

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÕES CELULAR E ULTRA-ESTRUTURAL DO  
CONCENTRADO DE PLAQUETAS EM CÃES E GATOS E  
AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO NA OSTEOARTROSE EM CÃES**

**Raúl Fernando Silva Molano**

**Belo Horizonte**

**Raul Fernando Silva Molano**

**CARACTERIZAÇÕES CELULAR E ULTRA-ESTRUTURAL DO  
CONCENTRADO DE PLAQUETAS EM CÃES E GATOS E  
AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO NA OSTEOARTROSE EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleuza Maria de Faria Rezende

Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilnecia de Cassia Santana.  
Prof. Dr. Jorge Uriel Carmona Ramírez

**Belo Horizonte**

**Escola de Veterinária – UFMG**

**2012**

M717c Molano, Raul Fernando Silva, 1974-  
Caracterizações celulares e ultra-estrutural do concentrado de plaquetas em cães e gatos e avaliação do seu efeito na osteoartrose em cães / Raul Fernando Silva Molano. – 2012.

75 p. : il.

Orientadora: Cleuza Maria de Faria Rezende

Co-orientadores: Gilnecia de Cássia Santana, Jorge Uriel Carmona Ramirez

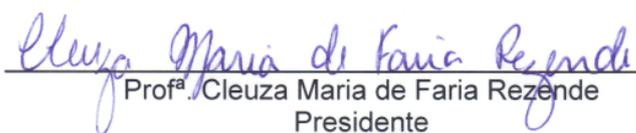
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Gato – Doenças – Teses. 3. Artrite – Teses. 4. Articulações – Doenças – Teses. I. Rezende, Cleuza Maria de Faria. II. Santana, Gilnecia de Cássia. III. Carmona Ramirez, Jorge Uriel. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

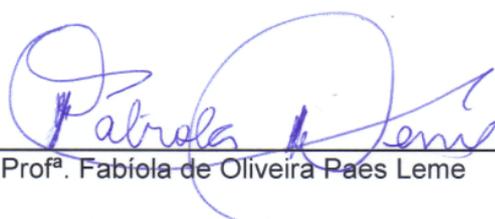
CDD – 636.708 96

Tese defendida e aprovada em 31 de maio de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Profª. Cleuza Maria de Faria Rezende  
Presidente

  
Profª. Maria Verônica de Souza

  
Prof. Elton Gonçalves Zenóbio

  
Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme

  
Profª. Eliane Gonçalves de Melo

“É importante para quem deseja alcançar uma certeza na sua investigação, o saber  
duvidar a tempo”

Aristóteles

*Este trabalho é dedicado ao meu pai Raúl, a minha mãe Ilda Cecilia, a minha filha  
Luisa Fernanda, e a toda minha família.  
A minha adorada Ana.  
Com amor e gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Caldas, pela oportunidade e o apoio.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Ao Brasil e à Escola de Veterinária da UFMG, pelo acolhimento.

À professora Cleuza, por ter me dado a oportunidade de ser o seu orientado, pela ajuda, paciência e confiança.

Às professoras Gilcinea e Fabiola, pela paciência ajuda e orientação no meu trabalho.

Ao Jorge, por ser meu amigo, pela orientação, pela ajuda e paciência.

Aos meus colegas Omar, Endrigo, Felipe, Jessica, pela ajuda e amizade durante todo este tempo.

Aos alunos de iniciação científica o Thiago e o Bruno, por toda a ajuda que me brindaram.

À Ana, sem o seu amor, a sua paciência, a sua ajuda e a sua compreensão, este trabalho não teria sido possível.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado !

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO GERAL</b> .....	1
	<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	3
	<b>CAPITULO I</b>	
<b>1</b>	<b>MORFOFISIOLOGIA DAS PLAQUETAS E POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS</b> .....	5
1.1	Introdução .....	5
1.2	Morfologia das plaquetas .....	5
1.2.1	Grânulos densos .....	6
1.2.2	Grânulos- $\alpha$ .....	6
1.2.3	Grânulos lisossomais .....	11
1.3	Funções das plaquetas na hemostase e na cicatrização .....	11
1.4	Concentrado autólogo de plaquetas .....	12
1.5	Possibilidades terapêuticas em diferentes áreas médicas .....	13
1.6	Possibilidades terapêuticas no sistema musculoesquelético .....	14
1.7	Possibilidades terapêuticas na osteoartrose .....	15
1.8	Referências bibliográficas .....	16
	<b>CAPITULO 2</b>	
<b>2</b>	<b>MÉTODO DO TUBO PARA OBTENÇÃO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS EM CÃO E GATO, E CARACTERÍSTICAS CELULARES</b> .....	26
	Resumo .....	26
	Abstract .....	26
2.1	Introdução .....	26
2.2	Material e métodos .....	27
2.2.1	Animais .....	27
2.2.2	Obtenção do concentrado autólogo de plaquetas e determinação das características celulares .....	28
2.2.3	Análise estatística .....	29
2.3	Resultados e discussão .....	29
2.4	Referências bibliográficas .....	34
	<b>CAPITULO III</b>	
<b>3</b>	<b>DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO E CARACTERÍSTICAS ULTRA-ESTRUTURAIS DO COÁGULO OBTIDO A PARTIR DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS EM CÃES E GATOS</b> .....	38

---

---

	Resumo .....	38
	Abstract .....	38
3.1	Introdução .....	39
3.2	Material e métodos .....	40
3.2.1	Animais .....	40
3.2.2	Determinação da concentração dos fatores de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ), derivado das plaquetas tipo AB (PDGF-AB) e tipo BB (PDGF-BB) .....	40
3.2.3	Descrição das características ultra-estruturais dos coágulos obtidos a partir de concentrados autólogos de plaquetas .....	41
3.2.4	Análise estatística .....	42
3.3	Resultados e discussão.....	43
3.3.1	Determinação da concentração de Fatores de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ), derivado das plaquetas tipo AB (PDGF-AB) e derivado das plaquetas tipo BB (PDGF-BB) .....	43
3.3.2	Características ultra-estruturais dos concentrados autólogos de plaquetas (CAP) .....	49
3.4	Referências bibliográficas .....	54
	<b>CAPITULO IV</b>	
4	<b>AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E EM PLATAFORMA DE FORÇA DO EFEITO DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP) NO TRATAMENTO DA OSTEOARTROSE (OA) ADQUIRIDA NO CÃO.....</b>	<b>57</b>
	Resumo .....	57
	Abstract .....	57
4.1	Introdução .....	58
4.2	Material e métodos .....	58
4.2.1	Animais .....	58
4.2.2	Avaliação radiográfica .....	61
4.2.3	Avaliação na plataforma de força .....	61
4.2.4	Análise estatística .....	62
4.3	Resultados e discussão .....	62
4.4	Referências bibliográficas .....	71
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>75</b>

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Contagens hematológicas / $\mu$ L em sangue total e nos concentrados autólogos de plaquetas de cães da raça Fila Brasileiro .....	30
Tabela 2	Contagens hematológicas / $\mu$ L no sangue total e nas frações A e B dos concentrados autólogos de plaquetas de cães .....	31
Tabela 3	Contagens hematológicas / $\mu$ L em sangue total e nos concentrados autólogos de plaquetas de gatos .....	32
Tabela 4	Contagens hematológicas / $\mu$ L no sangue total e nas frações A e B dos concentrados autólogos de plaquetas de gatos .....	33
Tabela 5	Concentração de TGF- $\beta$ 1 no plasma e no sobrenadante de CAP ativado com gluconato de cálcio e cloreto de cálcio em cães .....	43
Tabela 6	Mediana (intervalo interquartilico) da concentração (pg / mL) do fator de crescimento derivado das plaquetas AB no plasma e sobrenadante de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativado com gluconato de cálcio ou cloreto de cálcio .....	44
Tabela 7	Concentração de TGF- $\beta$ 1 (ng/mL e ng/mg da proteína total) no plasma e no sobrenadante das porções A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, em cães .....	45
Tabela 8	Concentração de TGF- $\beta$ 1 (ng/mL e ng/mg da proteína total) no plasma e no sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina, em gatos .....	47
Tabela 9	Concentração de TGF- $\beta$ 1 (ng/mL e ng/mg da proteína total) as 3 e 12 horas, em sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina, em gatos .....	47
Tabela 10	Concentração de PDGF-BB (pg/mL e pg/mg da proteína total) no plasma e no sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina, em gatos .....	48
Tabela 11	Concentração de PDGF-BB (pg/mL e pg/mg da proteína total) as 3 e 12 horas, em sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina em gatos ...	48
Tabela 12	Características celulares dos concentrados autólogos de plaquetas de cão e gato, utilizados para obter as amostras para avaliação ultra-estrutural .....	50

---

---

Tabela 13	Características ultra-estruturais dos coágulos obtidos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, em cães .....	50
Tabela 14	Características ultra-estruturais dos coágulos obtidos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, em gatos .....	51
Tabela 15	Características dos cães incluídos no estudo clínico de avaliação do efeito terapêutico do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) no tratamento da osteoartrose .....	59
Tabela 16	Características radiográficas e artroscópicas da articulação femoro-tibio-patelar dos cães antes do tratamento cirúrgico .....	60
Tabela 17	Contagens hematológicas / $\mu\text{L}$ em sangue total e nos concentrados autólogos de plaquetas dos cães tratados com CAP .....	63
Tabela 18	Média da distribuição porcentual do pico de força vertical ( $\text{Pf}_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D) (média, erro padrão da média), dos animais tratados com concentrado autólogo de plaquetas .....	67
Tabela 19	Média da distribuição porcentual do impulso vertical ( $\text{If}_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D). (média, erro padrão da média), dos animais tratados com concentrado autólogo de plaquetas .....	67
Tabela 20	Média da distribuição porcentual do pico de força vertical ( $\text{Pf}_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D) (média, erro padrão da média), do grupo controle .....	68
Tabela 21	Média da distribuição porcentual do impulso vertical ( $\text{If}_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D) (média, erro padrão da média), do grupo controle .....	68
Tabela 22	Média da distribuição porcentual do impulso vertical ( $\text{If}_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral anterior (D). (média, erro padrão da média), do grupo tratado com CAP e o grupo controle, comparação entre membros contralaterais .....	69

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Tubos com concentrado autólogo de plaquetas (CAP) de cão (A) e de gato (B), obtido mediante uma única centrifugação, a 191g e 85g respectivamente, durante 6 minutos .....	28
Figura 2	Tubos com concentrado autólogo de plaquetas (CAP) de cão e de gato, apresentando as frações A e B. Obtido mediante uma única centrifugação a 191g e 85g respectivamente, durante 6 minutos .....	29
Figura 3	Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão mostrando as características microscópicas dos coágulos de CAPs ativados com gluconato de cálcio (A) ou batroxobina (B), em cães .....	51
Figura 4	Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão mostrando as características microscópicas dos coágulos de CAPs ativados com gluconato de cálcio (A) ou batroxobina (B), em gatos .....	52
Figura 5	Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão mostrando os eixos maior e menor de plaquetas ativadas com gluconato de cálcio (A) ou batroxobina (B) .....	52
Figura 6	Imagens artroscópicas da articulação femoro-tibio-patelar de cães tratados (2 e 4) e não tratados (7 e 8) com concentrado autólogo de plaquetas antes do tratamento cirúrgico .....	61
Figura 7	Radiografias da articulação femoro-tibio-patelar de cães tratados com concentrado autólogo de plaquetas (2, 4) antes do tratamento cirúrgico, aos 30, 60 e 90 dias do pós cirúrgico, nas posições médio-lateral (A-D, I-L) e crânio-caudal (E-H, M-P) .....	65
Figura 8	Radiografias da articulação femoro-tibio-patelar de cães do grupo controle (7, 8) antes do tratamento cirúrgico, aos 30, 60 e 90 dias do pós cirúrgico, nas posições médio-lateral (A-E) e crânio-caudal (F-J) .....	66

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

CAP: concentrado autólogo de plaquetas

PLT: contagem de plaquetas

PCV: hematócrito (packed cell volume)

WBC: leucócitos (white blood cell)

