), como já foi reportado as lágrimas artificiais não possuem os componentes essenciais das lágrimas naturais, como fatores de crescimento, vitaminas e imunoglobulinas, neuropeptídeos, além disso, podem ter um efeito negativo devido aos conservantes, estabilizadores e outros

aditivos para manter sua durabilidade, o que pode induzir reações tóxicas ou alérgicas piorando o quadro do paciente (Liu et al., 2005 e Anitua et al., 2015a).

O soro autólogo tem uma composição similar as lágrimas, tanto nos compostos como na sua concentração. O SA contém vitamina A, C, (TGFB), (EGF), (IGF-1), (PDGF), fibronectina, albumina,  $\alpha 2$  macroglobulina, IgA, IgG, fatores de complemento, substância P (SP) e lisozimas, substâncias essenciais que ajudam diretamente na proliferação, diferenciação e maturação da superfície ocular normal, além de ter um efeito bactericida e bacteriostático (Pan et al., 2017 e Lopez et al., 2007).

Com respeito à obtenção de do SA, existe uma problemática por se tratar de um produto de uso individual e variável, o que impossibilita a fabricação e padronização do SA em produto farmacêutico comercial (López et al., 2007). Vários protocolos têm sido descritos com o intuito de alcançar altas concentrações de fatores de crescimento epiteliotrópicos e propriedades benéficas para o olho, além de uma forma simples de obtenção (Liu et al., 2005 e Sanak et al., 2021). Por isso é necessário padronizar uma metodologia previsível, replicável, onde seja factível identificar os mecanismos moleculares benéficos que até hoje permanecem desconhecidos (Geerling et al., 2004). As variáveis mais relevantes que podem modificar a composição e eficácia do hemoderivado são o tempo de coagulação do sangue, a duração e a força da centrifugação (Sanak et al., 2021) e a exposição à luz (Quinto et al., 2009).

Embora ainda não se tenha um protocolo definido, diferentes estudos concordam nos aspectos mais relevantes da técnica. O sangue é extraído da veia do paciente com tubo sem anticoagulante, subsequentemente, os tubos são deixados na posição vertical a temperatura ambiente de 18- 22°C por cerca de 2 horas para permitir a coagulação. Após a formação do coágulo sanguíneo, o sobrenadante é centrifugado para separar o soro dos componentes sólidos (Quinto et al., 2009). Alguns exemplos de protocolos são; tubos deixados na posição vertical por 2 horas em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a  $2500 \times g$  por 10 minutos ou a  $3000 \times g$  por 15 minutos (Sanak et al., 2021); coágulo por 120 min em temperatura (18-25°C) e centrifugação a  $3.000 \times g$  por 15 min (Liu et al., 2005); amostras de sangue foram deixadas coagular em temperatura ambiente por 20 min e posteriormente centrifugados por 10 min a 2000g (Anitua et al., 2015<sup>a</sup>).

Apesar dos grandes avanços no tratamento de doenças ulcerativas, os oftalmologistas equinos ainda se deparam com casos que evidenciam pouco êxito nos tratamentos. Na espécie equina existem estudos avaliando a eficácia do soro autólogo como uma terapia para o tecido ocular; com o objetivo de tratar problemáticas como úlceras de córnea, e suas possíveis complicações secundárias como infecções oportunistas de bactérias e fungos (Rushton et al.

2018). O correto tratamento do tecido ocular do cavalo e extremamente importante uma vez que o acometimento dessa estrutura pode comprometer a visão, inutilizando o equino. Dos santos et al. (2015). Estudos tem demonstrado resultados promissórios do soro autólogo. Rushton et al. (2018) em seu estudo avaliando os efeitos de hemoderivados em cultura de células de córneas, encontraram que a capacidade de proliferação celular aumentou dentro das primeiras 24 horas do estudo, assim como sua migração dentro das primeiras 48 horas na presença do soro, o que pode ser uma explicação possível da melhora das lesões oculares devido à constante remodelação e migração provocada pelas moléculas de adesão (Dimilla,1991).

**Tabela 3.** Concentrações de proteína total e albumina expressada em (mg/mL). Concentrações de TGF- $\beta$ 1 expressado em (pg/ml). Para a espécie equina, no soro autólogo e no lisado plaquetario.

ANALITO	LISADO PLAQUETARIO	SORO AUTOLOGO
PROTEINA TOTAL	53.57 $\pm$ 2.08 (mg/L)	59.69 $\pm$ 2.25 (mg/L)
ALBUMINA	27.99 $\pm$ 1.10 (mg/L)	32.26 $\pm$ 1.44 (mg/L)
TGF- $\beta$ 1	3192.7 $\pm$ 1395.3 (pg/ml)	2,571 (pg/ml)

Legenda: (mg/mL): miligramas por mililitro. (pg/mL): picogramas por mililitro.

(Peyrecave-capo et al., 2022); (Giraldo et al., 2013); (Hagen et al., 2021)

### 3. MATERIAL E METODOS

O experimento foi realizado com a aprovação do comitê de ética de uso de animais da UFMG, sob o número de protocolo 232 (Anexo 1). O estudo utilizou a estrutura disponível no laboratório MULTILAB do DCCV, LAMICO do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e LEPET no Hospital Veterinário. Seguem, em anexo, as cartas de anuência para uso dos referidos espaços (Anexos 2 e 3).

#### 3.1 Animais

Para produção do SA e LP, foram utilizados 7 animais de salto adultos (machos e fêmeas), com idade entre 7-15 anos, provenientes da região de metropolitana de Belo Horizonte. Os animais ficaram abrigados em centros hípicas próximos à Escola de Veterinária (15-30 minutos), cujas características geralmente são: baias de tamanho aproximado de 3 x 3m, com cama de maravalha de madeira, água *ad libitum*, sal mineral e alimentação à base de feno de gramínea e concentrado. Em nenhum momento do experimento, os animais foram retirados do seu ambiente de origem ou tiveram mudanças na sua rotina pelo estudo. Além disso, todos

foram submetidos a um exame clínico completo, anterior a sua inclusão. Os animais foram utilizados apenas para obtenção do sangue para produção dos hemoderivados.

Os critérios de exclusão no estudo foram: uso recente de anti-inflamatórios e antibióticos, doenças sistêmicas recentes (no último mês), viagens recentes (no último mês) ou qualquer alteração no exame clínico completo inicial.

Todos os proprietários de animais envolvidos no estudo receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **3.2 Obtenção dos hemoderivados**

Para a confecção dos tratamentos, foi coletado sangue por meio do sistema de tubos a vácuo, na veia jugular externa com agulha tipo borboleta 23 G, após antissepsia com clorexidina degermante, seguida de clorexidina alcoólica.

Para produção do SA, foram coletados 63 ml de sangue por animal em 7 tubos de 9 ml sem anticoagulante. Para o LP, foram coletados 50 tubos com citrato de sódio 3,2 % de volume de 3,6 ml para um total de 180 ml por animal, para os três tempos. No total, de cada animal, para a confecção de LP e SA foram coletados 243 ml de sangue para todos os 3 tempos do experimento. Esse volume é considerado seguro para o animal adulto, uma vez que não ultrapassa o limite de 1% do peso vivo.

#### **3.2.1 Obtenção de soro autólogo (SA)**

Para a obtenção do SA, após a coleta, o tubo ficou em repouso durante 1-2 horas à temperatura ambiente, com a finalidade de separar mediante sedimentação a porção do soro comum. Após retração natural do coágulo, foi feita uma centrifugação a 2500 g por 10 minutos para obter um produto ainda mais refinado, baseando-se no protocolo de Sanak et al. (2021). Em seguida, o coágulo formado foi desprendido, com pipeta de 1 ml, coletada a quantidade do soro resultante. Esse volume de soro foi armazenado em 18 flaconetes estéreis, 6 flaconetes de 1,5 ml para estudos de ELISA, 6 flaconetes de 0,5 ml para mensuração proteica e 6 de 0,5 ml para cultura bacteriana, para cada um dos três tempos e seus respectivos grupos temperatura 4 e 37 °C.

#### **3.2.2 Obtenção de LP**

Para obter o LP, foram coletados sangue em 50 tubos com citrato de sódio a 3,2 %, de 3,6 ml de volume. Após a coleta, o conteúdo dos tubos foi colocado em tubos Falcon de 15 ml, os quais foram submetidos a centrifugação por 5 minutos a 120 g (ou 908 rpm em uma centrífuga com raio de 13 cm) (*Centribio, 80-2B, Biovera 12 postos*). A amostra resultante ficou em repouso durante 10 minutos com a finalidade de compactar melhor cada camada celular e

facilitar a coleta do sobrenadante. Desse produto, coletou-se 50 % do plasma mais próximo da camada leucocitária com uma pipeta de 1 ml. Esse produto foi colocado em tubos Falcon estéreis de 15 ml e centrifugados novamente, a 240 g (1280 rpm em uma centrífuga de raio de 13 cm) por 5 minutos. Em seguida, aguardou-se mais 10 minutos em repouso, descartando-se 75 % do sobrenadante. Ao volume restante de 25% denominou-se de PRP, cujas plaquetas se apresentam na forma de pellet, sendo necessária a homogeneização para contagem e uso. Tal protocolo baseou-se em adaptações da técnica descrita por Arguelles et al. (2006). Após a remoção do 25 % de cada tubo, o produto resultante foi submetido a um processo de lise.

### 3.2.3 Lisado plaquetário

Após a remoção do 25 % de cada tubo, o produto (14,5 ml) foi colocado em um tubo Falcon de 15 ml, o qual foi submetido a um processo de lisado plaquetário. A técnica de lise foi adaptada a partir dos estudos de Gilbertie et al. (2020), Perrone et al. (2020) e Hagen et al. (2021), consistindo em ciclos de congelamento e descongelamento a -80%.

Os tubos com PRP foram submetidos a três ciclos de congelamento a -80 °C por 30 minutos, seguidos de três descongelamentos em banho maria a 37°C durante 15 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2330 g (4000 rpm em centrífuga de 13 cm de raio), durante 25 minutos para sedimentar os detritos celulares e plaquetários resultantes do lisado. Uma alíquota de 200 µL foi destinada a mensuração no hemocitômetro de impedância (*Diagno-Icounter vet*®), para verificar a ausência de plaquetas.

Para armazenar os produtos de forma ordenada, foi feita uma divisão por animais, tratamentos, dias de avaliação e temperatura. Foram utilizados sete animais, dois tratamentos (SA e LP), três dias de avaliação em um período de oito dias (0, 4, 8), duas temperaturas 4 e 37 °C.

Após o processamento do sangue e confecção dos hemoderivados, os produtos foram alíquotados em 36 flaconetes. Doze flaconetes de 1,5 (ELISA), 12 de 0,5 ml (PROTEOMICA), e 12 de 0,5 ml para (CULTURA), por animal, para (SAC e PL), nos tempos: 0, 4, e 8 dias para as duas temperaturas de avaliação.

Cada amostra foi armazenada a 4°C e na estufa a 37°C, permanecendo em suas temperaturas de armazenamento e tempos correspondentes, até serem retirados para semeadura em Ágar sangue. Após a semeadura, todas as amostras foram mantidas a -80 °C, para avaliação das proteínas e o fator de crescimento com o kit de ELISA.

### 3.3 Mensuração de proteína total e albumina

Foi realizada a mensuração da proteína total (PTT) e albumina (ALB), em um analisador de acesso randômico para bioquímicas veterinária (*SMART 200 VET, Biotécnica, epimed, Porto Alegre*).

As amostras destinadas para a mensuração das proteínas foram retiradas do seu armazenamento em congelamento (-80°C) e deixadas a temperatura ambiente, durante 20 minutos antes do processamento. Dessa forma garantiu-se uma estabilidade dos componentes das amostras. Uma vez descongeladas as amostras, foram depositados 100 µL de soro e plasma em cada cubeta do equipamento para sua respectiva avaliação. Foram necessárias várias rodadas para processar as 84 amostras, já que o equipamento tem capacidade de analisar 18 amostras por rodada.

A forma de avaliação do equipamento é realizada por meio de uma faixa fotométrica de 340 nm a 690 nm, precisão de mais de 2 nm, e um rango de absorbância 0 a 4.0. Os resultados obtidos pelo equipamento foram processados automaticamente por meio de software, obtendo resultados para os dois analitos expressados em g/dL.

### 3.4 ELISA TGF beta-1 humano

Para analisar o fator de crescimento TGF-β1 em cada um dos hemoderivados, utilizou-se *kit* comercial de ELISA para TGF-β1 (*Enzyme – linked immunosorbent assay for quantitative detection of human TGF-β1, invitrogen thermofisher, 2019*). Esse *kit* foi validado para a espécie equina segundo diferentes autores, em 92% para Penha et al. (1997) e em 98 % para Watts e Rose (2010).

Para que se pudesse obter duplicatas na mesma placa, apenas 4 animais foram escolhidos, aleatoriamente, para as análises de ELISA. Foi mensurado o fator de crescimento de cada animal, tanto para o SA, como para LP, nos três tempos de armazenamento (0, 4 e 8 dias) e nas duas temperaturas 4°C e 37°C. No dia do processamento, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e seguido o protocolo conforme o fabricante.

#### 3.4.1 Reagente tampão de lavagem

Foi esvaziado todo o conteúdo (50 ml) de tampão de lavagem que estava em concentração (20x) em uma proveta limpa graduada de 1000 ml, se misturou delicadamente para evitar a formação de espuma com 950 ml de água destilada para completar um volume de 1000 ml, logo depois o conteúdo foi transferido a uma garrafa de lavagem (figura 1) e conectada ao equipamento lavador de placas (figura 2)



**Figura 1.** Garrafa de lavagem da lavadora de microplacas



**Figura 2.** Lavadora de microplaca veterinário bioclin

#### 3.4.2 Reagentes tampão ensaio (1x)

Se coloco todo o conteúdo (5 ml) do tampão de ensaio em concentração (20x) em uma proveta limpa graduada de 100 ml, se misturo com água destilada (95 ml) cuidadosamente para evitar a formação de bolhas, se completou um volume de 100 ml.

#### 3.4.3 Reagente conjugado de biotina

O conjugado com biotina foi utilizado dentro de 30 minutos após sua diluição, foi feita uma diluição de 1:100 da solução concentrada com tampão de ensaio em uma proveta de 15 ml. Foi misturado suavemente 11,88 ml do reagente tampão de ensaio a concentração de (1x) junto com 0,12 ml de conjugado de biotina, obtendo como resultado uma diluição de biotina de 12 ml.

#### 3.4.4 Reagente estreptavidina-HRP

A estreptavidina foi utilizado dentro de 30 minutos após sua diluição, foi feita uma diluição de 1:100 da solução concentrada com tampão de ensaio em uma proveta de 15 ml. Foi misturado suavemente 11,88 ml do reagente tampão de ensaio a concentração de (1x) junto com 0,12 ml de estreptavidina obtendo como resultado uma diluição de estreptavidina de 12 ml.

### 3.4.5 Reagente padrão humano TGF- $\beta$ 1

Se preparou o padrão TGF- $\beta$ 1 humano (concentração 4 ng/ml) com adição de 0,7 ml de água destilada. Se misturou suavemente durante 15 minutos para garantir uma solubilização completa e homogênea. No momento das diluições foi misturado em um vórtex de tubo seguindo as indicações do produto.



**Figura 3.** TGF- $\beta$ 1 STARDAR  
Padrão TGF  $\beta$ 1

### 3.5 Desenvolvimento da técnica

No início, se rotularam 7 flaconetes para cada ponto padrão: S1, S2, até o S7. Preparou-se uma diluição seriada 1:2 para as curvas padrão da seguinte forma: foi pipetado 225  $\mu$ L de tampão de ensaio a concentração (1x) em cada tubo, logo depois se adicionou 225  $\mu$ L do reagente padrão TGF- $\beta$ 1 no primeiro tubo o qual foi rotulado como S1; nesse tubo foi obtida uma concentração padrão de 1:2 ng/ml. Em seguida, colocou-se 225  $\mu$ L desta diluição no segundo tubo S2, dessa forma foi realizado 5 vezes mais até chegar ao tubo S7 e assim criar os pontos da curva padrão.

Seguidamente iniciamos com o passo um, o qual foi preparar as amostras de (SAC e PL). Foram diluídas em relação 1:10 com tampão de ensaio a concentração de (1x) de acordo com a seguinte formula: 20  $\mu$ L de amostra + 180  $\mu$ L de tampão de ensaio a concentração de (1x) + 20  $\mu$ L de HCL 1N, se deixo incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, logo a reação foi neutralizada pela adição de 20  $\mu$ L 1N NaOH; após a neutralização a placa foi lavada de forma automatizada com um protocolo configurado no equipamento de lavagem, seguindo as recomendações do produto; a placa foi lavada com a solução tampão de lavagem duas vezes com 300  $\mu$ L, deixando a solução descansar nos poços por 15 segundo antes da aspiração completa de cada poço. É muito importante calibrar previamente a profundidade da agulha aspiradora com uma placa de ensaio para não arranhar a superfície dos micros poços e perder o KIT. Posteriormente se adicionou 100  $\mu$ L de tampão de ensaio em concentração (1x) em

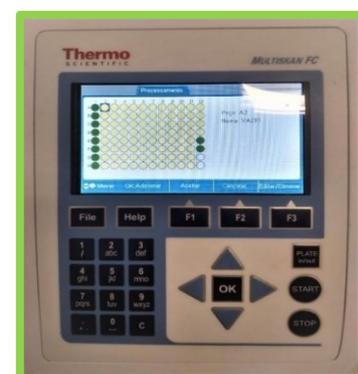
duplicata aos poços em branco, e 60  $\mu$ L de tampão ensaio aos poços das amostras juntamente com 40  $\mu$ L de cada amostra pré - tratada em duplicata; a placa foi coberta com filme adesivo para evitar o derramamento dos poços e se deixou incubar a temperatura ambiente durante 2 horas em um agitador de microplacas a 400 rpms. No tempo em que a placa ficou em incubação, foi preparado o conjugado de biotina como descrito anteriormente; após as duas horas de incubação, se removeu o filme adesivo, e no lavador de placas se esvaziaram todos os poços, e se configurou um lavado de 5 vezes; após o lavado, foi adicionado 100  $\mu$ L de biotina conjugada a todos os poços, novamente se cobriu com filme adesivo e se deixou em incubação durante 1 hora a temperatura ambiente no agitador de microplacas a 400 rpms; no final do tempo de incubação, foi preparada a estreptavidina-HRP, de igual forma quando terminou a incubação, foi repetido o mesmo protocolo de lavagem automatizado 5 vezes, e se adicionou 100  $\mu$ L de estreptavidina-HRP a todos os poços, incluindo os poços em branco. Se deixou incubando por mais 1 hora a temperatura ambiente 400 a rpms e acabado esse tempo, a placa foi lavada novamente no protocolo de 5 ciclos.

Uma vez a placa limpa, foi pipetado 100  $\mu$ L de solução substrato TMB em todos os poços, se colocou a placa dentro de uma sacola de alumínio com proteção de luz e se deixou em incubação por mais 30 minutos, conferindo a cada 10 minutos se a coloração do padrão com concentração mais elevada tinha atingido uma cor azul escura, nesse momento foi adicionado 100  $\mu$ L de solução de parada em cada poço para inativar completamente a reação enzimática e poder ler os resultados.

Logo depois a absorbância foi mensurada em um leitor de microplaca usando um comprimento de onda de 450 nm, também se configurou o mapa de ELISA no software, incluindo os poços padrão e os poços em branco. Figura 4. Figura 5.



**Figura 4.** Leitor de ELISA e Fotômetro de Microplacas Multiskan FC



**Figura 5.** Tela do leitor de microplacas veterinário

### 3.6 Contaminação bacteriana dos hemoderivados

Foi preparado o meio de cultura Ágar Sangue base frasco de 500 mg da KASVI conforme a descrição do produto. O Ágar em sua forma desidratada, é um pó castanho e uma vez preparado torna-se um fluído homogêneo transparente ou com adição de sangue vermelho-cereja, composto por extrato de carne 10 g/L, Triptose 10 g/L, Cloreto de Sódio 5 g/L, Ágar 15, g/L.

A preparação do Ágar é um processo simples, mas deve ser feito com cuidado, e com medidas de assepsia rigorosas para evitar contaminação do produto. Foi suspenso 40 gramas do produto Ágar base em um litro de água destilada morna, o produto foi misturado até garantir a dissolução completa do pó. Depois foi colocado na autoclave a 121°C durante 15 minutos para esterilizar o produto, e se deixou esfriar no ambiente até que o Ágar atingisse uma temperatura de 45 – 50 ° C; imediatamente dentro da capela de fluxo foi adicionado ao Ágar 5 % de sangue de cavalo coletado previamente em bolsas de citrato de sódio.

Os cálculos: para um litro de Ágar base foi adicionado 50 ml de sangue: 5 %. Uma vez adicionada, se misturo de forma cuidadosa e suave para evitar a formação de bolhas, logo foi colocada uma quantidade de 20 ml em cada placa de Petri até acabar o produto. As placas foram envolvidas em plástico Minipel e armazenadas em refrigeração até seu momento de uso.

Para verificar a possível contaminação durante o processamento ou armazenamento dos hemoderivados preparados no projeto (SA e LP), foi realizado um plaqueamento de 100 µL do soro ou plasma em Ágar sangue, a cada intervalo de tempo de armazenamento (0, 1, 4, 8 dias) e a cada grupo de temperatura correspondente (4 °C e 37 ° C). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa, o crescimento bacteriano foi verificado e quantificado pela contagem manual de UFCs.

Nas placas que houve crescimento, foram estocadas até o final do experimento de cultura e posteriormente levadas a identificação do gênero e espécie da bactéria mediante o MALDI TOF. O MALDI TOF ou espectrometria de massa de luz de tempo de ionização de dessorção assistida por matriz, em inglês *matrix-assisted laser desorption ionization time-off light mass spectrometry* é um método rápido, preciso e econômico de caracterização e identificação microbiana, é uma tecnologia que gera impressões digitais de espectro de massa características, que são assinaturas únicas para cada microrganismo e, portanto, ideais para uma identificação microbiana precisa em nível de gênero e espécie, além de ter o potencial para ser usada para tipagem e identificação de cepas (Croxatto et al., 2012).

### 3.7 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva do perfil dos animais a partir da tabela de dados. Esta análise descritiva avaliou todas as variáveis. Foram calculados os principais índices de estatística descritiva (e.g. média, mediana, desvio-padrão, coeficiente de variação, quartis). Esta análise foi realizada para todos os animais disponíveis no banco de dados a fim de fornecer um perfil geral, assim como separadamente para grupos pré-definidos, a fim de fornecer um perfil específico, nas seguintes variáveis plaquetas, eritrócitos, leucócitos, UFCs, fatores de crescimento, proteínas.