LYM: linfócitos

MON: monócitos

GRA: granulócitos

MPV: volume plaquetário médio

PDW: índice de distribuição de plaquetas

TGF-  $\beta_1$ : fator de crescimento beta transformador 1

PDGF-AB: fator de crescimento derivado das plaquetas tipo AB

PDGF-BB: fator de crescimento derivado das plaquetas tipo BB

RLCCr: ruptura de ligamento cruzado cranial

OA: osteoartrose

Pf<sub>z</sub>: pico de força vertical

If<sub>z</sub>: impulso vertical

---

## RESUMO GERAL

Objetivou-se com este estudo: avaliar um método manual para obter concentrado autólogo de plaquetas (CAP) no cão e no gato para aplicação clínica, medir as concentrações do fator de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ) em cães e fator de crescimento derivado das plaquetas tipo AB (PDGF-AB) em cães e gatos no plasma e nos concentrados autólogos de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou cloreto de cálcio, medir as concentrações de TGF- $\beta_1$  em cães no plasma e nos CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, medir as concentrações de TGF- $\beta_1$  e do fator de crescimento derivado das plaquetas tipo BB (PDGF-BB) em gatos no plasma e nos CAP ativados com gluconato de cálcio ou trombina bovina, avaliar por microscopia eletrônica de transmissão as características ultra-estruturais de coágulos sanguíneos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, avaliar radiograficamente e em plataforma de força o efeito terapêutico do CAP no tratamento da osteoartrose (OA) adquirida no cão. Para a padronização do método do tubo para se obter CAP, utilizaram-se 12 cães e 12 gatos. Para avaliar a reprodutibilidade da metodologia e das características celulares dos CAP utilizaram-se 16 animais de cada espécie. Neste últimos animais o plasma derivado de centrifugação foi dividido em duas frações iguais, a fração A correspondeu aos primeiros 50% de plasma adjacente da interface sangue-plasma e a fração B correspondeu aos 50% do plasma restante no tubo. Nestes mesmos grupos foi feita a determinação dos fatores de crescimento. Na etapa de padronização o sangue foi colhido em frascos com EDTA para obtenção do plasma e o CAP foi obtido de sangue colhido num frasco com solução ACD-A. Foi medida a concentração de TGF- $\beta_1$  e PDGF-AB em cães e PDGF-AB no gato, no plasma e no sobrenadante de CAP ativado com gluconato ou cloreto de cálcio. Na etapa de reprodutibilidade o plasma e o CAP foram obtidos utilizando ACD-A. Foi medida a concentração de TGF- $\beta_1$  no plasma e no sobrenadante de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina no cão, e a concentração de TGF- $\beta_1$  e PDGF-BB no plasma e no sobrenadante de CAP ativado com gluconato de cálcio ou trombina bovina no gato. Empregou-se um outro grupo de quatro cães e quatro gatos para avaliar as características ultra-estruturais de coágulos sanguíneos obtidos de CAP ativado com gluconato de cálcio ou batroxobina. Foram feitas contagens celulares no sangue total e no CAP. Verificou-se em todas as amostras diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre a quantidade de plaquetas, leucócitos, granulócitos, monócitos, mas não entre os valores de linfócitos, no sangue total e no CAP. A eficiência de concentração de plaquetas foi 22,20% a 46,34% nos cães e 24,75% a 35,39% nos gatos. A porcentagem de concentração de plaquetas nos CAP em relação ao sangue total foi 49,40% a 224,38% nos cães e 73,28% a 147,70% nos gatos. Em cães a concentração de TGF- $\beta_1$  foi estatisticamente ( $P < 0,01$ ) mais alta na fração A do CAP. No gato não se verificou diferença significativa ( $P > 0,01$ ) na concentração de TGF- $\beta_1$  e de PDGF-BB entre as frações A e B do CAP. Verificou-se nos cães diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ) em relação à área de espaço intracelular e área de fibras de fibrina nos coágulos de CAP que foram ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina. Em gatos os coágulos obtidos a partir de CAP ativado com batroxobina apresentaram diferença estatística ( $P < 0,01$ ), em termos de área das plaquetas, área de fibras de fibrina, relação eixo menor – eixo maior, relação eixo maior – eixo menor, nos coágulos que foram ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, os resultados demonstram maior grau de ativação das plaquetas ativadas com gluconato de cálcio. Para avaliar o efeito terapêutico do CAP, utilizou-se 10 cães de diferentes raças com ruptura de ligamento cruzado cranial (RLCCr) que foram submetidos a tratamento cirúrgico de substituição do ligamento por autoenxerto de fâscia lata guiado por videoartroscopia. Os cães foram divididos em dois grupos segundo o pós operatório: seis receberam três injeções intra-articulares de CAP (grupo I), iniciando imediatamente após a cirurgia e em intervalos de 15 dias, e o outro grupo constituído

por quatro cães, receberam um agente modificador da osteoartrose (OA), via oral, diariamente, durante o tempo de estudo (grupo II). A avaliação radiográfica evidenciou, nos dois grupos de pacientes evolução discreta da OA. Verificou-se no grupo I melhor apoio na plataforma de força com evolução favorável e retorno do suporte no membro operado em todos os animais. Aos 90 dias o suporte no membro operado era igual ao do contralateral. No grupo II o apoio no membro operado evoluiu discretamente, ao longo dos 90 dias de avaliação, mantendo-se maior apoio no membro contralateral. Os resultados indicam que o método de centrifugação única permite concentrar plaquetas nestas duas espécies. O gluconato de cálcio é a substância indicada para ativação das plaquetas no cão e no gato, e a fração A do CAP no cão deve ser a empregada para fins terapêuticos, e no gato ambas frações podem ser usadas. Os resultados sugerem o possível potencial do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) como alternativa biológica, versátil e econômica, como terapêutica no tratamento da OA.

**Palavras-chave:** cão, concentrado de plaquetas, gato, osteoartrose.

## GENERAL ABSTRACT

The objectives of this study were: to evaluate a manual method for obtaining autologous platelet concentrate (APC) in dog and cat for clinical purposes, measure the concentrations of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) and platelet-derived growth factor type AB (PDGF-AB) in dogs and cats, in plasma and autologous platelet concentrates (APC) activated with calcium gluconate or calcium chloride, measure the concentrations of TGF- $\beta$ 1 in dogs, in plasma and APC activated with calcium gluconate or batroxobin, measuring the concentrations of TGF- $\beta$ 1 and platelet derived growth factor type BB (PDGF-BB) in cats, in plasma and APC activated with calcium gluconate or bovine thrombin, to evaluate by transmission electron microscopy ultrastructural characteristics of blood clots of APC activated with calcium gluconate or batroxobin, in dogs and cats, and too evaluate radiographic and plate force gait analysis, the therapeutic effect of APC in the treatment of osteoarthritis (OA) acquired in the dog. For standardization, we used 12 dogs and 12 cats. To evaluate the reproducibility of the methodology and cellular characteristics of APC, we used 16 animals of each species. These last dogs and cats, the plasma derived from the blood centrifugation was divided into two equal fractions, namely, PC-A and PC-B. Platelet concentrate-A (lower fraction) was considered as the first 50% plasma fraction near to the packed cell volume (PCV), and PC-B (upper fraction) represented the 50% remaining plasma. The same groups of animals were used for determining the concentration of growth factors. For standardization, to obtain the plasma blood was collected with EDTA and APC was obtained from blood collected with ACD-A solution. TGF- $\beta$ 1 and PDGF-AB concentrations after activation with gluconate or calcium chloride were measured in dogs and PDGF-AB in cats. To reproducibility, for blood collection was used vials with ACD-A solution to obtain the plasma and APC. Was determined concentration of TGF- $\beta$ 1 after activation with calcium gluconate or batroxobin in dogs; TGF- $\beta$ 1 and PDGF-BB concentrations in cats, after activation with calcium gluconate or bovine thrombin. We used blood from another group of four dogs and four cats, for to evaluate the ultrastructural characteristics of blood clots obtained of APC activated with calcium gluconate or batroxobin. Cell counts were performed in whole blood and the APC. It was found in all samples statistically significant ( $P < 0.01$ ) between the number of platelets, leukocytes, granulocytes, monocytes, but not between the values of lymphocytes in whole blood and the APC. Platelet efficiency concentration was 22.20% to 46.34% in dogs and 24.75% to 35.39% in cats. The percentage of platelet concentration in APC relative to the total blood was from 49.40% to 224.38% in dogs and 73.28% to 147.70% in cats. In dogs the concentration of TGF- $\beta$ 1 was statically significantly higher ( $P < 0.01$ ) in fraction A of APC. In cats there was no significant difference ( $P > 0.01$ ) in TGF- $\beta$ 1 and PDGF-BB concentrations between the A and B fractions of APC. In dogs was found statistically significant difference ( $P < 0.01$ ) when compared intracellular space area and fiber area, in clots of APC that were activated with calcium gluconate or batroxobin. In cats clots obtained from APC activated with batroxobin show statistical difference ( $P < 0.01$ ) in area of platelets, area of fibrin fibers, ratio minor-major axes, ratio major-minor axes. We used 10 dogs, of different breeds with cranial cruciate ligament (CCL) rupture. These dogs were treated surgically by replacement of CCL with auto-graft of fascia lata, guided for video arthroscopy. They were divided into two groups according to postoperative period, six dogs received three intra-articular injections of autologous platelet concentrate (group I), starting immediately after surgery and at intervals of 15 days, and four dogs received a modifying agent of OA daily, for all time of evaluation (group II). Radiographic evaluation showed, in both groups of patients, discrete evolution of OA. Group I was better in plate force gait analysis with favorable strength and returning the support member operated in all animals. At 90 days, the support of body mass on the operated limb was equal to that of

contralateral limb. In-group II the support in the operated limb has evolved slightly, supporting the same body mass over 90th days. At 90 days, the support body mass of the contralateral limb was greater than the affect limb. The results indicate that tube method allows for simple centrifugation concentrate platelets in dogs and cats. The calcium gluconate is the substance suitable for activation of APC in dogs and cats, and A fraction of APC in dogs must be used for therapeutic purposes, in the cat both portions may be used. The results suggest the possible potential of APC as a biological alternative, versatile and economical, as a therapeutic option in the treatment of OA.

**Keywords:** cat, dog, osteoarthritis, platelet concentrate.

## CAPITULO I

### 1. MORFOFISIOLOGIA DAS PLAQUETAS E POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS

#### 1.1 Introdução

Em condições fisiológicas, as plaquetas, depois de ativadas, liberam quantidades consideráveis de fatores de crescimento, dentre os quais se destacam o fator de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-I), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e outras moléculas que modulam a inflamação e a reparação tissular, sendo, portanto, os concentrados autólogos de plaquetas (CAP) considerados fonte destes fatores (Anitua et al., 2004; Argüelles et al., 2006). Até o momento, apenas dois métodos têm sido descritos para obtenção de CAP a partir de sangue de cães: o método do tubo (também denominado "manual") (Bonomi et al., 2007; Casati et al. 2007) e o método semi-automatizado *SmartPReP 2 system* (Thoesen et al., 2006). As várias metodologias descritas para concentrar plaquetas mediante o método do tubo, apresentam resultados experimentais não satisfatórios, devido a grande variabilidade experimental e a ausência de padronização metodológica para selecionar o anticoagulante ideal e os parâmetros de centrifugação que permitam concentrar um número expressivo de plaquetas em cães. Por outro lado, o uso de dispositivos semi-automatizados (Thoesen et al., 2006) para concentrar plaquetas de cão são onerosos, na maioria das vezes.

As plaquetas nos mamíferos são fragmentos citoplasmáticos sem núcleo derivados de megacariócitos da medula óssea (Harrison, 2005). Os Megacariócitos se desenvolvem a partir de uma célula progenitora pluripotencial CD34+ mielóide que reside

no tecido hematopoiético e na corrente sanguínea e representam aproximadamente 0,1-0,5% das células nucleadas da medula óssea. Estas células estão localizadas sob os capilares sinusoidais na medula óssea e emitem prolongamentos citoplasmáticos (pró-plaquetas), que estão em contato com o sangue. Estes prolongamentos são seccionados por ação mecânica e as plaquetas são liberadas na corrente sanguínea (Hartwig e Italiano, 2003). A plaqueta do cão e do gato, tem forma de disco com 1-3  $\mu\text{m}$  de diâmetro no cão (Wilkerson et al., 2001) e 2-6  $\mu\text{m}$  no gato (Boudreaux et al., 2010), com volume celular médio de 10,1 (8,4-11,5) fL no cão (Moritz et al., 2005) e de 11 (8,6-14,1) fL no gato (Boudreaux e Ebbe, 1998). O número de plaquetas circulantes oscila entre 200.000 a 500.000/ $\mu\text{L}$  e 300.000 a 800.000/ $\mu\text{L}$  no cão e no gato, respectivamente. Em termos gerais, a vida média das plaquetas nos mamíferos domésticos varia entre seis a dez dias, permanecendo em condições normais cerca de 30% delas sequestradas no baço. Uma vez cumprido o seu período vital, elas são destruídas e removidas por células do sistema retículo endotelial do baço, fígado e medula óssea (Jain, 1993).

#### 1.2 Morfologia das plaquetas

As plaquetas possuem membranas similares às de outras células e caracterizam-se por ter fosfolipídios organizados em bicamada formando um núcleo hidrofóbico (Boudreaux, 2008). Intercaladas entre o fluido da matriz lipídica se encontram proteínas e glicoproteínas, das quais algumas atuam como receptores especializados, importantes para as respostas da plaqueta. O complexo de

glicoproteínas que tem sido bem caracterizado é a glicoproteína IIb-IIIa, também conhecida como integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , cuja função primária é atuar como receptor para o fibrinogênio e para o Fator de von Willebrand (vWF) e auxiliar nos estados iniciais de adesão das plaquetas ao subendotélio (Bennet, 2005). Sob a membrana celular se encontram estruturas cilíndricas que formam uma banda circunferencial de microtúbulos, compostas de protofilamentos formados por  $\alpha$ - $\beta$  dímeros de tubulina dispostos de forma helicoidal da cabeça à cauda e que são responsáveis por manter a forma discóide das plaquetas circulantes (Italiano et al., 2003).

A membrana das plaquetas contém numerosos receptores que são ativados por resposta aos agonistas plaquetários como adenosina-difosfato (ADP), colágeno, trombina e tromboxanos (Gachet, 2005). Muitos receptores plaquetários produzem a ativação das plaquetas ao induzir o metabolismo do fosfatidilinositol, a mobilização de cálcio, a geração de diacilglicerol (DAG), e a redução da adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Zimmerman, 2008). O sistema canicular aberto se apresenta como uma massa tortuosa de canais interconectados que se estendem profundamente no interior do citoplasma e está ligado com a superfície da plaqueta (Klinger, 1997). Este sistema pode servir como um conduto para a liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários e pode atuar como um método de fagocitose de partículas tais como vírus (Boudreaux et al., 1990).

Outra organela citoplasmática especializada é o sistema tubular denso, derivado do retículo endoplasmático liso do megacariócito, e é o responsável pela síntese de prostaglandinas e retenção de cálcio por parte da plaqueta. Existem também numerosos microfilamentos no interior do citoplasma, formados por actina,

miosina e tropomiosina, que tem propriedades contráteis e papel importante na concentração dos grânulos no centro da plaqueta e na retração do coágulo. Dispersos no centro do citoplasma da plaqueta encontram-se mitocôndria, pequenos acúmulos de glicogênio e numerosos grânulos de armazenamento (Boudreaux, 2008). As plaquetas não só estão capacitadas para mobilizar e liberar produtos preformados, mas tem a capacidade de sintetizar novas proteínas para manter a hemostasia e outros eventos biológicos (Zimmerman, 2008).