Foram aplicados testes estatísticos para verificar se houve diferenças na taxa de contaminações dos dois produtos biológicos SA e LP. também se houve diferenças na taxa de contaminações entre os diferentes tempos e entre as diferentes temperaturas.

Para avaliar as diferenças entre produtos, entre tempos e entre temperaturas, foram ajustados modelos de regressão linear. Os distintos produtos, tempos e temperaturas foram utilizados como variáveis preditoras. Foi necessário aplicar a transformação de BoxCox à variável 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%. Todas as análises estáticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core team, 2019).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Processamento e características dos produtos obtidos.

A média de concentração plaquetária obtida foi de 366.000 plaquetas por microlitro, o que corresponde a 2,59 x a concentração basal. As demais médias foram: concentração inicial de plaquetas de 140.857/  $\mu\text{L}$ , 6.431 leucocitos/  $\mu\text{L}$  e  $7,2 \times 10^6$  eritrocitos/  $\mu\text{L}$ . Os resultados hematológicos completos estão descritos na tabela 5.

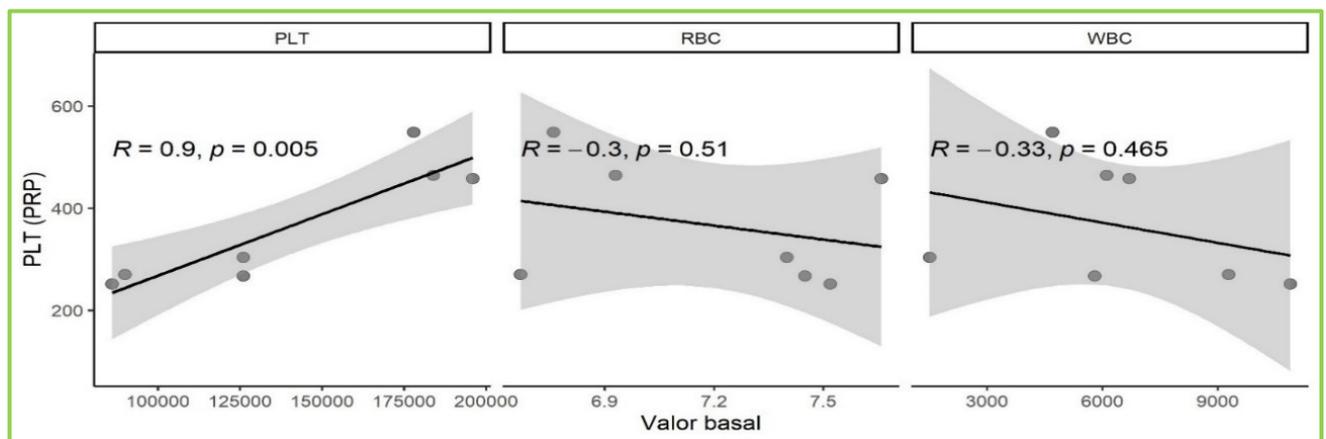
**Tabela 4.** Concentrações do número de plaquetas, leucócitos, eritrócitos presentes no sangue total e a concentração plaquetária após o processamento do de PRP. Na espécie equina – Belo Horizonte- 2022

ANIMAIS	PLAQUETAS / $\mu\text{L}$	LEUCOCITOS/ $\mu\text{L}$	ERITROCITOS $\times 10^6$	PRP plaquetas/ $\mu\text{L}$	Vezes de Concentração
1.	178.000	4.700	6,76	548.000	3.0 x

2.	126.000	1.500	7,4	303.500	2.4 x
3.	86.000	10.900	7,52	251.000	2.9 x
4.	196.000	6.700	7,66	457.000	2.3 x
5.	90.000	9.300	6,67	270.000	3.0 x
6.	126.000	5.800	7,45	267.000	2.1 x
7.	184.000	6.120	6,93	464.000	2.5 x
<b>Média</b>	<b>140.857</b>	<b>6.431</b>	<b>7,2</b>	<b>366.000</b>	<b>2.59 x</b>

Legenda:  $\mu\text{L}$ : Microlitros

Após análise de correlação dos parâmetros hematológicos, foi observada correlação estatística, significativamente forte apenas entre a concentração de plaquetas basais e a concentração plaquetária do PRP produzido ( $p < 0,005$ ), conforme demonstrado na figura 6.



**Figura 6.** Gráficos de dispersão, sendo (R) o valor da correlação de Spearman e P, o valor dessa correlação. Correlação estatística da concentração de plaquetas (PLT), leucócitos (WBC), eritrócitos (RBC) no PRP, em comparação com os valores das mesmas células presentes no sangue total.

O protocolo de lise do PRP adotado nesse estudo foi adequado para a obtenção do LP. Foi necessário um total de 3 ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento para atingir a contagem 0 de plaquetas. Por outro lado, houve a detecção da presença de leucócitos e hemácias (Tabela 6).

**Tabela 5.** Valores médios de plaquetas, eritrócitos, leucócitos por microlitro após o protocolo de LP, realizado por 3 ciclos de congelamento ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), por 30 minutos em  $\mu\text{L}$  trefreezer, e descongelamento, a ( $37^{\circ}\text{C}$ ) por 10 minutos em banho maria, realizado na espécie equina.

Produto LP	Plaquetas/ $\mu\text{L}$	Eritrócitos/ $\mu\text{L}$	Leucócitos/ $\mu\text{L}$
MÉDIA	0,000	0,041	0,049

Legenda: LP :Lisado plaquetário. /  $\mu$ L: microlitros

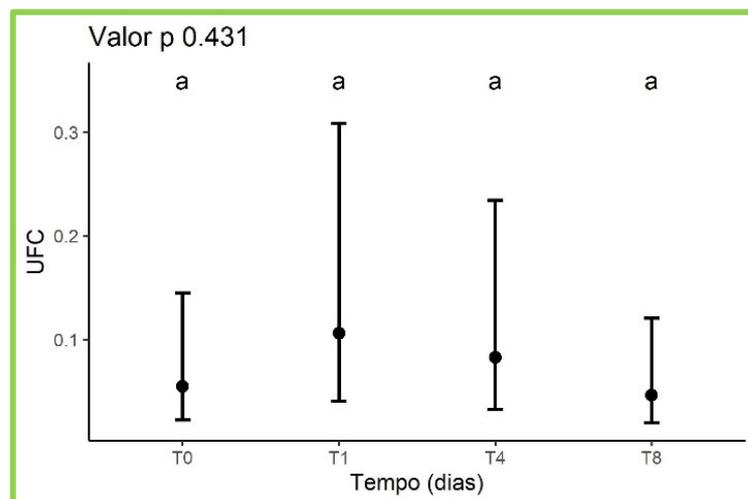
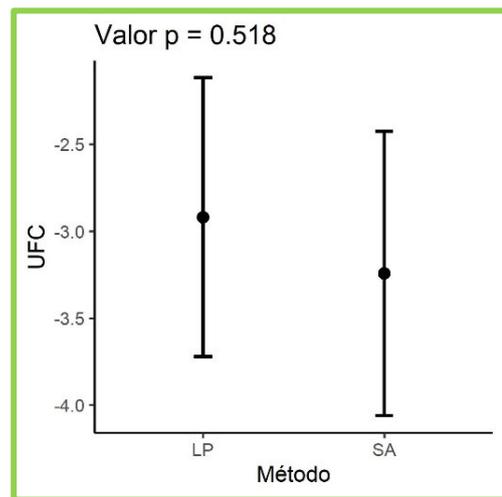
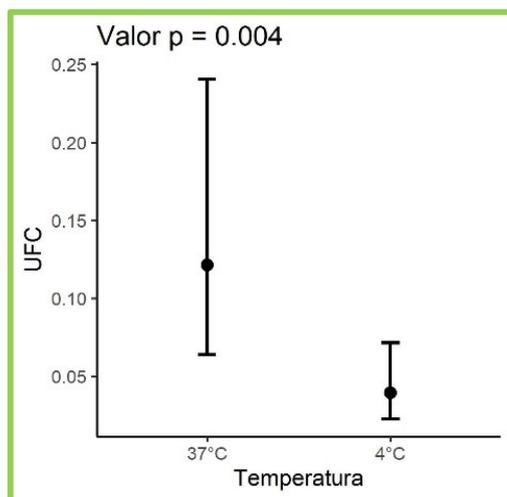
#### 4.2 Contaminações bacterianas nos produtos LP e SA

Em relação a contaminação bacteriana nos produtos finais e suas variáveis de temperatura e tempo de armazenamento, observou-se maior contaminação nos hemoderivados que foram mantidos a 37°C ( $P < 0,05$ ), independentemente do tempo ou produto (Figura 7).

**Tabela 6.** Valores médios de UFCs para ambos os produtos, na temperatura de 37 e 4°C

TEMPERATURA	(SA) E ( LP )
37°C	36,4
4°C	0,04

LP: Lisado Plaquetario . SA : Soro autólogo.



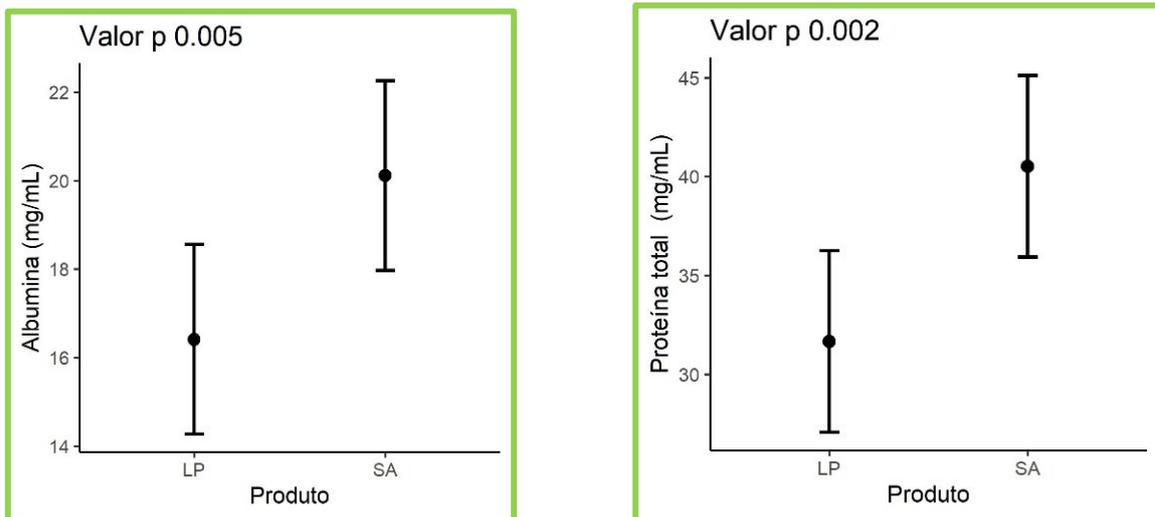
**Figura 7.** Valores representado a frequência de unidades formadoras de colônias UFCs, em relação ao produto, e à temperatura, achando que a temperatura de 37°C teve maior contaminação para ambos os produtos com resultado significativo  $p= 0.004$ .

#### 4.3 Proteína total e albumina nos diferentes produtos LP e AS

Os dados de proteína total e albumina foram obtidos em média para os 7 animais, nos três tempos de armazenamento e nas duas temperaturas, avaliando um total de 84 amostras. A média da proteína total no LP foi de 31,65 mg/mL e no soro autólogo de 40,51 mg/mL. A albumina para o LP apresentou média de 16,41 mg/mL e no soro, 20,11 mg/mL. O SA mostrou maior concentração de ambos os parâmetros ( $P<0,05$ ) (Figura 8).

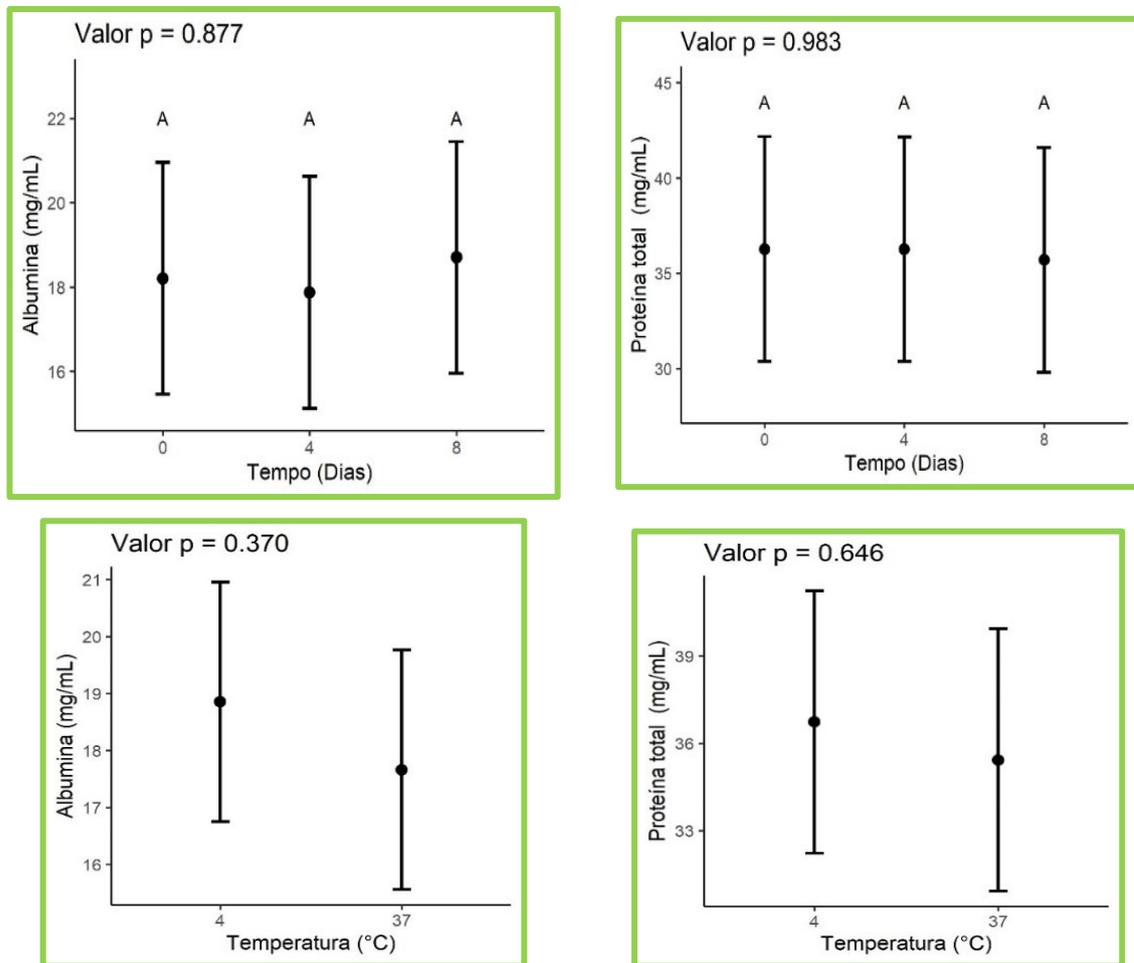
**Tabela 7.** Valores médios em (mg/mL) da concentração de proteína total (PTT) e albumina (ALB) para o LP e o soro autólogo para 7 animais.

ANALITO		LISADO PLAQUETARIO	SORO AUTOLOGO
PROTEINA TOTAL	MÉDIA	31,65 mg/mL	40,51 mg/mL
ALBUMINA	MÉDIA	16,41 mg/mL	20,11 mg/mL



**Figura 8.** Valores médios da proteína total e albumina, expressados (mg/mL) para cada um dos produtos, LP e soro autólogo. Mostrando maior concentração no SA para as duas proteínas, com valor para proteína total de  $P=0.002$  e albumina  $p= 0.005$ .

Não houve diferença entre as concentrações de proteína total e albumina em relação a temperatura ou tempo de armazenamento, conforme demonstrado na Figura 9.



**Figura 9.** Valores da albumina e proteína total expressada em (mg/mL). Relacionando a influência do tempo (0,4,8 dias) e a temperatura (4°C) e (37°C) sobre as concentrações no LP e AS.

#### 4.4 Fator de crescimento TGF- $\beta$ 1

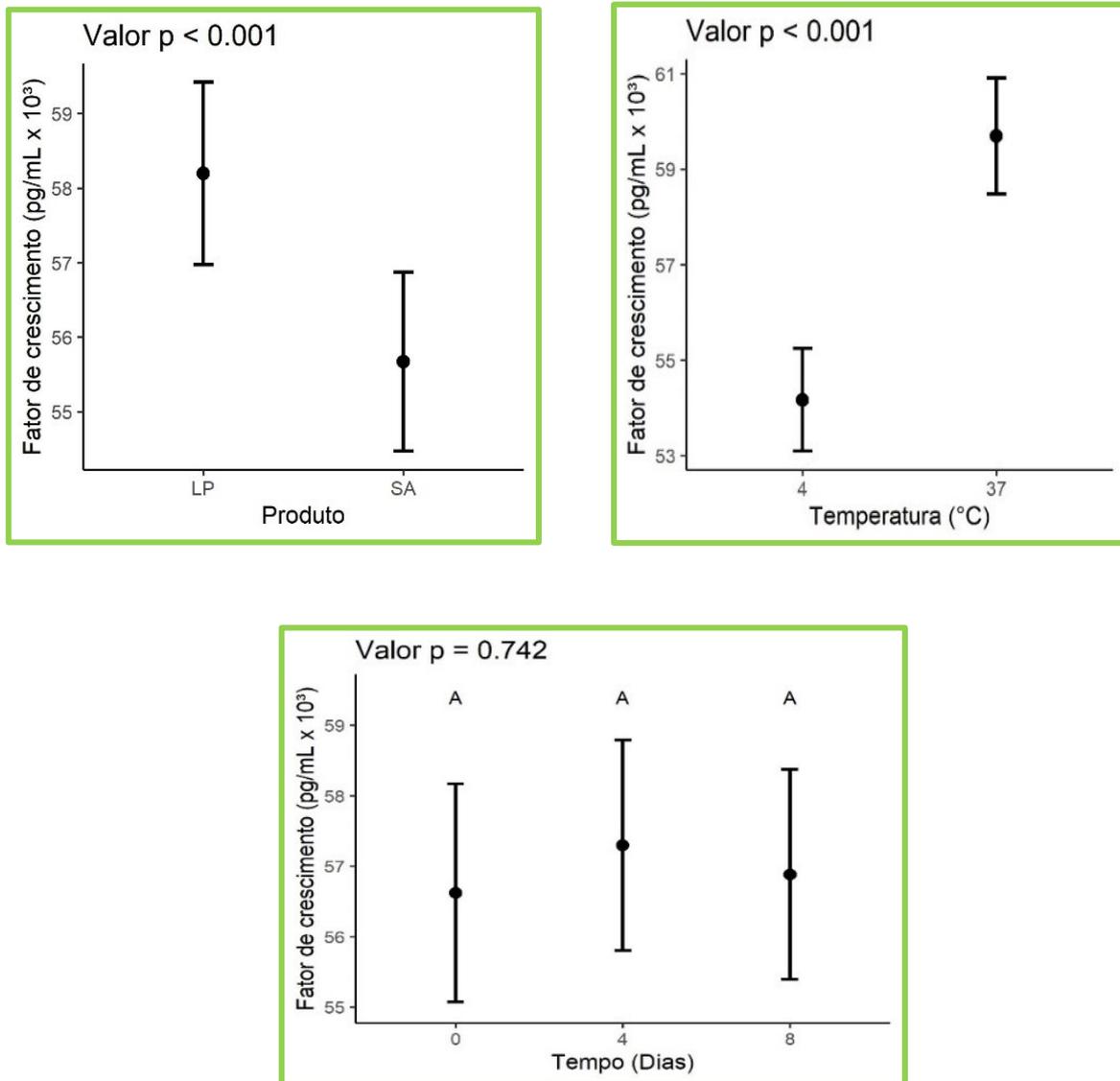
Os valores médios encontrados para TGF- $\beta$ 1 para o LP e SA foram 5,940 pg/mL e 5,530 pg/mL, respectivamente, incluindo-se todos os tempos e temperaturas. Os valores por tempo e temperatura são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 8.** Mensuração da concentração média do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 em pg/mL para ambos os produtos, em relação aos três tempos, temperatura de armazenamento.

Hemoderivado	MÉDIA	37°C	4°C	T 0	T 4	T 8	T 0	T 4	T 8
	GERAL			37°C	37°C	37°C	4°C	4°C	4°C
LP	5,940	6,080	5,830	6,000	6,270	5,970	6,400	5,510	5,580
SA	5,530	5,860	5,280	5,810	5,890	5,870	5,230	5,290	5,310

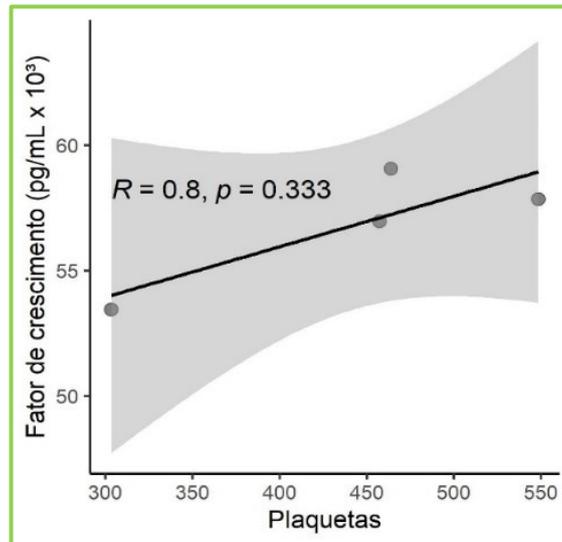
Legenda: °C: graus Celsius; T 0, 4, 8, 37°C: tempos 0,4,8 a temperatura de 37°C; T 0, 4, 8, 4°C : tempos 0,4,8 a temperatura de 4°C.

A concentração de TGF- $\beta$ 1 foi maior ( $P < 0,05$ ) no LP. Também se observou maior concentração desse FC à temperatura de 37°C ( $P < 0,05$ ). Entretanto, não houve diferença na concentração do FC quando comparados aos tempos de armazenamento (Figura 10).



**Figura 10.** Valores representando a concentração do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 valores expressados em (pg/mLx10<sup>3</sup>), presente no LP e no SA. Em relação à temperatura (4°C) e (37°C); tempo de armazenamento (0, 4, 8) dias.