### 1.2.1 Grânulos densos

Os grânulos densos estocam serotonina, histamina, dopamina, catecolaminas, (ADP) / adenosina-trifosfato (ATP), cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e, graças as ações destas substâncias, as plaquetas ativadas influenciam profundamente o meio ambiente nas adjacências.

O ADP promove a agregação plaquetária, e o ATP participa na resposta das plaquetas ao colágeno. O  $Ca^{2+}$  é um cofator necessário para a agregação plaquetária e formação de fibrina (Anitua, 2004).

Existem relatos de que o  $Ca^{2+}$  poderia modular a proliferação e diferenciação de queratinócitos (Lansdown, 2002).

A serotonina tem receptores nas células vasculares e a sua liberação conduz a vasoconstrição e aumento da permeabilidade capilar. A histamina pode ter efeitos pro e anti-inflamatórios (Anitua, 2004).

### 1.2.2 Grânulos- $\alpha$

Existe evidência de que as proteínas secretadas pelos grânulos- $\alpha$  têm funções na hemostasia, na inflamação, na aterosclerose, na defesa do hospedeiro contra agentes microbianos, na

angiogênese, na reparação da ferida e nos tumores malignos. A função deles na inflamação está relacionada com a expressão de receptores que facilitam a adesão das plaquetas a outras células vasculares e com a liberação de uma ampla gama de quimiosinas. A P-selectina, que se transloca dos grânulos- $\alpha$  até a membrana de superfície das plaquetas depois da ativação, participa nas interações de plaquetas com as células endoteliais, monócitos, neutrófilos e linfócitos. Os grânulos- $\alpha$  também têm ação sobre a inflamação mediante a secreção de altas concentrações de fatores pró-inflamatórios e modulação imunológica. Estes mediadores induzem o recrutamento, ativação, secreção de quimiosinas, e diferenciação de células vasculares e hemáticas.

Os grânulos- $\alpha$  contém ampla gama de quimiosinas como CXCL1 (GRO- $\alpha$ ), CXCL4, CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP,  $\beta$ -TG, CTAP-III, do PAN-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), e CCL5 (RANTES). Destes, o CXCL4 tem demonstrado induzir a adesão e degranulação de neutrófilos, ativação dos monócitos e a diferenciação dos monócitos a macrófagos e células espumosas. Numerosos estudos demonstram que CXCL7 induz a quimiotaxia de neutrófilos e a adesão às células endoteliais (Blair e Flaumenhaft, 2009). Os grânulos- $\alpha$  contém uma grande variedade de proteínas pro e antiangiogênicas. Os fatores de crescimento e outras proteínas armazenadas incluem o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento beta transformador (TGF- $\beta$ ) (Marx, 2004), fator plaquetário 4 (PF4), interleucina 1 (IL-1), fator de crescimento endotelial derivado das plaquetas (PDEGF), fator de crescimento insulínico (IGF), osteocalcina, osteonectina, fibrinogênio, vitronectina, fibronectina e trombospondina (TSP)-1, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento

epidérmico (EGF), fator de crescimento hepático (HGF) (Lacci e Dardik, 2010). Estes ativadores angiogênicos promovem coletivamente o aumento da permeabilidade da parede do vaso e o recrutamento, crescimento e proliferação de células endoteliais e fibroblastos. Embora estes fatores de crescimento sejam secretados por uma variedade de células inflamatórias, a rapidez com a qual as plaquetas se acumulam nos lugares de lesão vascular faz delas uma fonte importante de mediadores mitogênicos. Os grânulos- $\alpha$  contém outros mediadores pro-angiogênicos, que incluem angiopoietina, CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) e metaloproteinases de matriz (MMP-1, -2 e -9) (Blair e Flaumenhaft, 2009). O CXCL12 derivado das plaquetas tem sido relatado como indutor do recrutamento de células progenitoras CD34 + de trombos arteriais *in vivo* e promotor da diferenciação de culturas de células CD34 + nas células progenitoras endoteliais (Massberg et al., 2006). As principais proteínas liberadas pelas plaquetas e que poderiam participar na cicatrização de feridas e que estão contidas em grânulos de armazenamento são descritas a seguir.

#### *Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)*

As principais fontes de produção de PDGF além das plaquetas são os fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (Enoch e Leaper, 2008). A família de PDGF se compõe de quatro classes de polipeptídios diferentes, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D. A forma biologicamente ativa de PDGF são proteínas dímeras dissulfeto, entre eles quatro homodímeros PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD e um heterodímero, PDGF-AB. O PDGF-A e PDGF-B são processados intracelularmente e secretados nas formas ativas, enquanto o PDGF-C e PDGF-D são secretados como fatores latentes que requerem ativação proteolítica (Trojanowska, 2008). Eles exercem suas funções biológicas mediante a

união a receptores PDGF (PDGFR)- $\alpha$  e  $\beta$ , mas só o PDGF-BB apresenta alta afinidade por ambos receptores (Ye et al., 2010). O PDGF estimula a proliferação de megacariócitos, eritrócitos, leucócitos, e seus precursores e também tem um importante papel na embriogênese.

Estudos clínicos sugerem uma possível relação entre PDGF / PDGFR e tromboiose (Ye et al., 2010). O PDGF também inicia a quimiotaxia dos neutrófilos e macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos e estimula a mitogênese de células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos. Junto com o TGF- $\beta$  estimula o depósito rápido de tecido conjuntivo novo para reconstruir a matriz extracelular (Beldon, 2010). Estimula a proliferação dos osteoblastos e condrócitos, e atua como um mitógeno para os osteoblastos e as células mesenquimais pluripotenciais (Zachos e Bertone, 2005).

#### *Fator de crescimento beta transformador (TGF $\beta$ )*

As principais fontes de produção do TGF $\beta$  são as plaquetas, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, queratinócitos (Enoch e Leaper, 2008), astrócitos, osteoblastos e osteoclastos (Schiller et al., 2004). O TGF- $\beta$  é o protótipo de uma superfamília de mais de 40 membros, que compartilham semelhanças estruturais e funcionais. Esta família inclui as três isoformas presentes em mamíferos TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e TGF- $\beta_3$ ; as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) e o homólogo decapentaplégico *Drosophila* (Dpp); as ativinas; e a substância inibidora mulleriana (MIS) (Yue e Mulder, 2001). O TGF- $\beta_1$  e TGF- $\beta_2$  são as isoformas mais representativas encontradas nos grânulos- $\alpha$  das plaquetas (Anitua et al., 2004). O TGF- $\beta$  é secretado pelas células unido não covalentemente a seu pró-peptídeo (peptídeo associado à latência). Na maioria das células, este pequeno complexo latente está associado com uma grande

glicoproteína (LTBP). Este complexo se dirige para a matriz extracelular, onde o TGF- $\beta$  é liberado depois da ativação. A ativação pode ocorrer através de diversos mecanismos como as proteases, as integrinas, e as espécies reativas de oxigênio (Vehviläinen, 2011). As ações celulares de TGF- $\beta$  ativado são mediadas por seis tipos de receptores (T $\beta$ Rs) dos quais os tipos T $\beta$ R-I e T $\beta$ R-II são os mais importantes (Huang e Huang, 2005). Estes membros da superfamília TGF- $\beta$  desempenham um papel fundamental em quase todos os processos celulares, incluindo o desenvolvimento embrionário inicial, o crescimento celular, a diferenciação, a motilidade celular e a apoptose (Yue e Mulder, 2001).

O TGF- $\beta$  atrai os macrófagos para a região da lesão, que uma vez ativados liberam citocinas adicionais, incluindo o FGF, PDGF, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1. Além disso, estimula a quimiotaxia de fibroblastos e músculo liso e modula a expressão de colágeno e colagenase. Uma vez ativados, os macrófagos liberam PDGF e TGF- $\beta$  para promover a atração de fibroblastos e células musculares lisas para a zona da ferida. Junto com o PDGF estimula o depósito rápido de tecido conjuntivo novo para reconstruir a matriz extracelular (Beldon, 2010). Estimula a proliferação das células mesenquimais indiferenciadas, regula a mitogênese de células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos, regula a síntese de colágeno e a secreção de colagenase, regula os defeitos mitogênicos de outros fatores de crescimento, estimula a quimiotaxia de células endoteliais e a angiogênese, inibe a proliferação de linfócitos e macrófagos (Lee et al., 2011). Este fator de crescimento também inicia a diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais, induz a proliferação dos condrócitos e dos osteoblastos e regula a síntese de colágeno e proteoglicanos (Zachos e Bertone, 2005).

#### *Fator de crescimento epidérmico (EGF)*

As maiores fontes de produção deste fator de crescimento são as plaquetas, macrófagos, queratinócitos e também saliva, urina, leite e plasma (Enoch e Leaper, 2008). O EGF é liberado pelas células e depois anexado pela própria célula para estimular seu próprio crescimento ou para estimular a capacidade para se dividir e originar outra célula. O EGF se une aos receptores na superfície celular e transmite o sinal para o interior da célula. Quando o receptor se une ao EGF ele se ativa formando um dímero com outros receptores. São conhecidos quatro tipos de receptores. Cada receptor pode se unir a outro receptor e formar um dímero ou misturar-se entre eles e formar heterodímeros. O número de fatores de crescimento que interage com estes receptores é muito variado e inclui o EGF, fator de crescimento alpha (TGF- $\alpha$ ) e neuregulinas (Goodsell, 2003). O EGF estimula a quimiotaxia endotelial ou a angiogênese, regula a secreção de colagenase, estimula a mitogênese epitelial ou mesenquimal (Lee et al., 2011).

#### *Fator de crescimento hepático (HGF)*

A fonte principal de HGF são os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (Enoch e Leaper, 2008), embora tenha sido originalmente isolado de plaquetas humanas (Pietrapiana et al., 2005). O HGF foi primeiramente identificado como um fator de circulação que favorece a regeneração hepática após lesões, mas também tem atividades celulares pleiotrópicas que incluem angiogênese, anti-apoptose, mitogênese, numa ampla variedade de tipos celulares que expressam o receptor de HGF c-Met tirosina quinase (Chanda, 2009). O HGF estimula a reepitelização, a neovascularização e a formação do tecido de granulação (Enoch e Leaper, 2008).

#### *Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)*

As principais células produtoras de VEGF são as plaquetas e as células endoteliais (Enoch e Leaper, 2008). O VEGF representa uma família de glicoproteínas homodiméricas que inclui sete membros: o fator de crescimento da placenta (PlGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F. O VEGF ou VEGF-A tem sete isoformas conhecidas compostas de 121, 145, 148, 165, 183, 189, ou 206 aminoácidos. Foram identificados três receptores de tirosina cinase, tirosina cinase fms-como Flt-1 (VEGFR-1/Flt-1), a região do domínio da cinase, também conhecida como cinase fígado fetal (VEGFR-2/KDR/Flk-1), e Flt-4 (VEGFR-3) (Hoeben, 2004). O VEGF também é conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF), baseado na sua capacidade de induzir hiperpermeabilidade (Sheikpranbabu et al., 2010). Existem evidências de que esta família tem um papel fundamental no crescimento e na diferenciação das células vasculares e células linfáticas endoteliais (Ferrara, 2001). O EVGF aumenta a angiogênese e a permeabilidade dos vasos e estimula a mitogênese de células endoteliais (Lee et al., 2011).

#### *Fator de crescimento insulínico (IGF)*

A principal fonte de IGF-1 são as plaquetas, o plasma, o fígado (Enoch e Leaper, 2008), osteoblastos, condrócitos e matriz extracelular do osso (Zachos e Bertone, 2005). Os fatores de crescimento similares à insulina, IGF-1 e IGF-2, os receptores de IGF tipo 1 e tipo 2, e seis proteínas de união IGF conhecidas, IGFBP-1-6, compreendem um complexo sistema de hormônios peptídicos, receptores da superfície celular e fatores circulantes que intervêm na regulação do crescimento, na sobrevivência e na diferenciação de um grande número de tecidos (Chesik et al.,

2007). Ele induz a proliferação e a diferenciação de células osteoprogenitoras (Zachos e Bertone, 2005), a proliferação de fibroblastos, estimula a síntese de proteoglicanos sulfatados e colágeno (Enoch e Leaper, 2008), estimula a expressão de RNA mensageiro da fosfatase alcalina, a osteopontina e osteocalcina nas células do estroma da medula óssea (Intini, 2009).

#### *Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)*

O FGF é produzido principalmente por plaquetas, células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos (Enoch e Leaper, 2008), osteoblastos e condrócitos (Zachos e Bertone, 2005). Os FGFs compreendem uma família estruturalmente relacionada de 22 moléculas e na nova nomenclatura, estão numerados consecutivamente. Para exercer a sua atividade biológica, os FGFs interagem com alta afinidade aos receptores tirosina cinase FGF (FGFRs) (Ribatti et al., 2007). O FGF promove o crescimento e a diferenciação dos condrócitos e dos osteoblastos, é mitogênico para as células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos (Lee et al. 2011), induz a replicação das células inflamatórias, estimula a diferenciação das células pluripotentes, e estimula a angiogênese (Zachos e Bertone, 2005).