Foi testada a correlação entre a concentração de TGF- $\beta$ 1 e a contagem plaquetária do PRP basal, adquirida antes do processamento e lise das plaquetas. Observou-se uma correlação forte ( $R = 0,8$ ), embora não significativa ( $P = 0,333$ ) (Figura 11)



**Figura 11.** Gráfico de dispersão com os valores numéricos, sendo o valor da correlação  $R = 0,8$  de Spearman e  $P$ , o valor  $P = 0,333$  significativo dessa correlação. Correlação entre a concentração plaquetária e a concentração de fator de crescimento TGF- $\beta 1$  expressada em pg/mL.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, os valores basais dos 7 animais avaliados, para os parâmetros hematológicos estavam dentro do intervalo normal para a espécie e conforme a literatura. Grondin e Dewitt (2010) apresentaram valores normais de plaquetas em equinos que vão desde 100.000 - 350.000 plaquetas /  $\mu\text{L}$ ; valores de 5400 - 14,300 leucócitos /  $\mu\text{L}$  e valores de  $6,8 - 12,9 \times 10^6$  eritrócitos /  $\mu\text{L}$ . Vendruscolo et al. (2012) no seu estudo mostrou valores de  $156.600 \pm 267.450$  plaquetas /  $\mu\text{L}$ ,  $8300 \pm 1310$  leucócitos /  $\mu\text{L}$  e  $7,7 \pm 0,71 \times 10^6$  eritrócitos /  $\mu\text{L}$ . Fonteque et al. (2015) avaliando 138 cavalos saudáveis, acharam resultados de 10.700 leucócitos/  $\mu\text{L}$  e de  $7,78 \times 10^6$  eritrócitos/  $\mu\text{L}$ .

Embora existam diversas definições para que se considere um hemoderivado como PRP, considera-se que o protocolo de obtenção dos hemoderivados utilizados nesse estudo foi adequado para produzir um PRP. Usando-se a metodologia de dupla centrifugação modificada, foi atingida uma concentração média de 2,59 vezes em comparação com o nível basal, o que poderá alcançar as condições adequadas para o uso desta terapia celular. Smith et al. (2006), em seu trabalho *in vitro* sobre o efeito anabólico do PRP em tendão equino, concluiu que uma concentração de 4 vezes a concentração basal seria necessária para observar um efeito reparador. Esses dados são compatíveis com o proposto por Marx et al. (2004), o qual afirma que uma resposta de reparação celular foi evidente quando o produto tinha concentrações de 4

a 5 vezes em relação ao número de plaquetas basais. Porém, outros estudos consideram positivas concentrações mais baixas. Anitua et al. (2004) e Carmona et al. (2011) recomendam uma contagem de 300.000 plaquetas/  $\mu\text{l}$ , o que representa 1- 2,5 vezes as plaquetas da linha base do sangue total. Vendruscolo et al. (2012) propõem 350.000 plaquetas /  $\mu\text{L}$ , ou seja 2,6 vezes as basais.

Os parâmetros hematológicos também influenciam a concentração plaquetária no PRP. A concentração plaquetária no PRP final apresentou correlação positiva ( $R=0,9$ ;  $P=0,005$ ) com a concentração inicial de plaquetas, o que está em consonância com a literatura (Andrade et al., 2008).

O protocolo de lise do PRP utilizado no presente estudo foi adequado para eliminar as plaquetas em todas as amostras após os 3 ciclos e centrifugação final. Por outro lado, conforme observado na Tabela 6, obteve-se média diferente de 0 para leucócitos e hemácias. Possivelmente, essa observação está relacionada à técnica de contagem por impedância, em que pequenos fragmentos celulares podem ser contados como células. Rushton et al. (2018), por meio da técnica de impedância, acharam quantidades elevadas de precipitados proteicos de vários tamanhos, bem como restos celulares, os quais foram contados como células, devido ao tamanho ser idêntico aos glóbulos brancos. Essa contagem não fidedigna é ainda mais provável quando o número de células está reduzido (Springer et al., 1998). Embora outras técnicas de contagem de plaquetas tenham sido apontadas como mais precisas, tanto a contagem manual quanto a citometria de fluxo apresentam fatores limitantes. 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 (Alvarez et al., 2011; Anitua et al., 2012b; Drago et al., 2013; Drago et al., 2014; López et al., 2014)

Após o processo de lise, duas técnicas têm sido utilizadas para reduzir a presença de fragmentos celulares: a centrifugação e a filtração do produto final (Bernardi et al., 2013; Gilbertie et al., 2018; Hagen et al., 2021). No presente estudo, optou-se por realizar a centrifugação sem o uso de filtro, como forma de avaliar o método de lise dentro de um cenário de uso rotineiro, em que muitas vezes o filtro não está disponível. Além disso, o produto produzido não foi destinado ao uso *in vivo*, não havendo, portanto, a preocupação do ponto de vista imunogênico.

Pelo fato dos dois hemoderivados estudados requererem manipulação durante o seu processamento, optou-se por verificar se as amostras apresentariam contaminação e se os

fatores relacionados ao armazenamento (tempo e temperatura) poderiam proporcionar o surgimento de contaminações no produto final. Optou-se por realizar o processamento dos produtos em ambiente laboratorial, mas sem o uso de capela de fluxo laminar, pois este último equipamento não corresponde à realidade de aplicação prática a campo. Ao contrário do esperado, não foi possível demonstrar que o LP possuísse maior potencial de contaminação em relação ao SA, por exigir maior manipulação durante sua confecção. É possível que com  $n$  maior de placas por tratamento esse efeito tivesse sido demonstrado, dada a natureza instável da variável UFC. Por outro lado, houve correlação significativa ( $P = 0,004$ ) entre a contagem de UFCs e a temperatura de armazenamento de  $37^{\circ}\text{C}$  para ambos os produtos, conforme Figura 7. Uma vez que grande parte das bactérias apresentam melhor desempenho de crescimento em temperaturas de  $30$  a  $37^{\circ}\text{C}$  (Cunha et al 2002), tal achado representa uma confirmação importante a ser considerada quando se pretende preservar a qualidade microbiológica de um hemoderivado. Assim como demonstrado por Anitua et al. (2015b) e Blasetti et al. (2015), a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  parece ser a mais adequada para armazenamento de hemoderivados do ponto de vista microbiológico. Os últimos autores também não encontraram contaminação significativa, apesar de terem coletado alíquotas repetidas do mesmo frasco. Mesmo assim, no presente estudo, optou-se por realizar alíquotagem prévia das amostras, antes do armazenamento. Acredita-se, portanto, que essa recomendação deve ser mantida quando do preparo para uso clínico.

Em nosso estudo, o *Staphylococcus epidermidis* foi a bactéria identificada com maior frequência, estando presente em 60 % das placas contaminadas. Isso está de acordo com o que foi observado por Álvarez et al. (2010b). Segundo os autores, o *S. epidermidis* é a bactéria mais isolada na pele equina e nas mãos da equipe envolvida.

No sentido de monitorar possíveis influências dos parâmetros estudados sobre a composição dos hemoderivados, mensurou-se a concentração de proteínas totais e albumina nos produtos obtidos. Observou-se que as concentrações foram maiores para ambos analítos no SA. Hagen et al. (2021) em seu estudo de plasma lisado em cavalos, a partir de um concentrado plaquetário, mensurou e identificou a composição de diferentes hemoderivados, para caracterizar os produtos. Nesse trabalho, a concentração de proteína total, no LP foi ( $53.57 \pm 2.08$  mg/mL) e albumina de ( $27.99 \pm 1.10$  mg/mL); no soro autólogo obtiveram uma proteína total de ( $59.69 \pm 2.25$  mg/mL) e albumina ( $32.26 \pm 1.44$  mg/L). São resultados compatíveis neste trabalho, em termos, de que tanto a proteína total como a albumina no SA, estão mais elevadas em comparação com as concentrações no LP. Por outro lado, é necessário esclarecer que esses achados são inusuais, se comparado com trabalhos de perfis proteicos na espécie equina para

soro e plasma. Em teoria, devido aos processos, pelos quais são obtidos o soro e o plasma, a literatura apresenta que o soro tem menor concentração de proteínas em relação ao plasma, em condições de processamento e armazenamento convencionais. Isto explica-se durante o processo de coagulação, onde o soro se torna qualitativamente diferente do plasma. A remoção, de uma grande quantidade de fibrinogênio do plasma sanguíneo, na formação do coágulo de fibrina, resulta em que o soro procedente desse processo, tenha uma concentração proteica inferior à do plasma, devido a perda dessa proteína (Issaq et al., 2007). O fato de ter achado concentrações proteicas maiores, no SA comparando com o LP no presente estudo, e em estudos comprando os mesmos produtos como o realizado por Hagen et al. (2021), pode estar relacionado, aos processos de obtenção e lises do PRP. Se poderia inferir que os ciclos repetitivos de centrifugação, assim como de congelamento e descongelamento com temperaturas drásticas, puderam fazer com que as proteínas diminuíssem, uma vez, que o soro não passou por esses processos, mas os dois produtos, estiveram armazenados, nas mesmas condições, de tempo e temperatura, e ditas variáveis não mostraram fazer ou ter uma diferença estática entre a concentração de proteína total ou albumina.

A mensuração e estimativa dos fatores de crescimento nos hemoderivados, mesmo sendo de extrema importância para quantificar concentrações terapêuticas precisas, não pode ser utilizada de forma rotineira, devido aos altos custos e à necessidade de pessoal experiente para sua avaliação. Dentro dos colírios oculares, a mensuração dos fatores de crescimento epiteliotropicos, é dos processos mais importantes, porém pouco realizados (Sanak et al., 2021). Pelo anterior, e com o intuito de disponibilizar mais dados, sobre a composição dos hemoderivados, foi mensurado o TGF- $\beta$ 1. No presente estudo realizou-se ELISA do TGF- $\beta$ 1, achando resultados em média, no LP de (5,940 pg/mL), e para o SA de (5,530 pg/mL). Esses resultados são compatíveis com outros estudos, enquanto à diferença que existe, entre a concentração de ambos os produtos. Por outro lado, neste estudo, as concentrações obtidas foram mais elevadas tanto no SA, como no LP em comparação com os resultados de outros trabalhos. Giraldo et al. (2013), a partir de um P-PRP, com concentrações de (304,030 plaquetas /  $\mu$ L), após o lisado obtiveram uma concentração do TGF- $\beta$ 1 de (3192.7  $\pm$ 1395.3), em comparação com os achados deste trabalho, foram valores mais baixos. o dado anterior pode estar relacionado, ao fato de que o PRP obtido no trabalho dos autores desse estudo, teve menor concentração plaquetária, à atingida no presente estudo (366.000 plaquetas/  $\mu$ L), conseqüentemente menor liberação de FC. O anterior, é mais evidente no estudo em equinos de Textor et al. (2011a) onde conseguiram, mediante um protocolo de 3 centrifugações concentrar

1'000.000 plaquetas/  $\mu$ L, e após o lisado com detergente iônico ele obteve concentrações de TGF- $\beta$ 1 na faixa de  $22,677 \pm 12,125$  pg/ml.

No soro autólogo a concentração do TGF- $\beta$ 1 foi menor em comparação com o LP, mostrando um nível de significância estatística confiável de  $P < 0.001$ . O achado no presente estudo está amplamente relacionado e sustentado com a literatura. No SA, o processo de liberação dos fatores de crescimento, acontece por meio do processo da coagulação natural do sangue total, esse processo é realizado pela trombina autóloga, induzindo assim a degranulação e liberação dos fatores de crescimento presente no sangue basal Bieback et al. (2009) e Burnouf et al. (2016). Por outro lado, pode-se inferir que a concentração do TGF- $\beta$ 1 no SA foi menor, uma vez que não existe uma concentração plaquetária superior à do sangue. Além disso segundo Textor e Tablin, (2012) a ativação pela trombina autóloga equina, no processo natural da coagulação, sequestra alguns fatores de crescimento, os quais são mantidos dentro dessa membrana, diminuindo substancialmente as concentrações dos FCs no soro resultante. Foi demonstrado que a concentração de fatores de crescimento em amostras de soro está diminuída entre 30% e 50% em comparação com LP em humanos (Burnouf et al., 2016).

Neste trabalho, parece ser, que tanto no SA, como no LP, o FC teve maior concentração, no grupo de armazenamento a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , a literatura não apresenta estudos sobre esses achados, no LP. Foi considerada essa temperatura, como um grupo de armazenamento, com o intuito de comprovar, se tinha relação com maior concentração e liberação dos fatores de crescimento, uma vez que dentro das metodologias de ativação do PRP, são realizados estudos, onde os produtos, são ativados com aditivos como trombina, cloreto de cálcio e gluconato, e são deixados durante minutos ou horas a  $37^\circ\text{C}$  obtendo bons níveis de fatores de crescimento (Gutiérrez et al., 2017; Steller et al., 2019). Ainda não se tem na literatura estudos de armazenamento de produtos lisados a  $37^\circ\text{C}$ , os quais apresentem, se teria alguma influência na liberação ou estabilidade desses FCs. Por outro lado, devido à ausência de estudos de armazenando do LP, não foi possível comparar, a estabilidade desse hemoderivado, ao longo do tempo. Neste trabalho não houve aumento ou diminuição estatisticamente significativa do fator de crescimento ao longo dos 8 dias de armazenamento  $p = 0,737$ .

Um dos objetivos de avaliar e caracterizar, a PTT, ALB e o TGF- $\beta$ 1 no SA e LP, foi mensurar, se suas concentrações teriam propriedades interessantes para o uso nas terapias oculares nos cavalos. Existem poucos trabalhos, utilizando fatores de crescimento na terapia ocular *in vivo*. O TGF- $\beta$ 1, pode ter propriedades anabólicas e catabólicas no tecido ocular. A literatura não apresenta uma concentração adequada definitiva, para otimizar seus efeitos positivos (Donnelly et al., 2014). No presente estudo ambos os hemoderivados atingiram

concentrações do TGF- $\beta$ 1 relativamente altas, comparadas com produtos similares na literatura, como os encontrados por Haber et al. (2003) os quais em um estudo com células equinas *in vitro*, avaliaram a proliferação de células epiteliais e queratinócitos. Nesse trabalho evidenciaram que o TGF- $\beta$ 1 em concentrações de 1,100 pg/mL e 2,000 pg/mL diminuiu significativamente a proliferação de células epiteliais em comparação aos controles. No caso de concentrações mais baixas, 500 pg/mL a proliferação celular não diminuiu, sendo estável o crescimento celular. Concordante com o anterior é válida a sugestão de Tsubota et al. (1999) onde propõem fazer uma diluição, em produtos com altas concentrações de TGF- $\beta$ 1, e outros fatores de crescimento, para assim diminuir os efeitos adversos.

Enquanto à relação que tem o número de plaquetas com a liberação de fatores de crescimento, a literatura no caso do TGF- $\beta$ 1 ainda é controversa. Pesquisas afirmam a hipótese e outras na qual não se evidencia relação. No presente trabalho foi possível encontrar uma correlação forte, entre as plaquetas e o TGF- $\beta$ 1 ( $R=0,8$ ), dito resultado é definido estaticamente, como uma correlação forte posto que o valor está mais próximo a ( $R=1$ ). nosso valor de ( $P=0,333$ ), não significativo, porém, existem fatores que podem intervir nesse resultado como o tamanho amostral (Molina, 2017). Em nosso caso o tamanho amostral foi pequeno, 4 animais, o que poderia ter influência com o resultado. Porém esses resultados podem ser comparados com os achados por Sundman et al. (2011) em seu trabalho em humanos, plantearam a hipótese de que, a liberação e concentração do TGF- $\beta$ 1 seria dependente da composição celular do PRP. Para isso compararam dois PRPs, um deles com baixa concentração plaquetária e outro com alta concentração. O de alta concentração teve uma correlação forte entre TGF- $\beta$ 1 e plaquetas ( $R=0,75$  e  $P=0,001$ ) corroborando assim a hipótese do seu estudo. Hagen et al. (2021) estudando a espécie equina, também acharam uma associação moderada a forte, do TGF- $\beta$ 1 em um concentrado plaquetário. A avaliação foi feita em um plasma lisado obtido por ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento e a relação do TGF- $\beta$ 1 para o lisado plaquetário foi de  $P=0,01$  e  $R=0,626$  mostrando uma boa correlação estatísticas, além da confiabilidade dos dados. O anterior explica-se teoricamente, uma vez que um produto com alta concentração plaquetária, teria mais capacidade de liberação de fatores de crescimento, já que as plaquetas são uma fonte autóloga importante desses fatores. A liberação ocorre pelas vias de sinalização intracelular plaquetária, através da interação com uma rede complexa de receptores de superfície de outras células e tecidos (Anitua et al., 2005; Sundman et al., 2011; Vendruscolo et al., 2012).

## 6. CONCLUSÕES

O valor basal de plaquetas, está diretamente relacionado com a concentração plaquetária no plasma rico em plaquetas final.

Desde o ponto de vista microbiológico, a temperatura de 37 °C mostrou maior crescimento bacteriano nos produtos, o que inviabiliza que seja uma temperatura adequada, para o armazenamento dos diferentes hemoderivados; 4 °C é uma temperatura mais indicada para o armazenamento ao longo do tempo.

LP é um produto mais rico em TGF- $\beta$ 1, em comparação ao SA. Embora o motivo ainda seja desconhecido neste trabalho, o resultado do estudo, mostrou que tanto no SA, como no LP, a temperatura de 37°C apresentou maior concentração de fator de crescimento TGF- $\beta$ 1.

A proteína total e albumina teve maior concentração no soro autólogo convencional em comparação com o produto do lisado plaquetário. Nem o tempo, nem a temperatura tiveram influência em sus concentrações

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização dos hemoderivados, é de vital importância para o correto uso da comunidade científica e na medicina veterinária. Ainda faltam muitos estudos que permitam caracterizar de forma mais precisa e extensa os diversos compostos benéficos e adversos do SA, e LP.

É necessário estudar diversos protocolos, de obtenção, armazenamento, dos hemoderivados, os quais entreguem a melhor relação entre replicabilidade e qualidade do produto, assim como uma maior segurança no armazenamento.

Metodologias *in vitro* e *in vivo* são necessárias para mostrar os verdadeiros efeitos biológicos que podem ter as diferentes proteínas e fatores de crescimento nos tecidos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ, M. E.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J. U. Bacterial contamination in platelet concentrates of horses. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 42, n. 1, p. 49–56, 2010a.

ÁLVAREZ, M. E.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J. U. Monitoring bacterial contamination in equine platelet concentrates obtained by the tube method in a clean laboratory environment under three different technical conditions. *Equine Veterinary Journal*, v. 42, n. 1, p. 63–67, 2010b.

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.

ANDRADE, MIGUEL GUSTAVO SETÚBAL; DE FREITAS BRANDÃO, CLAUDIO JOSÉ; SÁ, CAMILA NEVES; et al. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 105, n. 1, 2008.

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.; ALKHRAISAT, H.; ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *Journal of Controlled Release*, v. 157, n. 1, p. 29–38, 2012a.

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.; ANDÍA, I.; SANCHEZ, M.; et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 23, n. 2, p. 281–286, 2005.

ANITUA, E.; DE LA FUENTE, M.; Riestra, A.; et al. Preservation of Biological Activity of Plasma and Platelet-Derived Eye Drops after Their Different Time and Temperature Conditions of Storage. *Cornea*, v. 34, n. 9, p. 1144–1148, 2015b.

ANITUA, E.; MURUZABAL, F.; TAYEBBA, A.; et al. Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: Preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmologica*, v. 93, n. 8, p. e605–e614, 2015<sup>a</sup>.

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.

ARNOCZKY, P.; DELOS, D.; RODEO, A. What Is Platelet-Rich Plasma? *Operative Techniques in Sports Medicine*, v. 19, n. 3, p. 142–148, 2011.

AUGUSTINE, N.; VANDERSPUY, J.; KABERRY, L.; et al. Thrombin-Mediated Platelet Activation of Lysed Whole Blood and Platelet-Rich Plasma: A Comparison between Platelet Activation Markers and Ultrastructural Alterations. *Microscopy and Microanalysis*, v. 22, n. 3, p. 630–639, 2016.

AZARI, A.; RAPUANO, J. Autologous serum eye drops for the treatment of ocular surface disease. *Eye and Contact Lens*, v. 41, n. 3, p. 133–140, 2015.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, S.; et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v. 16, n. 5, p. 585–601, 2008.

- BAZZANO, M; PICCIONE, G; GIANNETTO, C; et al. Platelet rich plasma intralesional injection as bedside therapy for tendinitis in athletic horse. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 41, n. 1, 2013.
- BERNARDI, M; ALBIERO, E; ALGHISI, A; et al. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, v. 15, n. 8, p. 920–929, 2013.
- BIEBACK, K; HECKER, A; KOCAÖMER, A; et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, v. 27, n. 9, p. 2331–2341, 2009.
- BLASETTI, F; USAI, D; SOTGIA, S; et al. A protocol for microbiologically safe preparation, storage, and use of autologous serum eye-drops in low-income countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 9, n. 1, p. 055–059, 2015.
- BOSCH, G; VAN SCHIE, M; , JA CADBY; et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J Orthop* v.28, p. 211-217. 2010.
- BOSWELL, G; COLE, J; SUNDMAN, 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.
- BRANEHOG, I.; KUTTI, J.; RIDELL, B.; et al. The relation of thrombokinetics to bone marrow megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Blood*, v. 45, n. 4, p. 551–562, 1975.
- BURLING, KRISTINA; SEGUIN, MARY A; MARSH, PEGGY; et al. Effect of topical administration of epidermal growth factor on healing of corneal epithelial defects in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 61, n. 9, p. 1150–1155, 2000.
- BURNOUF, T; CHOU, M; WU, YU WEN; 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.
- BURNOUF, T; STRUNK, D; KOH, C.; et al. Human platelet lysate: ¿Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, v. 76, p. 371–387, 2016.
- CAMARGO, I; LOPEZ, C; CARMONA, J. 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.
- CARMONA J, LÓPEZ C, SANDOVAL JA. Review of the currently available systems to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. *Rec Pat Reg Med b*, v.3.n. 2, p. 148-59 2013 b
- CARMONA, J; ARGÜELLES, D. PRADES, M. Transforming growth factor beta-3 and nitric oxide levels in four autologous platelet concentrates and plasma derived from equine blood. *Arch Med Vet*.v. 40, n. 155-160. 2008.
- CARMONA, J; GÓMEZ, W; LÓPEZ, C. Could Platelet-Rich Plasma Be a Clinical Treatment for Horses With Laminitis? *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 61, p. 46–57, 2018.
- CARMONA, J; LÓPEZ, C; GIRALDO, C. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Archivos de Medicina Veterinaria*. v. 43, n. 1, p. 1–10, 2011.
- CARMONA, J; PRADES, M; ARGÜELLES, D. Autologous platelet concentrates as a treatment for soft tissue musculoskeletal lesions in horses. *Arch Med Vet*, v. 41, p. 77-82. 2009a.
- COPPINGER, J; CAGNEY, G; TOOMEY, S; et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*, v. 103, n. 6, p. 2096–2104, 2004.

CROXATTO, A; PROD'HOM, G; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 380–407, 2012.