#### *Fator de crescimento endotelial derivado das plaquetas (PDEGF)*

O fator de crescimento endotelial derivado das plaquetas (PDEGF) é um fator angiogênico não vinculado à heparina, inicialmente isolado das plaquetas. Estudos posteriores demonstraram que o PDEGF é o homodímero timidina fosforilase (TP) (O'Byrne et al., 2000). O PDEGF/TP não estimula o crescimento de células endoteliais, mas sim a quimiotaxia delas, e induz a angiogênese *in vivo* com a ativação da timidina fosforilase como uma enzima. É

expresso nos nódulos linfáticos, nos linfócitos periféricos, no baço, no pulmão, no fígado, na placenta e no endométrio (Aoki et al., 2003). Estimula a migração de células endoteliais e a angiogênese (Liekens et al., 2007).

#### *Outras proteínas*

As proteínas de adesão como o fibrinogênio (Fg), a fibronectina (Fn), a vitronectina (Vn), e a trombospondina-1 (TSP-1) participam na hemostasia, unem-se a receptores plaquetários durante a secreção e participam diretamente no crescimento do coágulo (Anitua et al., 2004). Proteínas como o Fg a Fn e Vn têm sido identificadas como substratos de transglutaminases (TGSub) que participam em várias fases do processo de cicatrização (Pan et al., 2010). A TSP-1 é uma glicoproteína produzida pelas células endoteliais, células musculares lisas, monócitos/macrófagos, e o epitélio pigmentar da retina. Atua como um ativador do TGF- $\beta$ , como um inibidor da angiogênese, e regula a adesão, a proliferação, migração e diferenciação de vários tipos de células (Uno et al., 2004). A osteonectina (ON) também conhecida como SPARC (proteína secretada, ácida e rica em cisteína), é uma glicoproteína secretada unida ao cálcio que pertence à família de proteínas de matriz celular. Elas não atuam como componentes estruturais da matriz extracelular, mas mediam as interações célula-matriz. É uma proteína multifuncional com alta afinidade para cátions como a hidroxiapatita, a qual proporciona apoio à matriz extracelular e media atividades de ampla gama de fatores de crescimento (Rotllant et al., 2008). A osteocalcina, também chamada proteína Gla óssea (BGP) é o componente mais abundante de proteínas não colagênicas do osso. Ela promove o recrutamento e a diferenciação dos precursores de osteoclastos na superfície do osso, o que sugere um papel na reabsorção e remodelação ósseas. Ela é sintetizada pelos

osteoblastos (Mo et al., 2004) e em células vasculares do músculo liso (Binkley e Suttie, 1995).

#### *Fator plaquetário 4 (PF4) e Beta-Tromboglobulina ( $\beta$ -TG)*

Estas representam as principais quimiosinas CXC armazenadas e secretadas em grandes quantidades pelas plaquetas ativadas (Brandt et al., 2000). A quimiosina CXC PF4 aparece na nova nomenclatura como CXCL-4/PF4 (Kowalska et al., 2010). A biossíntese de CXCL-4/PF4 e  $\beta$ -TG se limita quase exclusivamente aos megacariócitos dos quais se derivam as plaquetas circulantes maduras. O PF-4 também tem sido encontrado nos mastócitos e o  $\beta$ -TG nos monócitos, nos neutrófilos e nas células T, embora as plaquetas ativadas sejam a fonte mais abundante (Brandt et al., 2000). O CXCL4/PF-4 media processos diretos de quimiotaxia e ativação de neutrófilos e monócitos, estimulação de células natural killer (NK), migração, proliferação e ativação de células T, participa de vários estágios dos processos da hematopoiese e da angiogênese, tem um importante papel na cascata de reações proteolíticas que levam à coagulação, na qual exerce uma dupla função com propriedades pro e anticoagulantes, e participa no processo de agregação e adesão plaquetária. Porém, muitas destas ações têm sido observadas só em concentrações altas de CXCL4/PF-4, o que poderia ser indicativo de efeitos indiretos ou secundários (Vandercappellen et al., 2011). A  $\beta$ -TG tem atividade quimiotática para fibroblastos e participa do recrutamento e ativação dos neutrófilos, estimula a reparação tissular e a cicatrização de feridas (Resmi e Krishnan, 2002).

#### **1.2.3 Grânulos lisossomais**

As plaquetas contêm também grânulos lisossomais que podem secretar hidrolases

ácidas, catepsinas D e E, elastase e outras enzimas de degradação (Anitua, 2004).

#### **1.3 Funções das plaquetas na hemostasia e na cicatrização**

Funcionalmente, as plaquetas estão envolvidas com a hemostasia e com o início da cicatrização dos tecidos. Esta separação é arbitrária porque a hemostase poderia ser considerada o primeiro estágio da cicatrização (Beldon, 2010).

Depois da injúria no tecido, as plaquetas chegam aos vasos sanguíneos lesados onde entram em contato direto com o colágeno exposto dentro da matriz extracelular. Isto induz a liberação de citocinas, fatores de crescimento e numerosos mediadores pró-inflamatórios que conduzem a agregação das plaquetas e ativação das vias intrínseca e extrínseca da coagulação, que levam à formação de coágulos de fibrina (Verhamme e Hoylaerts, 2009). Os fatores de crescimento produzidos pelas plaquetas começam o processo de cicatrização. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) produz quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos, e estimulam a mitogênese de células musculares lisas e fibroblastos. O Fator de crescimento beta transformador (TGF- $\beta$ ) atrai os macrófagos para a região lesada e os estimula a produzir citocinas adicionais, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). Além disso, o TGF- $\beta$  favorece a quimiotaxia de fibroblastos e células de músculo liso e aumenta a expressão de colágeno e colagenase. A função do PDGF e do TGF- $\beta$  é estimular a resposta das células para produzir matriz como preparação para uma rápida deposição de um novo tecido conjuntivo para reconstruir a matriz extracelular (Beldon, 2010). Os grânulos- $\alpha$  concentram polipeptídios de grande tamanho que contribuem tanto na hemostasia primária

como secundária. Eles secretam fibrinogênio, vWF, fatores de coagulação V, XI e XIII, proteínas de adesão que mediam as interações plaqueta-plaqueta e plaqueta-endotélio (Blair e Flaumenhaft, 2009).

Os eventos celulares que ocorrem na cicatrização de uma ferida estão bem descritos do ponto de vista microscópico e podem ser reconhecidos pelas características macroscópicas, tradicionalmente divididas em três fases: inflamação, proliferação e remodelação. Estes eventos celulares são iniciados, mediados e mantidos por uma complexa série de acontecimentos bioquímicos que partem da liberação de citocinas e de fatores de crescimento pelas plaquetas (Hosgood, 2006). Depois de estimuladas, as plaquetas sofrem uma série de mudanças morfológicas e metabólicas que incluem basicamente os fenômenos de adesão e mudança de forma, seguidos de agregação e secreção. Os metabólitos ativos são liberados por difusão através da membrana, enquanto as plaquetas ativadas proporcionam uma superfície catalítica para a geração de trombina, assim como a liberação de micropartículas pró-coagulantes. Quando as plaquetas são estimuladas, liberam uma variedade de mediadores solúveis de três diferentes tipos de grânulos de armazenamento intracelular: grânulos- $\alpha$ , grânulos densos e grânulos lisossomais. Para liberar o seu conteúdo no espaço extracelular, a membrana de cada grânulo deve se fundir com a membrana plasmática, num processo que é impulsionado pelas interações do receptor SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) e entrada de cálcio induzida pela ativação das plaquetas (Marks, 2010).

#### **1.4 Concentrado autólogo de plaquetas**

O concentrado autólogo de plaquetas (CAP) é obtido do sangue autógeno através de um processo que utiliza o princípio da

separação celular por centrifugação diferencial, no qual se separam as distintas fases e se obtém aquelas de maior interesse, segundo o caso (Beca, 2007). Ele se apresenta como uma alternativa para o uso de plaquetas como unidades de depósito de fatores de crescimento, e é um produto do plasma autólogo rico em plaquetas. Depois da ativação, esta preparação facilita a liberação local de vários fatores de crescimento e de proteínas bioativas, que modulam os processos de cicatrização da ferida e a arquitetura dos tecidos (Anitua et al., 2008).

Whitman et al., (1997) introduziram a utilização dos concentrados autólogos de plaquetas em cirurgia maxilo facial como um substituto da cola de fibrina autóloga na elevação do seio maxilar. Depois começaram a surgir variados relatos de utilização de CAP em diferentes campos da medicina humana e da medicina veterinária, e assim, nas últimas décadas, a utilização de CAP tem crescido no campo das terapias regenerativas.

Na medicina veterinária, especificamente na medicina de equinos, têm sido relatados três métodos para concentrar plaquetas com propósitos terapêuticos: aférese (Sutter et al., 2004), métodos semi-automatizados (Schnabel et al., 2007) e método do tubo (Arguelles et al., 2006). Os dois primeiros requerem equipamentos especializados o que torna o procedimento oneroso.

No cão descrevem-se dois métodos para obtenção do CAP, o método do tubo (Choi et al., 2005; Ferraz et al., 2007) e o método semi-automatizado do dispositivo *SmartPREP 2 system* (Thoesen et al., 2006). Jensen et al. (2004) descreveram um método manual para concentrar plaquetas em cães no qual utilizavam tubos com EDTA. Estes pesquisadores obtiveram, mediante centrifugação única, um incremento de plaquetas e leucócitos no CAP em relação ao sangue total de 670%

(1.884.000 PLT/ $\mu$ L) e 720% (64.200 WBC/ $\mu$ L), respectivamente. Existem relatos que descrevem o uso do citrato de sódio como anticoagulante (Choi et al., 2005; Bonomi et al., 2007; Casati et al., 2007; Ferraz et al., 2007; You et al., 2007) para concentrar plaquetas de cães mediante duas centrifugações. O produto final oscilou entre 400.000 a 1.300.000 PLT/ $\mu$ L. Li et al. (2009), usaram ACD como anticoagulante e mediante dupla centrifugação concentraram uma média de 1.100.000 PLT/ $\mu$ L no CAP de cães.

Para o caso dos gatos, embora não tenham sido encontradas pesquisas sobre obtenção de CAP com finalidade terapêutica, existem relatos sobre métodos manuais para concentrar plaquetas para avaliar, *in vitro*, o efeito de substâncias agregantes e anti-agregantes. Nesses estudos empregou-se citrato de sódio 3,8% como anticoagulante, mediante diferentes protocolos de centrifugação que oscilaram entre 150 e 200 g e entre 10 e 20 minutos (Grossklaus et al., 1976; Burke et al., 1983a; Burke et al., 1983b; Hayes et al., 1989; Johnson et al., 1990; Murohara et al., 1996; Hayward, 1999).

As substâncias mais utilizadas para ativar as plaquetas para emprego de CAP com finalidade terapêutica, são os sais de cálcio, como o cloreto e o gluconato. O cálcio é um importante segundo mensageiro durante a cascata de ativação plaquetária. Ele media as respostas características de ativação das plaquetas como, mudança de forma, secreção granular, e agregação (Roberts et al., 2004). A ativação das plaquetas, pela maioria dos agentes estimuladores, provoca incremento da concentração de cálcio citosólico (Ca<sup>2+</sup>). As respostas plaquetárias que são diretamente dependentes do incremento de Ca<sup>2+</sup> incluem ativação da integrina, liberação da segunda onda de mediadores ADP e tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) e indução da atividade pro-coagulante das plaquetas (Bergmeier and Stefanini, 2009).

A batroxobina, uma enzima proteolítica obtida do veneno da serpente *Bothrops atrox*, que estimula a formação de fibrina a partir de fibrinogênio (Wang et al., 2001), induz a polimerização da fibrina mediante remoção unicamente do fibrinopeptídeo A da molécula de fibrina, não induz ativação das plaquetas diretamente, mas se mistura com sais de cálcio para produzir este efeito (Mazucco et al., 2008). A Trombina é o mais potente ativador das plaquetas, media a agregação, a liberação de ADP, tromboxano A<sub>2</sub>, serotonina e epinefrina, a ativação e mobilização da selectina P e CD40, a indução da atividade pro-coagulante das plaquetas. A trombina media também a geração de fibrina a partir de fibrinogênio (Jennings, 2009), induz polimerização da fibrina, mediante remoção dos fibrinopeptídeo A e B da molécula de fibrina. Esta proteína também produz ativação e massiva liberação de fatores de crescimento contidos nas plaquetas (Mazucco et al., 2008).

### 1.5 Possibilidades terapêuticas em diferentes áreas médicas

Os avanços científicos das biologia celular e molecular e a compreensão progressiva dos processos de cicatrização e regeneração dos tecidos têm estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de novos campos multidisciplinares, como a medicina regenerativa e engenharia tecidual. O crescente acúmulo de conhecimentos favorece a investigação clínica e a medicina translacional. A idéia de "soluções biológicas para os problemas biológicos e médicos" está emergindo como um novo paradigma na medicina, levando ao desenvolvimento de novas e otimizadas preparações biológicas que podem abrir novos caminhos para a cirurgia e tratamento de diversas doenças (Anitua et al., 2007).

A utilização de CAP tem sido descrita na reconstrução alvéolo maxilar e, segundo

Hwang e Choi (2010), a combinação de células-tronco mesenquimais com CAP aumenta a formação de osso novo, a mineralização, e as propriedades mecânicas, em modelo experimental de tração osteogênica mandibular em coelhos. Também, foi descrita a utilização de partículas de osso esponjoso e medular (MBPC) acrescida de CAP como uma forma segura de reconstrução mandibular imediata (Matsuo et al., 2011).