CUNHA, D; SILVA, CELIANE, A; STAMFORD, TÂNIA; M. Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3, p. 263–271, 2002.

DA FONTOURA, C; FREITAS ZACARIAS, V; CANTARELLI, C; et al. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. *Ciencia Rural*, v. 43, n. 6, p. 1122–1127, 2013.

DE PASCALE, R; SOMMESE, L; CASAM, A; et al. Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 29, n. 1, p. 52–61, 2015.

DE ROSSI, R; COELHO, O; MELLO, G; et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cirur. Bras.* V. 24. P. 276-281. 2009.

DE SOUZA, V.; PINTO, O; DA COSTA, MARCELA, M; et al. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 6, p. 599–612, 2014.

DIMILLA, A; BARBEE, K; LAUFFENBURGER, D. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophysical Journal*, v. 60, n. 1, p. 15–37, 1991.

DOHAN, M; RASMUSON, A. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin. LPRF). *Trends Biotechnol* , v. 27, p.158-167, 2009

DOLENTE, A; WILKINS, A; BOSTON, R. Clinicopathologic evidence of disseminated intravascular coagulation in horses with acute colitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 220, n. 7, p. 1034–1038, 2002.

DONNELLY, S; GIULIANO, E; SHARMA, A; et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat): Its role on equine corneal fibrosis and matrix metalloproteinase activity. *Veterinary Ophthalmology*, v. 17, n. SUPPL.1, p. 61–68, 2014.

DOS SANTOS, C; CURCIO, B; FEIJO, S; et al. Disorders of the Ophthalmic System in Horses Emphasising the Therapeutic Approach. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 43, n. 1, p. 1–6, 2015.

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.

DUGRILLON, A; EICHLER, H; KERN, S; et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 31, n. 6, p. 615–619, 2002.

EHRENFEST, 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.

EPPLEY, B; WOODSELL, J; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 114, n. 6, p. 1502–1508, 2004.

EVERTS, M; KNAPE, A; WEIBRICH, G; et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. *Journal of Extra-Corporeal Technology*, v. 38, n. 2, p. 174–187, 2006.

- FANTINI, P. Plasma rico em plaquetas padronização em equídeos, criopreservação e efeito terapêutico na desmite do ligamento supraespinhoso de equinos. *universidade federal de minas gerais.*, p. 1-83, 2014.
- FONTEQUE, H; CECCATTO, L; BAGIO, M; et al. Hematological profile, total plasma protein and fibrinogen concentrations of clinically healthy adult campeiro horses. *Ciência Rural*, v. 46, n. 1, p. 144–149, 2015.
- FUFA, D; SHEALY, B; JACOBSON, M; et al. Activation of Platelet-Rich Plasma Using Soluble Type I Collagen. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 66, n. 4, p. 684–690, 2008.
- GARDÓN, JUAN ; MUÑOZ, ANA; SATUÉ, K; et al. Interpretation of Platelets in The Horse. *Journal of Hematology Research*, v. 4, n. March 2018, p. 19–25, 2017.
- GEERLING, GERD; MACLENNAN, S.; HARTWIG, D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*, v. 88, n. 11, p. 1467–1474, 2004.
- GILBERTIE, JESSICA M.; SCHAER, THOMAS P.; SCHUBERT, ALICIA G.; et al. Platelet-rich plasma lysate displays antibiofilm properties and restores antimicrobial activity against synovial fluid biofilms in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 38, n. 6, p. 1365–1374, 2020.
- GILBERTIE, JESSICA; LONG, JULIE M; SCHUBERT, ALICIA 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.
- GIRALDO, CARLOS ; ÁLVAREZ, MARÍA E; CARMONA, JORGE U. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015.
- GIRALDO, CARLOS ; LÓPEZ, CATALINA; ÁLVAREZ, MARÍA ; 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 TM and DEWITT SF. *Normal hematology of horse and donkey*. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds. Schalm's. *Veterinary Hematology*. Wiley Blackwell inc, 2010. 821-822.
- GUTIÉRREZ, M; LÓPEZ, C; GIRALDO, CARLOS E.; et al. Study of a Two-Step Centrifugation Protocol for Concentrating Cells and Growth Factors in Bovine Platelet-Rich Plasma. *Veterinary Medicine International*, v.- p.8, 2017.
- HABER, MARION; CAO, ZHIYI; PANJWANI, NOORJAHAN; et al. Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1) on cultured equine epithelial cells and keratocytes: Implications for wound healing. *Veterinary Ophthalmology*, v. 6, n. 3, p. 211–217, 2003.
- HAGEN, A.; LEHMANN, H.; AURICH, S.; et al. Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. January, p. 1–19, 2021.
- HANDIN, R; VALERI, C. Improved viability of previously frozen platelets. *Blood*, v. 40, n. 4, p. 509–513, 1972.
- HARRISON, SOPHIA; VAVKEN, PATRICK; KEVY, SHERWIN; et al. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *American Journal of Sports Medicine*, v. 39, n. 4, p. 729–734, 2011.
- HAUSCHILD, G; GEBUREK, F; GOSHEGER, G; et al. Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *BMC Veterinary Research*, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2017.

- HEIJNEN, F.G.; KORPORAAL, J.A. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Platelet Morphology and Ultrastructure*. 1. Gewerbestrasse. Springer international publishing, 2017. 1402.
- HIGUCHI, AKIHIRO. Autologous serum and serum components. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 59, n. 14 Special Issue, p. DES121–DES129, 2018.
- HUANG, JUNG; SUN, CHEN; CHRISTOPHER, KAREN; et al. Comparison of corneal epitheliotropic capacities among human platelet lysates and other blood derivatives. *plos one*, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017.
- ISSAQ, HALEEM J.; XIAO, ZHEN; VEENSTRA, TIMOTHY D. Serum and plasma proteomics. *Chemical Reviews*, v. 107, n. 8, p. 3601–3620, 2007.
- ITALIANO, E; WOLFGANG, B; SANJAY, T; et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood*, V.101(12), 4789–4796, 2003.
- JOHNSON LN, WINTER KM, REID S, HARTKOPF-THEIS T, MARKS DC. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. *Cryobiology*, v 62, p.100-106. 2011.
- KINGSTON, J. K.; SAMPSON, S. N.; BEARD, L. A.; et al. The effect of supramaximal exercise on equine platelet function. *Equine veterinary journal. Supplement*, v. 30, p. 181–183, 1999.
- LALKO, CORY C.; DEPPE, ELISABETH; ULATOWSKI, DAN; et al. Equine platelet CD62P (P-selectin) expression: A phenotypic and morphologic study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 91, n. 2, p. 119–134, 2003.
- LEE, SUNYOUNG; CHEN, TOM T.; BARBER, CHAD L.; et al. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell*, v. 130, n. 4, p. 691–703, 2007.
- LIU, L.; HARTWIG, D.; HARLOFF, S.; et al. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 243, n. 7, p. 706–714, 2005.
- LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, ME.; CARMONA 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. *Arch Med Vet.*, v. 67, p. 105-115. 2014.
- LÓPEZ-GARCÍA, J S; GARCÍA-LOZANO, I; RIVAS, L; et al. [Use of autologous serum in ophthalmic practice]. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*, v. 82, n. 1, p. 9–20, 2007.
- LÓPEZ-GARCÍA, JOSÉ SANTIAGO; GARCÍA-LOZANO, ISABEL; RIVAS, LUIS; et al. Stability of Growth Factors in Autologous Serum Eyedrops after Long-Term Storage. *Current Eye Research*, v. 41, n. 3, p. 292–298, 2015.
- MAIA, LEANDRO; DE SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. *Ciência Rural*, v. 39, n. 4, p. 1279–1286, 2009a.
- MAIA, LEANDRO; DE SOUZA, MARIA VERÔNICA; RIBEIRO JÚNIOR, JOSÉ IVO; et al. Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Induced Tendinopathy in Horses: Histologic Evaluation. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 29, n. 8, p. 618–626, 2009.
- MANDELBAUM, S; DI SANTIS, É; MANDELBAUM, M. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 5, p. 525–542, 2003.
- MARTÍN, E.; MOLLEDA, J. M.; GINEL, P. J.; et al. Total Protein and Immunoglobulin Concentrations in Equine Tears. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 44, n. 8, p. 461–465, 1997.
- MARUI, T.; NIYIBIZI, C.; GEORGESCU, H. I.; et al. Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 15, n. 1, p. 18–23, 1997.

- MARX, RE; CARLSON, ER; EICHSTAEDT RM; et al. platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 85 n.6, p. 638–46. 1998a.
- MARX, ROBERT E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 62, n. 4, p. 489–496, 2004.
- MCCLAIN, ANDREW K.; MCCARREL, TARALYN M. The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months. *BMC Veterinary Research*, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2019.
- MCLELLAN, JONATHAN; PLEVIN, SARAH. Temporal release of growth factors from platelet-rich Fibrin (PRF) and Platelet-rich Plasma (PRP) in the horse: A comparative in vitro analysis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 12, n. 1, p. 48–57, 2014.
- MEINEL, LORENZ; ZOIDIS, EVANGELOS; ZAPF, JÜRGEN; et al. Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone*, v. 33, n. 4, p. 660–672, 2003.
- MIRANDOLA, R M S; BENESI, F J. Total Protein, Albumin and Globulin of Healthy Developing Brazilian Sport Horse (Brasileiro De Hipismo) *Ars veterinaria*. p. 77–82, 2008.
- MOLINA, MANUEL. ¿Qué significa realmente el valor de p?. *Pediatría de Atención Primaria*, v. 19, n. 76, p. 377–381, 2017.
- MORGENSTERN E. Human platelet morphology/ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol* 126:27–60 (1997)
- MOYA ROSA, ENRIQUE; MOYA CORRALES, YADIRA. Bioestimulación facial con plasma rico en plaquetas. *Archivo Médico de Camagüey*, v. 19, n. 2, p. 167–178, 2015.
- NADRA, MERAL; NIU, WANTING; KURISAWA, MOTOICHI; et al. PRP lysate-infused gelatin hydrogel as a scaffold for bone reconstruction. *Clinical Oral Implants Research*, v. 30, n. S19, p. 205–205, 2019.
- PAES LEME, F; WURZINGER, L; VASCONCELOS, A; et al. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 149–157, 2006.
- PAGANELA, J.C.; RIBAS, L.M.; SANTOS, C.A.; et al. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos Clinical approach in equine skin wounds. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, n. 104, p. 569–572, 2009.
- PAN, QING; ANGELINA, ADLA; MARRONE, MICHAEL; et al. Autologous serum eye drops for dry eye. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2017, n. 2, 2017.
- PAQUES, M. et al. Effect of Autologous Platelet Concentrate in Surgery for Idiopathic Macular Hole. *Ophthalmology*. V. 106, N 5, 1999.
- PELAGALLI, A.; LOMBARDI, P.; ANGELO, D.; et al. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *Journal of Comparative Pathology*, v. 127, n. 2–3, p. 126–132, 2002.
- PENHA-GONCALVES, M. N.; ONIONS, D. E.; NICOLSON, L. Cloning and sequencing of equine transforming growth factor-beta 1 (TGFβ-1) cDNA. *Mitochondrial DNA*, v. 7, n. 6, p. 375–378, 1997.
- PERRONE, GUSTAVO; LASTRA, YAEL; GONZÁLEZ, CAMILO; et al. Treatment With Platelet Lysate Inhibits Proteases of Synovial Fluid in Equines With Osteoarthritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 88, 2020.
- PEYRECAVE-CAPO, XAVIER; SAULNIER, NATHALIE; MADDENS, STÉPHANE; et al. Equine Umbilical Cord Serum Composition and Its Healing Effects in Equine Corneal Ulceration. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, n. March, p. 1–12, 2022.

- PIETRZAK, WILLIAM S.; EPPLEY, BARRY L. Platelet rich plasma: Biology and new technology. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 16, n. 6, p. 1043–1054, 2005.
- QIAO, JING; AN, NA; OUYANG, XIANGYING. Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets*, v. 28, n. 8, p. 774–778, 2017.
- QUINTO, GUILHERME GOULART; CAMPOS, MAURO; BEHRENS, ASHLEY. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 71, n. 6 SUPP, p. 47–54, 2009
- RALPH, ROBERT A.; DOANE, MARSHALL G.; DOHLMAN, CLAES H. Clinical Experience with a Mobile Ocular Perfusion Pump. *Archives of Ophthalmology*, v. 93, n. 10, p. 1039–1043, 1975.
- RUIZ, FELIX A.; LEA, CHRISTOPHER R.; OLDFIELD, ERIC; et al. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 43, p. 44250–44257, 2004.
- RUSHTON, J. O.; KAMMERGRUBER, E.; TICHY, C; et al. Effects of three blood derived products on equine corneal cells, an-in vitro study. *Equine Vet. J.*, v. 50, n. 3, p. 356-362, 2018.
- SANAK, FRANTISEK; BAENNINGER, PHILIPP; KAUFMANN, CLAUDE; et al. The Lucerne Protocol for the Production of Autologous Serum Eyedrops. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, v. 238, n. 4, p. 346–348, 2021.
- SANDRI, GIUSEPPINA; BONFERONI, MARIA CRISTINA; ROSSI, SILVIA; et al. Platelet lysate embedded scaffolds for skin regeneration. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 12, n. 4, p. 525–545, 2015.
- SCHALLMOSER, KATHARINA; HENSCHLER, REINHARD; GABRIEL, CHRISTIAN; et al. Production and Quality Requirements of Human Platelet Lysate: A Position Statement from the Working Party on Cellular Therapies of the International Society of Blood Transfusion. *Trends in Biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 13–23, 2020.
- SCHULTZE M. Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Mikroskopische Anat.* V.1, n.1-42. 1865.
- SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M.; PODICO, GIORGIA; ROSSER, MICHAEL F.; et al. Three manual noncommercial methods to prepare equine platelet-rich plasma. *Animals*, v. 11, n. 6, p. 1–16, 2021.
- SEGURA, DIDAC; MONREAL, LUIS; ARMENGOU, LARA; ET AL. Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, n. 5, p. 1076–1082, 2007.
- SEIDEL, SARAH R.T.; VENDRUSCOLO, CYNTHIA P.; MOREIRA, JULIANA J.; et al. Does double centrifugation lead to premature platelet aggregation and decreased TGF- $\beta$ 1 concentrations in equine platelet-rich plasma? *Veterinary Sciences*, v. 6, n. 3, p. 1–12, 2019.
- SHIGA, YASUHIRO; KUBOTA, GO; ORITA, SUMIHISA; et al. Freeze-dried human platelet-rich plasma retains activation and growth factor expression after an eight-week preservation period. *Asian Spine Journal*, v. 11, n. 3, p. 329–336, 2017.
- SIVAMANI, R K; GARCIA, M S; ISSEROFF, R R. Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Davis, California, 95616, USA, 2 Dermatology Service, Department of Veterans Affairs, Northern California Health Care System, Mather, CA 95655, USA. *Frontiers in Bioscience*, v. 12, n. 1, p. 2849–2868, 2007.
- SMITH, JENNIFER J.; ROSS, M. W.; SMITH, R. K.W. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, v. 19, n. 1, p. 43–47, 2006.
- SOARES, CARLA S.; BABO, PEDRO S.; REIS, RUI L.; et al. Platelet-Derived Products in Veterinary Medicine: ¿A New Trend or an Effective Therapy? *Trends in Biotechnology*, v. 39, n. 3, p. 225–243, 2021.

- SOGABE, YOKO; ABE, MASATOSHI; YOKOYAMA, YOKO; et al. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair and Regeneration*, v. 14, n. 4, p. 457–462, 2006.
- SPRINGER, WOLFRAM; RUECKER, ALEXANDER VON; DICKERHOFF, ROSWITHA. Difficulties in Determining Prophylactic Transfusion Thresholds of Platelets in Leukemia Patients. *American Society of Hematology Blood*, v. 92, n. 6, p. 8–9, 1998.
- STELLER, DANIEL; HERBST, NELE; PRIES, RALPH; et al. Impact of incubation method on the release of growth factors in non-Ca<sup>2+</sup>-activated PRP, Ca<sup>2+</sup>-activated PRP, PRF and A-PRF. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 47, n. 2, p. 365–372, 2019.
- SUNDMAN, EMILY A.; COLE, BRIAN J.; FORTIER, LISA A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *American Journal of Sports Medicine*, v. 39, n. 10, p. 2135–2140, 2011.
- TABLIN F, WALKER NJ, HOGLE SE, et al. Assessment of platelet growth factors in supernatants from rehydrated freeze-dried equine platelets and their effects on fibroblasts in vitro. *Am J Vet Res*, v. 69, n.1, p. 1512–1521, 2008.
- TERHAAR, HANNAH M.; ALLBAUGH, RACHEL A.; MOCHEL, JONATHAN P.; et al. Serum albumin and total protein concentration in the tear film of horses with healthy or diseased eyes. *Veterinary Ophthalmology*, v. 24, n. 1, p. 20–27, 2021.
- TEXTOR, JAMIE A.; TABLIN, FERN. Activation of equine platelet-rich plasma: Comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Veterinary Surgery*, v. 41, n. 7, p. 784–794, 2012.
- TEXTOR, JAMIE A.; WILLITS, NEIL H.; TABLIN, FERN. Synovial fluid growth factor and cytokine concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *Veterinary Journal*, v. 198, n. 1, p. 217–223, 2013.
- TEXTOR, JAMIE A; NORRIS, JEFFREY W; TABLIN, FERN. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Cell*, v. 12, n. 2, p. 271–278, 2011a.
- TEXTOR, JAMIE. 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.
- TRINDADE-SUEDAM, I.K., LEITE F.R.M., MORAIS J.A.N.D., et al. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. *J. Oral Implant.* V. 33. P. 334-339, 2007.
- TSUBOTA, KAZUO; GOTO, EIKI; FUJITA, HIROMI; et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *British Journal of Ophthalmology*, v. 83, n. 4, p. 390–395, 1999.
- TYRNENOPOULOU, Panagiota; DIAKAKIS, Nikolaos; KARAYANNOPOULOU, Maria; et al. Evaluation of intra-articular injection of autologous platelet lysate (PL) in horses with osteoarthritis of the distal interphalangeal joint. *Veterinary Quarterly*, v. 36, n. 2, p. 56–62, 2016.
- ULLAH, ANEEQ; MIRZA, BAIG; GHANI, NAHEED; et al. Epitheliotropic Effect of Autologous Serum in Persistent Corneal Epithelial Defects. *Pakistan Journal of Ophthalmology*, v. 24, n. 1, p. 19–26, 2008.
- VASCONCELOS, EUGENIA; FIGUEIREDO, A. C.; SEGATCHIAN, Jerard. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and Apheresis. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 29, n. 1, p. 13–16, 2003.
- VENDRUSCOLO, CYNTHIA P.; CARVALHO, ARMANDO DE M.; MORAES, LÍVIA F.; et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 2, p. 106–110, 2012.

WASELAU, MARTIN; SUTTER, W WESLEY. followed by controlled exercise for treatment in Standardbred racehorses. *Javma*, v. 232, n. 10, p. 1515–1520, 2008.

WATTS, E. J.; ROSE, M. T. Platelet-derived growth factor acts via both the Rho-kinase and p38 signaling enzymes to stimulate contraction in an in vitro model of equine wound healing. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 38, n. 4, p. 253–259, 2010.

WEIBRICH, GERNOT; BUCH, RAINER S.R.; KLEIS, WILFRIED K.G.; et al. Quantification of thrombocyte growth factors in platelets concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors*, v. 20, n. 2, p. 93–97, 2002.

WEIBRICH, GERNOT; KLEIS, WILFRIED K.G.; HAFNER, GERD; et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, n. 3, p. 357–362, 2003.

WEYRICH, A. S.; LINDEAAAANN, S.; ZIMMERMAN, G. A. The evolving role of platelets in inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 1, n. 9, p. 1897–1905, 2003.

WHITE, JAMES G.; KRUMWIEDE, MARCY. Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 98, n. 1, p. 69–72, 2007.

WROBLEWSKI, A. P., MEJIA, H. A., & WRIGHT, V. J. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, V.20 (2), P. 98–105,2010.

YUAN, Ting; ZHANG, Chang Qing; WANG, James H.C. Augmenting tendon and ligament repair with platelet-rich plasma (PRP). *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v. 3, n. 3, p. 139–149, 2013.

ZHANG, JIE; CRIMMINS, DARYL; FAED, JAMES M.; et al. Characteristics of platelet lysate compared to autologous and allogeneic serum eye drops. *Translational Vision Science and Technology*, v. 9, n. 4, p. 1–9, 2020.

ZIMMERMANN, ROBERT; ARNOLD, D.; STRASSER, E.; et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*, v. 85, n. 4, p. 283–289, 2003.

ZUBIN, ELENA; CONTI, VIRNA; LEONARDI, FABIO; et al. Regenerative therapy for the management of a large skin wound in a dog. *Clinical Case Reports*, v. 3, n. 7, p. 598–603, 2015.

## 1. 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 "COMPARAÇÃO DO PERFIL DOS FATORES DE CRESCIMENTO E MICROBIOLÓGICO DO SORO AUTÓLOGO E SORO AUTOLOGO ENRIQUECIDO COM FATORES DE CRESCIMENTO RESFRIADOS.", protocolo do CEUA: 232/2020 sob a

responsabilidade de Renata de Pino Albuquerque Maranhão 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/](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](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**Anexo 2****CARTA DE ANUENCIA**

Eu, Fabiola de Oliveira Paes Leme inscrito sob RG 20945432-5 ssp /sp e CPF 091.233.158-57 CRMV MG 9471 autorizo a realização do experimento intitulado “comparação do perfil dos fatores de crescimento e microbiológico do soro autólogo e soro autólogo enriquecido com fatores de crescimento resfriados” (protocolo CEUA/UFMG 232/2020), sob orientação da professora Renata de Pino Albuquerque Maranhão, no LAMICO da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a ser conduzido pelo mestrando Camilo Osorio Florez RNM F245089-Y, CPF 097.797.581-94, inscrito na pós-graduação em Ciência Animal da Escola de veterinária da UFMG.

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2020.

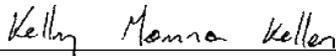


Assinatura do Responsável

**Anexo 3****CARTA DE ANUENCIA**

Eu, Kelly Moura Keller, inscrita sob RG 12300170-3, CPF 085.878.127-18 e CRMV MG 13579, autorizo a realização do experimento intitulado “Comparação do perfil dos fatores de crescimento e microbiológico do soro autólogo e soro autólogo enriquecido com fatores de crescimento resfriados” (protocolo CEUA/UFMG 232/2020), 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 Camilo Osorio Florez RNM F245089-Y, CPF 097.797.581-94, inscrito no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2020.



---

Prof<sup>a</sup> Kelly Moura Keller DMVP-  
EV/UFMG