Em cirurgia plástica, utilizam-se injeções tópicas de CAP relatadas como eficaz no rejuvenescimento da pele foto envelhecida em ratos que foram submetidos à radiação ultravioleta (Cho et al., 2011). Na área da cirurgia oftalmológica, o CAP promoveu a cicatrização de úlceras de córnea crônicas, que foi acompanhada de redução da dor e da inflamação (Alio et al., 2007). No tratamento de úlceras crônicas de pele, Greppi et al., (2011) relatam um estudo que suporta a eficácia e a viabilidade da utilização de CAP alo gênico no tratamento de úlceras crônicas em pacientes humanos idosos e com hipo-mobilidade para os quais o processamento de sangue autólogo pode ser difícil. Kim et al. (2009), em relato de caso de grande lesão cutânea em cão, sugerem que o CAP poderia ser benéfico no tratamento de defeitos da pele de grandes dimensões ou no tratamento de retardo da cicatrização.

Na área da cirurgia gastrointestinal foi realizado, em modelo suíno, a aplicação de CAP em anastomose intestinal que não interferiu na força de ruptura à tração, mas verificou-se aumento de tecido de granulação e da fibrose anastomótica (Fresno et al., 2010). Em outro estudo foi pesquisado o efeito do CAP sobre a maturação dos tecidos e a cicatrização de feridas em modelo experimental de anastomose de cólon em ratos, e concluiu-se que pode ser utilizado neste caso, especialmente em pacientes com cicatrização deficiente, para obter maior

resistência da anastomose (Yol et al., 2008). Também, foi descrito um incremento na regeneração do nervo periférico após a anastomose com cianoacrilato em ratos (Elgazzar et al., 2008).

## **1.6 Possibilidades terapêuticas no sistema musculoesquelético**

O efeito do CAP na proliferação e na diferenciação osteogênica de células satélites de músculo esquelético (MSC) e sua capacidade de induzir a produção de alguns fatores osteogênicos relacionados tem sido descrito. Os resultados sugerem que os fatores de crescimento osteoindutores presentes no CAP estimulam a proliferação celular e diferenciação osteogênica de MSCs de ratos *in vitro* (Huang e Wang, 2010). A análise histológica da cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos diabéticos, mostrou que o CAP aumenta significativamente a cicatrização de defeitos ósseos, tanto qualitativa como quantitativamente (Mariano et al., 2010). O CAP combinado com enxerto autólogo de osso esponjoso resulta em regeneração óssea estatisticamente significativa quando comparado à aplicação isolada de enxerto autólogo esponjoso em defeito de tamanho crítico em ossos longos de porcos miniatura (Hakimi et al., 2010). Em relato preliminar em coelho, o uso de CAP com enxerto ósseo melhorou significativamente a qualidade da cicatrização óssea (Kanthan et al., 2011). Em modelo experimental de ovinos empregou-se medula óssea, células tronco mesenquimais (CTMO) e células tronco derivadas de tecido adiposo (ASC), para avaliar a influência do CAP sobre a capacidade osteogênica de ASC e concluiu-se que a capacidade osteogênica das ASC pode ser parcialmente compensada pela adição de CAP (Niemeyer et al., 2010). Pires Fraga et al. (2010), relatam que o CAP incrementa a viabilidade de adipócitos e vasos sanguíneos provenientes de enxertos de tecido adiposo em coelhos.

Estudos realizados em equinos no tratamento de lesões de tecidos moles do aparelho locomotor mostram que o emprego de CAP pode ser uma alternativa terapêutica promissora em desmopatias e tendinopatias (Carmona et al., 2009). Cavalos com lesões do tendão do músculo flexor digital superficial que foram tratados com injeções intralesionais de CAP mostraram alinhamento correto das fibras em comparação com o grupo placebo (Bosch et al., 2011). Num estudo piloto Mishra e Pavelco (2006) relatam que o uso do CAP em pacientes humanos com tendinose crônica no cotovelo reduz significativamente a dor e é um tratamento que deveria ser considerado antes da intervenção cirúrgica. Em modelos de transecção do tendão calcâneo comum em ovinos (Sarrafián et al., 2010) e em coelhos (Lyras et al., 2011), verificou-se que, aqueles tratados com CAP cicatrizaram mais rapidamente, sugerindo que poderia ser útil no tratamento cirúrgico de ruptura deste tendão (Lyras et al., 2011). Em estudo *in vitro* com tendão digital profundo de cão, avaliou-se o efeito do CAP e de células derivadas da medula óssea (BMSC), e verificou-se que o CAP aumentou significativamente o efeito do BMSC na interposição de gel de colágeno (Morizaki et al., 2010).

### **1.7 Possibilidades terapêuticas na osteoartrose**

A osteoartrose (OA) tem sido definida como uma desordem inerentemente não inflamatória das articulações móveis caracterizada pela deterioração da cartilagem articular e pela formação de osso novo nas superfícies e margens articulares. A fisiopatologia da OA tem sido amplamente estudada, mas ainda não é completamente compreendida. O processo da doença em si, envolve vários eventos que interagem para formar um círculo vicioso progressivamente mais grave (Renberg, 2005). É considerada uma

síndrome na qual atuam diferentes fatores bioquímicos e biomecânicos que produzem um desequilíbrio na homeostase entre peptídeos que estimulam a produção e a remodelação dos componentes da matriz extracelular (ECM) da cartilagem articular (Fox e Cook., 2001). A normalidade fisiológica da articulação depende da expressão adequada de vários fatores de crescimento (Malemud, 2007).

O diagnóstico da OA está baseado nos achados de exame físico, diagnóstico por imagem ou citológico. Os sinais da OA encontrados ao exame físico incluem dor à manipulação da articulação, inflamação, efusão articular e crepitação. Estes sinais são inespecíficos e deve ser considerado o diagnóstico diferencial com outras enfermidades articulares. Os sinais de OA em radiografias variam com a gravidade da doença, mais incluem efusão, osteofitose e esclerose subcondral (Renberg, 2005). Várias pesquisas têm utilizado o resultado de múltiplas mensurações para avaliar a progressão da deterioração das articulações. Uma mensuração objetiva é a determinação das forças transferidas através da articulação, pois a progressão da OA está relacionada com a limitação dinâmica durante o movimento. Portanto, a determinação das forças de reação do solo tem sido utilizada para avaliar a claudicação e, nos cães, está estabelecida como uma mensuração primária de avaliação. Além disso, a mensuração das forças verticais de reação do solo como o pico de força vertical e o impulso vertical tem sido frequentemente utilizada como mensuração primária para avaliação da função do membro (Budsberg, 2001).

A ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCCr) é a causa mais frequente de claudicação em cães. A ruptura total ou parcial deste ligamento causa instabilidade da articulação fêmoro-tíbio-patelar, levando a uma cascata de alterações inflamatórias e celulares, que resultam em sinovite, lesão

do menisco e OA que alteram a cinética da articulação (Cannap, 2007). Estudos feitos em cães com RLCCr tratados mediante técnicas cirúrgicas intra-capsulares têm relatado evidência radiológica de OA a partir da quarta semana (Heffron e Campbell, 1979; Elkins et al., 1991; Vasseur e Berry, 1992). Hurley et al. (2007) encontraram evidência radiográfica de OA da articulação fêmoro-tíbio-patelar oito semanas após a realização de cirurgia de nivelção do platô tibial (TPLO). Segundo a experiência clínica de Muzzi et al., (2009) com a técnica de reparação artroscópica encontra-se alterações compatíveis com OA nas articulações fêmoro-tíbio-patelares operadas às quatro semanas pós-operatórias.

O tratamento convencional da OA pode ser cirúrgico ou conservador. O tratamento cirúrgico geralmente envolve tratar as causas primárias e o objetivo é direcionado para reduzir a dor, estabilizar a articulação e diminuir a progressão da OA. Existem três componentes principais para o tratamento conservador da OA: controle de massa corporal, exercícios / fisioterapia e medicação (Renberg, 2005). O uso de medicamentos para o tratamento conservador está baseado no uso de anti-inflamatórios não esteroides inibidores seletivos da ciclooxigenase 2, medicamentos modificadores da OA (glucosamina e condroitina), e agentes intra-articulares (glucocorticóides, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos polissulfatados). O objetivo do tratamento conservador é controlar a inflamação aguda e danos imediatos à cartilagem, bem como minimizar a progressão da OA (Goodrich e Nixon, 2006).

A utilização de CAP como possibilidade terapêutica no tratamento de OA baseia-se na descrição da sua ação *in vitro*. O CAP estimula a proliferação celular e a síntese de matriz extracelular em culturas de condrócitos suínos (Akeda et al., 2006). Os

resultados de exames macroscópico, histológico e de tomografia computadorizada da cartilagem e do osso recém-formado em defeitos criados num modelo em coelho, mostram o efeito estimulante do CAP na cicatrização osteocondral (Sun et al., 2010). Segundo Hechtman et al. (2011) uma única injeção de CAP no local resultou no alívio da dor em pacientes humanos com epicondilite crônica da articulação úmero-radio-ulnar refratária a outros tratamentos conservadores. Sanchez et al. (2003) relataram sucesso em um caso de avulsão de cartilagem articular num atleta tratado cirurgicamente por artroscopia seguida da aplicação de CAP, onde se verificou recuperação precoce da cartilagem articular, com bons resultados funcionais e retomada da atividade atlética sem sinais clínicos. Carmona et al. (2007) relatam efeitos clínicos favoráveis ao utilizar injeções intra-articulares de CAP para o tratamento de osteoartrose em equinos.

## 1.8 Referências bibliográficas

AKEDA, K.; AN, H. S.; OKUMA, M.; ATTAWIA, M.; MIYAMOTO, K.; THONAR, E. J.; LENZ, M. E.; SAH, R. L.; MASUDA, K. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. v. 14, n. 12, p. 1272-1280, 2006.

ALIO, J. L.; ABAD, M.; ARTOLA, A.; RODRIGUEZ-PRATS, J. L.; PASTOR, S.; RUIZ-COLECHA, J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology*. v. 114, n. 7, p. 1286-1293, 2007.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. v. 91, n. 1, p.4-15, 2004.

- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; ORIVE, G.; ANDÍA, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. v. 28, n. 31, p. 4551–4560, 2007.
- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; ORIVE, G.; ANDÍA, I. Delivering growth factors for Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*. v. 29, n. 1, p. 37-41, 2008.
- AOKI, I.; FUJIMOTO, J.; TAMAYA, T. Effects of various steroids on platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA expression in uterine endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. v. 84, n. 2-3, p. 217–222, 2003.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTÍNEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci*. v. 81, n. 2, p. 237-245, 2006.
- BECA, T.; HERNÁNDEZ, G.; MORANTE, S.; BASCONES, A. Plasma rico en plaquetas una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol*. v. 19, n. 1, p. 39-52, 2007.
- BELDON, P. Basic Science of wound healing. *Surgery*. v. 28, n. 9, p. 409-412. 2010.
- BENNETT, J. S. Structure and function of the platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J Clin Invest*. v. 115, n. 12, p. 3363-3369, 2005.
- BERGMEIER, W.; STEFANINI, L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. v. 7, p. s187–s190, 2009.
- BINKLEY, N. C.; SUTTIE, J. W. Vitamin K Nutrition and Osteoporosis. *J Nutr*. v. 125, n. 7, p. 1812-1821, 1995.
- BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. v. 23, n. 4, p. 177–189, 2009.
- BONOMI, S.; AUADA, C. R.; DE ALMEIDA, F.; BRANCO, D. C.; BRAGA, K. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. *Ciência Rural*. v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007.
- BOSCH, G.; RENÉ Van WEEREN, P.; BARNEVELD, A.; Van SCHIE, H. T. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J*. v. 187, n. 1, p. 92-98, 2011.
- BOUDREAUX, M. K.; WEISS, R. C.; TOIVIO-KINNUCAN, M.; SPANO, J. S. Potentiation of platelet responses *in vitro* by feline infectious peritonitis virus. *Vet Path*. v. 27, n. 4, p. 261-268, 1990.
- BOUDREAUX, M. K.; EBBE, S. Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comp Haematol Int.*, v. 8, n. 1, p. 16 – 20, 1998.
- BOUDREAUX M. K. Characteristics, diagnosis, and treatment of inherited platelet disorders in mammals. *J Am Vet Assoc*. v. 233, n. 8, p. 1251-1259, 2008
- BOUDREAUX, M. K.; OSBORNE, C. D.; HERRE, A. C.; RIVERA, E. R.; SPANGLER, E. A. Unique structure of the Mloop region of  $\beta$ 1-tubulin may contribute to size variability of platelets in the family felidae. *Vet Clin Pathol.*, v. 39, n. 4, p. 417–423, 2010.

BRANDT, E.; LUDWIG, A.; PETERSEN, F.; FLAD, H. D. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol Rev.* v. 177, p. 204-216, 2000.

BUDSBERG, S. C. Long-term temporal evaluation of ground reaction forces during development of experimentally induced osteoarthritis in dogs. *Am J Vet Res.* v. 62, n. 8, p. 1207-1211, 2001.

BURKE, S. E.; DICOLA, G.; LEFER, A. M. Protection of ischemic cat myocardium by cgs-13080, a selective potent thromboxane A<sub>2</sub> synthesis inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol.* v. 5, n. 5, p. 842-847, 1983a.

BURKE, S. E.; LEFER, A. M.; NICOLAOU, K. C.; SMITH, G. M.; SMITH, J. B. Responsiveness of platelets and coronary arteries from different species to synthetic thromboxane and prostaglandin endoperoxide analogues. *Br J Pharmacol.* v. 78, n. 2, p. 287-292, 1983b.

CANAPP, S. O. The canine stifle. *Clin Tech Small Anim Pract.* v. 22, n.4, p. 195-205, 2007.

CARMONA, J. U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Sci.* v. 27, n. 4, p. 167-170, 2007.

CARMONA, J. U.; PRADES, M.; ARGÜELLES, D. Concentrados autólogos de plaquetas como tratamiento de lesiones de tejidos blandos del aparato locomotor en caballos. *Arch Med Vet.* v. 41, n. 1, p. 77-82, 2009.

CASATI, M. Z.; DE VASCONCELOS GURGEL, B. C.; GONÇALVES, P. F.; PIMENTEL, S. P.; DA ROCHA NOGUEIRA FILHO, G.; NOCITI, J. R. F. H.; SALLUM, E. A. Platelet-rich plasma

does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects – A pilot study in dogs. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* v. 36, n. 2, p. 132-136, 2007.

CHANDA, D.; LI, T.; SONG, K. H.; KIM, Y. H.; SIM, J.; LEE, C. H.; CHIANG, J. Y. L.; CHOI, H. S. Hepatocyte growth factor family negatively regulates hepatic gluconeogenesis via induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner in primary hepatocytes. *J Biol Chem.* v. 284, n. 42, p. 28510–28521, 2009.

CHESIK, D.; DE KEYSER, J.; WILCZAK, N. Insulin-like growth factor binding protein-2 as a regulator of IGF actions in CNS: Implications in multiple sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* v. 18, n. , p. 267–278, 2007.

CHO, J. M.; LEE, Y. H.; BAEK, R. M.; LEE, S. W. Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* v. 64, n. 2, p. e31-e39, 2011.

CHOI, B. H.; ZHU, S. J.; KIM, B. Y.; HUH, S. H.; LEE, S. H.; JUNG, J. H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an *in vitro* study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* v. 34, n. 4, p. 420-424, 2005.

ELGAZZAR, R. F.; MUTABAGANI, M.A.; ABDELAAL, S. E.; SADAKAH, A. A. Platelet rich plasma may enhance peripheral nerve regeneration after cyanoacrylate reanastomosis: a controlled blind study on rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* v. 37., n. 8, p. 748–755, 2008.

ELKINS A.D.; PECHMAN, R.; KEARNEY, M.T.; HERRON, M. A retrospective study evaluating the degree of degenerative joint disease in the stifle joint of dogs following surgical repair of anterior

- cruciate ligament rupture. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.27, p.533-540, 1991.
- ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. *Surgery*. v. 26, n. 2, p. 31-37, 2008.
- FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. v. 280, n 6, p. c1358-c1366, 2001.
- FERRAZ, V. C. M.; FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dog, obtained through three centrifugation speeds. *Braz J Vet Res Anim Sci*. v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.
- FOX, D. B.; COOK, J. L. Synovial Fluid Markers of osteoarthritis in dogs. *J Am Med Vet Assoc*, v. 219, n. 6, p. 756 – 761, 2001.
- FRESNO, L.; FONDEVILA, D.; BAMBO, O.; CHACALTANA, A.; GARCÍA, F.; ANDALUZ, A. Effects of platelet-rich plasma on intestinal wound healing in pigs. *Vet J*. v. 185, n. 3, p. 322–327, 2010.
- GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther*. v. 108, n. 2, p. 180–192, 2005.
- GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J*, v. 171, n. 1, p. 51-69, 2006.
- GOODSELL, D. A. The molecular perspective: epidermal growth factor. *Oncologist*. v. 8, n. 5, p. 496-497, 2003.
- GREPPI, N.; MAZZUCCO, L.; GALETTI, G.; BONA, F.; PETRILLO, E.; SMACCHIA, C.; RASPOLLINI, E.; COSSOVICH, P.; CAPRIOLI, R.; BORZINI, P.; REBULLA, P.; MARCONI, M. Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. *Biologicals*. v. 39, n. 2, p. 73-80, 2011.
- GROSSKLAUS, C. H. R.; DAMERAU, B.; LEMGO, E.; VOGT, W. Induction of platelet aggregation by the complement-derived peptides C3a and C5a. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. v. 295, n. 1, p. 71-76, 1976.
- HAKIMI, M.; JUNGBLUTH, P.; SAGER, M.; BETSCH, M.; HERTEN, M.; BECKER, J.; WINDOLF, J.; WILD, M. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury*. v. 41, n. 7, p. 717-723, 2010.
- HARRISON, P. Platelet function analysis. *Blood reviews*., v. 19, n. 2, p. 111-123, 2005.
- HARTWIG, J.; ITALIANO, J.. The birth of the platelet. *J Thromb Hemost.*, v. 1, n. 7, p. 1580-1586, 2003.
- HAYES, K. G.; PRONCZUK, A.; ADDESA, A. E.; STEPHAN, Z. F. Taurine modulates platelet aggregation in cats and humans. *Am J Clin Nutr*. v. 49, n. 6, p. 1211-1216, 1989.
- HAYWARD, R.; CAMPBELL, B.; SHIN, Y. K.; SCALIA, R.; LEFER, A M. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res*. v. 41, n. 1, p. 65–76, 1999.
- HECHTMAN, K. S.; URIBE, J. W.; BOTTO-VANDEMDEN, A.; KIEBZAK, G. M. Platelet-rich plasma injection reduces pain in patients with recalcitrant epicondylitis. *Orthopedics*. v. 34, n. 2, p. 92-99, 2011.
- HEFFRON, L.E.; CAMPBELL, J.R. Osteophyte formation in the canine stifle

- joint following treatment for rupture of the cranial cruciate ligament. *J. Small. Anim. Pract.*, v.20, p.603-611, 1979.
- HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M. S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A. T.; DE BRUIJN, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* v. 56, n. 4, p. 549-80, 2004.
- HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. *Vet Clin Small Anim.* v. 36, n. 4, p. 667-685, 2006.
- HUANG, S. S.; HUANG, J. S. TGF- $\beta$  control of cell proliferation. *J Cell Biochem.* v. 96, n. 3, p. 447-462, 2005.
- HUANG, S.; WANG, Z. Influence of platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells: an *in vitro* study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 110, n. 4, p. 453-462, 2010.
- HURLEY, C.R.; HAMMER, D.L.; SHOTT, S. Progression of radiographic evidence of osteoarthritis following tibial plateau leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate ligament rupture: 295 cases (2001-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.230, p.1674-1679, 2007.
- HWANG, Y. J.; CHOI, J. Y. Addition of mesenchymal stem cells to the scaffold of platelet-rich plasma is beneficial for the reduction of the consolidation period in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* v. 68, n. 5, p. 1112-1124, 2010.
- INTINI, G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials.* v. 30, n. 28, p. 4956-4966, 2009.
- ITALIANO, J. E.; BERGMEIER, W.; TIWARI, S.; FALET, H.; HARTWIG, J. H.; HOFFMEISTER, K. M.; ANDRÉ, P.; WAGNER, D. D. ; SHIVDASANI, R. A. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood.* v. 101, n. 12, p. 4789 - 4796, 2003.
- JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. Lea & Febiger, 1993, p. 105-132.
- JENNINGS, L. K. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* v. 102, n. 2, p. 248-57, 2009.
- JENSEN, T. B., RAHBEK, O.; OVERGAARD, S.; SØBALLE, K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation - An experimental study in dogs. *J Orthop Res.* v. 22, n. 3, p. 653-658, 2004.
- JOHNSON, G.; TSAO, P. S.; MULLOY, D.; LEFER, A. M. Cardioprotective effects of acidified sodium nitrite in myocardial ischemia with reperfusion. *J Pharm Exp Ther.* v. 252, n. 1, p. 35-41, 1990.
- KANTHAN, S. R.; KAVITHA, G.; ADDI, S.; CHOON, D. S.; KAMARUL, T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: A preliminary study involving rabbit models. *Injury.* v. 42, n. 8, p. 782-789, 2011.
- KIM, J. H.; PARK, C.; PARK, H. M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol.* v. 20, n. 2, p. 123-126, 2009.
- KLINGER, M. H. F. Platelets and inflammation. *Anat Embryol.* v. 196, n. 1, p. 1-11, 1997.

- KOWALSKA, M. A.; RAUOVA, L.; PONCZ, M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* v. 125, n. 4, p. 292–296, 2010.
- LACCI, K. M.; DARDIK, A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med.* v. 83, n. 1, p. 1–9, 2010.
- LANSDOWN, A. B. G. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Rep Reg.* v. 10, n. 5, p. 271-285, 2002.
- LEE, K. S.; WILSON, J. J.; RABAGO, D. P.; BAER, G. S. JACOBSON, J. A.; BORRERO, C. G. Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future?. *Am J Roentgenol.* v. 196, n. 3, p. 628-636, 2011.
- LI, N. Y.; YUAN, R. T.; CHEN, T.; CHEN, L. Q.; JIN, X. M. Effect of platelet-rich plasma and latissimus dorsi muscle flap on osteogenesis and vascularization of tissue-engineered bone in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* v. 67, n. 9, p. 1850-1858, 2009.
- LIEKENS, S.; BRONCKAERS, A.; PÉREZ-PÉREZ, M. J.; BALZARINI, J. Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* v. 74, n. 11, p. 1555– 1567, 2007.
- LYRAS, D.N.; KAZAKOS, K.; GEORGIADIS, G.; MAZIS, G.; MIDDLETON, R.; RICHARDS, S.; O'CONNOR, D.; AGROGIANNIS, G. Does a single application of PRP alter the expression of IGF-I in the early phase of tendon healing?. *J Foot Ankle Surg.* v. 50, n. 3, p. 256-282, 2011.
- MALEMUD, C. J. Growth hormone, VEGF AND FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta,* v. 375, n. 1-2, p. 10-19, 2007.
- MARIANO, R.; MESSORA, M.; DE MORAIS A., NAGATA, M.; FURLANETO, F.; AVELINO, C.; PAULA, F.; FERREIRA, S.; PINHEIRO, M.; DE SENE, J. P. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 109, n. 1, p. 72-78, 2010.
- MARKS, M. S. A Munc in the platelet granule works. *Blood.* v. 116, n. 6, p. 864-865, 2010.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Sur.* v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.
- MASSBERG. S.; KONRAD, I.; SCHÜRZINGER, K.; LORENZ, M.; SCHNEIDER, S.; ZOHLNHOEFER, D.; HOPPE, K.; SCHIEMANN, M.; KENNERKNECHT, E.; SAUER, S.; SCHULZ, C.; KERSTAN, S.; RUDELIUS, M.; SEIDL, S.; SORGE, F.; LANGER, H.; PELUSO, M.; GOYAL, P.; VESTWEBER, D.; EMAMBOKUS, N. R.; BUSCH, D. H., FRAMPTON, J.; GAWAZ, M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi *in vivo.* *J Exp Med.* v. 203, n. 5, p. 1221-1233, 2006.
- MATSUO, A.; CHIBA, H.; TOYODA, J.; ABUKAWA, H.; FUJIKAWA, K.; TSUZUKI, M.; WATANABE, M. Mandibular reconstruction using a tray with particulate cancellous bone and marrow and platelet-rich plasma by an intraoral approach. *J Oral Maxillofac Surg.* v. 69, n. 6, p. 1807-1814, 2011.
- MAZZUCCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E.; BORZINI, P. Platelet-rich

plasma and platelet gel preparation using Plateltext. *Vox Sang.* v. 94, n. 3, p. 202-208, 2008.

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* v. 34, n. 11, p. 1774-1778, 2006.

MO, X. Y.; CAO, C. K.; XU, F. H.; LIU, M. Y.; LI, M. X.; QIN, Y. J.; ZHOU, Q.; ZHANG, Y. Y.; DENG, H. W. Lack of association between the *HindIII* RFLP of the osteocalcin (BGP) gene and bone mineral density (BMD) in healthy pre- and postmenopausal Chinese women. *J Bone Miner Metab.* v. 22, n. 3, p. 264-269, 2004.

MORITZ, A.; WALCHECK, B. K.; WEISS, D. J. Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *Am J Vet Res.* v. 66, n. 2, p.325-329, 2005.

MORIZAKI, Y.; ZHAO, C.; AN K. N.; AMADIO, P. C. The effects of platelet-rich plasma on bone marrow stromal cell transplants for tendon healing *in vitro*. *J Hand Surg Am.* v. 35, n. 11, p. 1833-1841, 2010.

MUROHARA, T.; SCALIA, R.; LEFER, A. M. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors. *Circ Res.* v. 78, n. 5, p. 780-789, 1996.

MUZZI, L.A.L.; REZENDE, C.M.F.; MUZZI, R.A.L. Fisioterapia após substituição artroscópica do ligamento cruzado cranial em cães I - avaliação clínica, radiográfica e ultrassonográfica. *Arq Bras Med Vet Zootec.* v.61, p.805-814, 2009.

NIEMEYER, P.; FECHNER, K.; MILZ, S.; RICHTER, W.; SUEDEKAMP, N. P.; MEHLHORN, A. T.; PEARCE, S.; KASTEN, P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials.* v. 31, n. 13, p. 3572-3579, 2010.

O'BYRNE, K. J.; KOUKOURAKIS, M. I.; GIATROMANOLAKI, A.; COX, G.; TURLEY, H.; STEWARD, W. P.; GATTER, K.; HARRIS, A. L. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* v. 82, n. 8, p. 1427-1432, 2000.

PAN, C. P.; SHI, Y.; AMIN, K.; GREENBERG, C. S.; HAROON, Z.; FARIS, G. W. Wound healing monitoring using near infrared fluorescent fibrinogen. *Biom Opt Express.* v. 1, n. 1, p. 285-294, 2010.

PIETRAPIANA, D.; SALA, M.; PRAT, M.; SINIGAGLIA, F. Met identification on human platelets: Role of hepatocyte growth factor in the modulation of platelet activation. *FEBS Lett.* v. 579, n. 20, p. 4550-4554, 2005.

PIRES FRAGA, M.F.; NISHIO, R.T.; ISHIKAWA, R. S.; PERIN, L. F.; HELENE, A. JR.; MALHEIROS, C. A. Increased survival of free fat grafts with platelet-rich plasma in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* v. 63, n. 12, p. e818-e822, 2010.

RENBERG, W. C. Pathophysiology and management of arthritis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* v. 35, n. 5, p. 1073-1091, 2005.

RESMI, K. R.; KRISHNAN, L. K. Protease action and generation of h-

thromboglobulin-like protein followed by platelet activation. *Thromb Res.* v. 106, n. 4-5, p. 229–236, 2002

RIBATTI, D.; VACCA, A.; RUSNATI, M.; PRESTA, M. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine Growth Factor Rev.* v. 18, n. 3-4, p. 327–334, 2007.

ROBERTS, D. E.; McNICOL, A.; BOSE, R. Mechanism of collagen activation in human platelets. *J Biol Chem.* v. 279, n. 9, p. 19421–19430, 2004.

ROTLLANT, J.; LIU, D.; YAN, Y. L.; POSTLETHWAIT, J. H.; WESTERFIELD, M.; DU, S. J. Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear. *Matrix Biol.* v. 27, n. 6, p. 561–572, 2008.

SÁNCHEZ, M.; AZOFRA, J.; ANITUA, E.; ANDÍA, I.; PADILLA, S.; SANTISTEBAN, J.; MUJICA, I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc.* v. 35, n. 10, p. 1648-1652, 2003.

SARRAFIAN, T.L.; WANG, H.; HACKETT, E. S.; YAO, J. Q.; SHIH, M. S., RAMSAY, H. L., TURNER, A. S. Comparison of Achilles tendon repair techniques in a sheep model using a cross-linked acellular porcine dermal patch and platelet-rich plasma fibrin matrix for augmentation. *J Foot Ankle Surg.* v. 49, n. 2, p. 128-134, 2010.

SCHILLER, M.; JAVELAUD, D.; MAUVIEL, A. TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci.* v. 35, n. 2, p. 83-92, 2004.

SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; MILLER, B. J.; MCDERMOTT, W. G.; JACOBSON, M. S.; SANTANGELO, K. S.; FORTIER, L. A. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* v. 25, n. 2, p. 230-240, 2007.

SHEIKPRANBABU, S.; RAVINARAYANAN, H.; ELAYAPPAN, B.; JONGSUN, P.; GURUNATHAN, S. Pigment epithelium-derived factor inhibits vascular endothelial growth factor-and interleukin-1beta-induced vascular permeability and angiogenesis in retinal endothelial cells. *Vasc Pharmacol.* v. 52, n. 1-2, p. 84-89, 2010.

SUN, Y.; FENG, Y.; ZHANG, C. Q.; CHEN, S. B.; CHENG, X. G. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop.* v. 34, n. 4, p. 589-597, 2010.

SUTTER, W. W.; KANEPS, A. J.; BERTONE, A. L. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res.* v. 65, n. 7, p. 924-930, 2004.

THOESSEN, M. S.; VANDER BERG-FOELS, W. S.; STOKOL, T.; RASSNICK, K. M.; JACOBSON, M. S.; KEVI, S. B.; TODHUNTER, R. J. Used of a centrifugation-based, point-of-care device for production of canine autologous bone marrow and platelet concentrates. *Am J Vet Res.* v. 67, n. 10, p. 1655-1661, 2006.

TROJANOWSKA, M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology.* v. 47, n, 5s. p. v2-v4, 2008.

UNO, K.; HAYASHI, H.; KUROKI, M.; UCHIDA, H.; YAMAUCHI, Y.; KUROKI,

- M.; OSHIMA, K. Thrombospondin-1 accelerates wound healing of corneal epithelia. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 315, n. 4, p. 928–934, 2004
- VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* v. 22, n. 1, p. 1–18, 2011.
- VASSEUR, P.B.; BERRY, C. R. Progression of stifle osteoarthritis following reconstruction of the cranial cruciate ligament in 21 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* v.28, p.129–136, 1992.
- VEHVILÄINEN, P.; KOLI, K.; MYLLÄRNIEMI, M.; LINDHOLM, P.; SOINI, Y.; SALMENKIVI, K.; KINNULA, V. L.; KESKI-OJA, J. Latent TGF- $\beta$  binding proteins (LTBPs) 1 and 3 differentially regulate transforming growth factor- $\beta$  activity in malignant mesothelioma. *Hum Pathol.* v. 42, n. 2, p. 269-278, 2011.
- VERHAMME, P.; HOYLAERTS, M. F. Hemostasis and inflammation: two of a kind?. *Thromb J.* v. 7, n. 15, p. 1-3, 2009.
- WANG, D. S.; HANAMOTO, M.; FANG, F.; OHBA, M.; ISHII, M.; KIMURA, F.; HIGAKI, E.; SENGA, H. Defibrinogenating effect of batroxobin (Defibrase) in rats and inhibition of migration of human vascular smooth muscle cells by the plasma of batroxobin-treated rats *in vitro*. *Atherosclerosis*, v. 156, n. 1, p. 73-80, 2001.
- WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg.* v. 55, n. 11, p. 1294-1299, 1997
- WILKERSON, M. J.; SHUMAN, W.; SWIST, S.; HARKIN, K.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol.*, v. 30, n. 3, p. 141- 149, 2001.
- YE, Y. J.; Fung, Chan,G. C. F.; Qiao, L.; Lian, Q.; Meng, F. Y.; Luo, X. Q.; Khachigian, L. M.; Ma, M.; Deng, R.; Chen, J. L.; Chong, B. H.; Yang, M. Platelet-derived growth factor enhances platelet recovery in a murine model of radiation-induced thrombocytopenia and reduces apoptosis in megakaryocytes via its receptors and the PI3-k/Akt pathway. *Haematologica.* v. 95, n. 10, p. 1745-1753, 2010.
- YOL, S.; TEKIN, A.; YILMAZ, H.; KÜÇÜKKARTALLAR, T.; ESEN, H.; CAGLAYAN, O.; TATKAN, Y. Effects of platelet rich plasma on colonic anastomosis. *J Surg Res.* v. 146, n. 2, p. 190-194, 2008.
- YOU, T. M.; CHOI, B.H.; LI, J.; JUNG, J. H.; LEE, H. J.; LEE, S. H.; JEONG, S. M. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated With Bio-oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 103, n. 4, p. e8-e12, 2007.
- YUE, J.; MULDER, K. M. Transforming growth factor- $\beta$  signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther.* v. 91, n. 1, p. 1-34, 2001.
- ZACHOS, T. A.; BERTONE, A. L. Growth factors and their potential therapeutic applications for healing of musculoskeletal and other connective tissues. *Am J Vet Res.* v. 66, n. 4, p. 727-738, 2005.

ZIMMERMAN, G. A.; WEYRICH, A. S.  
Signal-dependent protein synthesis by  
activated platelets new pathways to altered

phenotype and function. *Arterioscler  
Thromb Vasc Biol.* v. 28, n. 3, p. s17–s24,  
2008.

## CAPITULO II

### 2. MÉTODO DO TUBO PARA OBTENÇÃO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS EM CÃO E GATO, E CARACTERÍSTICAS CELULARES

#### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar um método manual para obtenção de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) no cão e no gato para propósitos clínicos. Para a avaliação do método, utilizaram-se 12 cães e 12 gatos. Para avaliar a reprodutibilidade da metodologia e das características celulares dos CAP utilizaram-se 16 animais de cada espécie. Nestes cães e gatos o CAP foi dividido em frações A e B. Os CAP foram obtidos a partir de 14 mL de sangue venoso colhidos em dois tubos com solução ACD-A que foram centrifugados a 191 g e 85 g durante 6 minutos, em cães e gatos, respectivamente. Foram feitas contagens celulares no sangue total e no CAP. Verificou-se em todas as amostras diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre a quantidade de plaquetas, leucócitos, granulócitos, monócitos, mas não entre os valores de linfócitos, no sangue total e no CAP. A eficiência de concentração de plaquetas foi 22,20% a 46,34% nos cães e 24,75% a 35,39% nos gatos. Os resultados indicam que este método utilizando única centrifugação permite concentrar um número maior de plaquetas em relação ao sangue total que oscila entre 49,40% e 224,38% em cães e entre 73,28% e 147,70 em gatos.

#### Abstract

The objective of this study was to evaluate a manual method for obtaining autologous platelet concentrate (APC) in dog and cat for clinical purposes. For standardization, we used 12 dogs and 12 cats. To evaluate the reproducibility of the methodology and cellular characteristics of the APC were used 16 animals of each species. These last dogs and cats, APC was divided into fractions A and B. The APC were obtained from 14 ml of venous blood collected in two tubes with ACD-A solution, which were centrifuged at 191 g and 85 g for 6 minutes in dogs and cats, respectively. Cell counts were performed in whole blood and APC. It was found in all samples, statistically significant differences ( $P < 0.01$ ) between the number of platelets, leukocytes, granulocytes, monocytes, but not between the values of lymphocytes in whole blood and APC. Platelet efficiency concentration was 22.20 to 46.34% in dogs and 24.75 to 35.39% in cats. Results indicate that this method of one centrifugation allows concentrating high platelets number in relation of whole blood ranging from 49.40% to 224.38% in dogs and 73.28% to 147.70% in cats.

#### 2.1 Introdução

Em condições fisiológicas, as plaquetas após ativação liberam quantidades substanciais de fatores de crescimento, razão pela qual os concentrados autólogos de plaquetas (CAP) são considerados fonte de diversos fatores de crescimento. Dentre estes destacam-se o fator de crescimento

beta transformador 1 ( $TGF-\beta_1$ ), fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e outras moléculas que modulam a inflamação e a reparação tissular (Everts et al., 2006; Nurden, 2011). Os CAP têm sido amplamente usados em medicina humana em procedimentos como reconstrução alvéolo-maxilar (Thor et al., 2007), e seu

uso continua se expandindo para as cirurgias plástica e ortopédica, para a medicina esportiva (tratamento de lesões de tendão em atletas), tratamento de úlceras gástricas, cutâneas crônicas e corneanas (Anitua et al., 2007). Em medicina veterinária, relatou-se a utilização clínica de CAP em equinos para tratar afecções locomotoras crônicas (Carmona et al., 2009) e feridas das extremidades (Monteiro et al., 2009), entre outras. Mesmo com o uso crescente de CAP em medicina equina (Carmona e Prades 2009), existem escassos relatos sobre seu uso clínico em cães e gatos. Porém, o cão tem sido amplamente usado como modelo experimental para avaliar o efeito desta substância como coadjuvante (único ou combinado com biomateriais) na regeneração óssea maxilar (Moreno et al., 2004, Bonomi et al., 2007, Dutra et al., 2008) ou apendicular (You et al., 2007) e em testes de osteointegração (Casati et al., 2007). Todavia, os resultados experimentais obtidos nestes estudos têm sido insatisfatórios, devido à grande variabilidade metodológica e à falta de uma padronização experimental do anticoagulante e dos parâmetros de centrifugação que permitam concentrar um adequado número de plaquetas nesta espécie. Até o momento foram descritos dois métodos para obter CAP a partir de sangue total em cão, o método do tubo (manual) (Jensen et al., 2004, Choi et al., 2005) e o método semi-automatizado SmartPReP 2 system (Thoesen et al., 2006). Entretanto, verificam-se dificuldades nas metodologias descritas com o método do tubo e, por outro lado, o dispositivo semi-automatizado (Thoesen et al., 2006) é de custo proibitivo na maioria das circunstâncias, levando assim a pesquisa por métodos alternativos.

Assim como os cães, também os gatos são susceptíveis às afecções crônicas do sistema locomotor, bem como tegumentar (Chandler e Beale 2002), cujo tratamento poderia ser associado ao CAP com

resultados promissores. O CAP pode também ser usado como tratamento coadjuvante em cirurgia ortopédica (Intini 2009) nesta espécie. Na literatura consultada entretanto, não foram encontrados relatos sobre protocolos de obtenção de CAP em gatos, para fins terapêuticos, e apesar da existência de vários relatos de protocolos para obtenção de CAP no cão pelo método do tubo, estes se demonstram inconsistentes uma vez que não foi possível a reprodutibilidade. O objetivo do presente trabalho foi padronizar um método manual com única centrifugação para concentrar plaquetas de cão e de gato de maneira reprodutível.

## **2.2 Material e métodos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo número 125/2009.

### **2.2.1 Animais**

O estudo foi realizado em duas etapas: uma etapa para padronização do método e outra para testar a reprodutibilidade do mesmo. Para a etapa de padronização, utilizaram-se doze cães da raça Fila Brasileiro, seis machos na faixa etária entre 24 e 108 meses e seis fêmeas entre 18 e 60 meses, com massa corporal média de 52,5 kg, clinicamente sadios no momento da colheita do sangue e sorologicamente negativos para leishmaniose e erlichiose. Para o estudo com os felinos, utilizaram-se 12 gatos sem raça definida, seis machos e seis fêmeas com faixa etária entre 12 e 36 meses e massa corporal média de 3,8 kg, clinicamente sadios no momento da colheita do sangue e sorologicamente negativos para imunodeficiência viral felina (FIV) e leucemia viral felina. Todos os animais provinham da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (altitude 852 metros sobre o nível do mar). Os cães Fila Brasileiro pertenciam a criadores da

região, e os gatos eram animais de experimentação da Escola de Veterinária da UFMG.

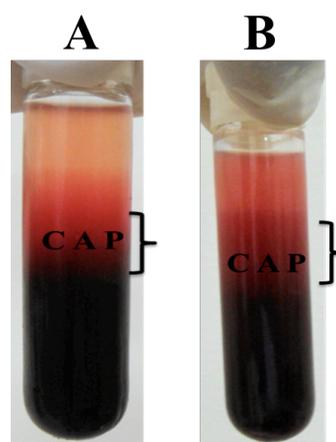
Para avaliar a reprodutibilidade da metodologia e das características celulares dos CAP utilizaram-se 16 cães machos de experimentação da Escola de Veterinária da UFMG, sem raça definida na faixa etária de 16 a 24 meses, massa corporal média de 15 kg, também provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais e, 16 gatos sem raça definida, oito machos e oito fêmeas na faixa etária entre 36 e 96 meses, com massa corporal média de 3,4 kg, que pertenciam a proprietários da cidade de Manizales, Caldas, Colômbia (altitude 2160 metros sobre o nível do mar).

### 2.2.2 Obtenção do concentrado autólogo de plaquetas e determinação das características celulares.

Para obtenção do CAP na etapa de padronização, realizou-se a colheita de 14 mL de sangue mediante punção das veias safena nos cães e jugular nos gatos, com escalpe 21 G<sup>1</sup>. O sangue de cada animal foi colhido em dois tubos de 8,5 mL contendo 1,5 mL de solução ACD, o qual continha citrato de trisódio (22 g/L), ácido cítrico (8 g/L) e dextrose (24,5 g/L) (ACD-A)<sup>2</sup>. Uma amostra adicional de sangue foi colhida num terceiro tubo de 4,5 mL contendo sal tri potássio do ácido etilenodiamino tetraacético (k<sub>3</sub>EDTA)<sup>1</sup> para a realização do hemograma (tabela 1). As amostras foram refrigeradas a 4°C até o momento do processamento. O sangue dos cães e dos gatos colhidos no tubo com ACD-A foi centrifugado a 191 g e 85 g, respectivamente, durante 6 minutos a 4 °C numa centrífuga refrigerada de alta velocidade<sup>3</sup>. Posteriormente, com auxílio de uma micropipeta de volume fixo coletou-se,

os primeiros 100 µL da fração vermelha e os primeiros 900 µL de plasma, abaixo e acima da interface sangue-plasma, respectivamente (Figura 1). O sangue total e os CAP obtidos foram analisados mediante hemograma automatizado por impedância volumétrica<sup>4</sup>. Cada amostra foi analisada três vezes, e tomou-se a média como medida amostral para as análises estatísticas. Os parâmetros hematológicos avaliados incluíram hematócrito (PCV), contagem de plaquetas (PLT), leucócitos (WBC), valores relativos e absolutos de linfócitos (LYM), monócitos (MON), granulócitos (GRA), volume plaquetário médio (MPV) e índice de distribuição das plaquetas (PDW).

Figura 1. Tubos com concentrado de plaquetas (CAP) de cão (A) e de gato (B), obtido mediante uma única centrifugação, a 191g e 85g respectivamente, durante 6 minutos.



Avaliou-se a reprodutibilidade da metodologia em outro grupo de animais (n=16) de cada espécie, utilizando apenas o anticoagulante ACD-A para sangue total e para o CAP. Para avaliar a possibilidade de utilização de uma quantidade maior de CAP, foi colhido o plasma que foi dividido em duas frações iguais A e B. A fração A

<sup>1</sup> Shandong Weigao Group, China

<sup>2</sup> BD, New Jersey, USA

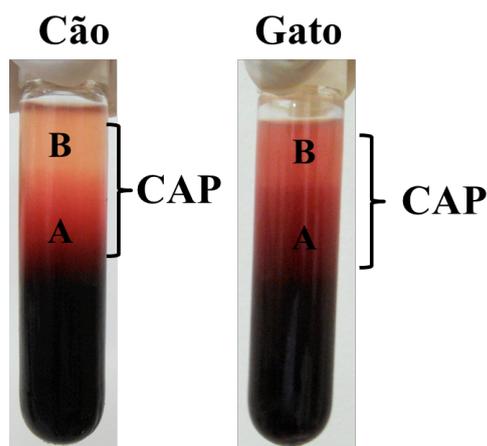
<sup>3</sup> SIGMA 3K30, Alemanha

<sup>4</sup> Abacus Junior Vet, Austria

correspondeu aos primeiros 50% de plasma adjacente da interface sangue-plasma e a fração B correspondeu aos 50% do plasma restante no tubo (Figura 2). O sangue foi centrifugado sem refrigeração<sup>5</sup>. O sangue total e os CAP obtidos foram analisados mediante técnica automatizada por impedância volumétrica<sup>6</sup>. Cada amostra foi analisada três vezes, e tomou-se a média como medida amostral para as análises estatísticas. Os parâmetros hematológicos avaliados foram os mesmos do primeiro grupo de animais

Todos os gatos utilizados no estudo foram contidos mediante aplicação intramuscular de xilazina<sup>7</sup>, 0,5 mg/kg e butorfanol<sup>8</sup>, 0,1 mg/kg.

Figura 2. Tubos com concentrado de plaquetas (CAP) de cão e de gato, apresentando as frações A e B. Obtido mediante uma única centrifugação, a 191g e 85g respectivamente, durante 6 minutos.



### 2.2.3 Análise estatística

<sup>5</sup> Hettich Rotofix 32A, United Kingdom.

<sup>6</sup> MEK-6400 Nihon Kohden, Japan.

<sup>7</sup> Rompum (Xilazina 2%), Bayer Animal Health, Monheim, Germany.

<sup>8</sup> Torbugesic 1%, Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA.

As variáveis do estudo foram testadas com respeito à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Todos os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média. Os valores de sangue total e do CAP foram comparados mediante o teste de Student (t) para amostras pareadas, os fatores sexo e idade foram analisados mediante análise de variância (ANOVA), bem como os valores de sangue total e das frações A e B do CAP e como prova post-hoc se utilizou o teste Student Newman-Keuls (SNK). Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa de  $P \leq 0,05$ . Foi feito o coeficiente de correlação de Pearson ( $\rho$ ) para determinar o grau de associação entre os parâmetros avaliados no CAP e sangue total. Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa de  $P \leq 0,01$  para t, e  $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,05$  para  $\rho$ . A eficiência de concentração de plaquetas foi determinada mediante a fórmula de Weibrich et al. (2003): (volume de CAP x contagem de plaquetas no CAP / volume de sangue total x contagem de plaquetas no sangue total) x 100.

### 2.3 Resultados e discussão

Não houve diferença entre as contagens celulares da análise hematológica para as variáveis sexo e idade dos animais tanto em cães como em gatos, nas duas etapas do estudo.

Os resultados das contagens celulares da primeira etapa nos cães, estão expressos na tabela 1. As contagens celulares do sangue total e dos CAP, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ) em relação aos valores de PLT, WBC, valores relativos e absolutos de GRA, absolutos de MON, relativos de PCV e LYM, mas não entre os valores absolutos de LYM e relativos de MON (tabela 1). Encontrou-se correlação negativa ( $\rho = -0,702$   $P = 0,011$ ) entre o número de linfócitos e de plaquetas presentes nos CAP. A eficiência na

concentração de plaquetas foi de 22,20%. A concentração de plaquetas foi 49,40%

superior nos CAP em relação às amostras de sangue total.

Tabela 1. Contagens hematológicas /  $\mu\text{L}$  em sangue total e nos concentrados autólogos de plaquetas de cães da raça Fila Brasileiro (média, erro padrão da média)

Variável	Sangue total	Concentrado Autólogo de Plaquetas
PLT (fragmentos $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	345,3 (44,93) a	515,9 (60,74) b
PCV %	44,2 (1,96) a	3,97 (1,14) b
WBC (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	16,6 (2,08) a	6,9 (0,48) b
LYM (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	5,05 (1,45) a	3,07 (0,27) a
LYM%	26,6 (4,01) a	46,6 (5,76) b
MON (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	0,79 (0,22) a	0,275 (0,04) b
MON%	4,2 (0,58) a	3,9 (0,50) a
GRA (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	10,7 (0,93) a	3,6 (0,54) b
GRA%	69,3 (4,19) a	49,2 (5,53) b
MPV (fL)	9,7 (0,30) a	9,6 (0,35) a
PDW %	39,63 (0,64) a	38,65 (0,80) a

PLT, plaquetas; PCV, hematócrito; WBC, leucócitos; LYM, linfócitos; MON, monócitos; GRA, granulócitos; MPV, volume plaquetário médio; PDW, índice de distribuição de plaquetas. Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste t ( $P < 0,01$ )

Na segunda etapa do estudo em cães ( $n=16$ ), encontrou-se diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre os valores de PLT, WBC e GRA em sangue total, fração A e fração B do CAP, havendo maior concentração de PLT e WBC na fração A do CAP e de GRA no sangue total seguida da fração A do CAP. Os valores de LYM apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre fração A do CAP, sangue total e fração B do CAP, mas não entre estas duas últimas ocorrendo maior concentração destas células na fração A do

CAP (tabela 2). Não se encontrou nenhum tipo de correlação entre os parâmetros avaliados no CAP e sangue total. A eficiência na concentração de plaquetas foi de 46,34 % na fração A e 28,16% na fração B dos CAP, obtendo então uma eficiência conjunta das duas frações de 74,50%. A concentração de plaquetas foi 224,38 % e 97,13 % superior nas frações A e B, respectivamente, dos concentrados de plaquetas em relação às amostras de sangue total.

Tabela 2. Contagens hematológicas /  $\mu\text{L}$  no sangue total e nas frações A e B dos concentrados autólogos de plaquetas de cães (média, erro padrão da média)

Variável	Sangue total	Concentrado Autólogo de Plaquetas – fração A.	Concentrado Autólogo de Plaquetas – fração B.
PLT (fragmentos $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	330,75 (18,28) a	1072,90 (84,01) b	652,00 (56,47) c
PCV %	45,50 (1,05) a	5,81 (1,01) b	1,58 (0,84) c
WBC (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	10,94 (0,77) a	17,86 (2,56) b	4,46 (1,27) c
LYM (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	2,27 (0,25) a	11,38 (1,63) b	3,44 (1,26) a
LYM%	20,97 (2,08) a	65,76 (3,41) b	67,18 (6,82) b
MON (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	0,49 (0,07) a	0,61 (0,21) a	0,23 (0,10) a
MON%	4,49 (0,55) a	3,08 (0,79) a	3,6 (0,930) a
GRA (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	8,20 (0,68) a	5,85 (1,11) b	0,77 (0,22) c
GRA%	74,54 (2,01) a	31,14 (3,60) b	16,71 (2,38) c
MPV (fL)	8,36 (0,18) a	8,80 (0,17) b	8,31 (0,13) a
PDW%	35,53 (0,47) a	36,79 (0,37) b	35,45 (0,45) a

PLT, plaquetas; PCV, hematócrito; WBC, leucócitos; LYM, linfócitos; MON, monócitos; GRA, granulócitos; MPV, volume plaquetário médio; PDW, índice de distribuição de plaquetas. Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P < 0,01$ ),  $n=16$ .

Verificou-se neste estudo nos cães, menor concentração de plaquetas do que a citada por Jensen et al. (2004), mas por outro lado a concentração de leucócitos foi 58% inferior à descrita por estes autores. O EDTA por sua vez, pode provocar lesões estruturais, bioquímicas e funcionais nas plaquetas (White e Escolar, 2000) e ser irritante para os tecidos tratados, o que já o contraindica como anticoagulante para obter CAP com fins terapêuticos articulares. Nas pesquisas de Choi et al. (2005), Bonomi et al. (2007), Ferraz et al. (2007) e You et al. (2007), as plaquetas foram contadas manualmente e não foram relatadas outras informações hematológicas das características do CAP. O método do tubo realizado neste estudo com uma única centrifugação permite concentrar plaquetas, na faixa descrita pelos autores acima citados, após duas centrifugações, mas está abaixo do encontrado por Li et al. (2009), cujo método permitiu concentrar aproximadamente duas vezes mais do que o usado neste estudo. Existe controvérsia sobre o número ideal de plaquetas no CAP para uso clínico. Weibrich et al. (2004), relatam que em coelhos a alta concentração de plaquetas promove melhor

osteointegração, contrário ao relato de Choi et al. (2005), que citam que a alta concentração de plaquetas diminui a viabilidade e proliferação de células ósseas alveolares. Em termos clínicos, têm-se relatado resultados favoráveis em seres humanos (Marx, 2004) e cavalos (Carmona et al., 2007), utilizando CAP com um número de plaquetas entre 300-400  $\times 10^3 / \mu\text{L}$ , indicando que o número de plaquetas concentradas pelo método utilizado no presente estudo é suficiente para produzir efeito biológico. A correlação negativa encontrada entre PLT e LYM no CAP sugere que à medida que aumenta a quantidade de LYM a concentração de plaquetas no CAP diminui exponencialmente, mostrando que o método padronizado nesse estudo concentra plaquetas associadas a valores de LYM similares aos encontrados no sangue total. Os valores de MPV e PDW não apresentaram diferenças entre sangue total e CAP no grupo de cães utilizado na primeira etapa, e foi significativamente maior ( $P < 0,01$ ) na fração A do CAP no grupo de cães na segunda etapa do estudo. Estes valores continuam dentro da faixa descrita para a espécie 8,4-11,5 fL e 54,4-60 %,

respectivamente (Moritz et al., 2005). O MPV representa o tamanho médio da plaqueta e o PDW é um indicador da variação no tamanho das plaquetas e estes valores aumentam durante a ativação plaquetária em aparelhos automatizados de hematologia (Vagdatli et al., 2010), o que sugere que a metodologia utilizada neste estudo para obter CAP em cães não produz ativação das plaquetas. Este conceito é particularmente importante se considerar que o principal objetivo num método para concentrar plaquetas é obter plaquetas vivas e inativas (Marx, 204).

Na primeira etapa do estudo em gatos (n=12), as contagens celulares do sangue

total e dos CAP, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre os valores de PLT, WBC, PCV, MPV, valores relativos e absolutos de GRA, MON e relativos de LYM, mas não nos valores absolutos de LYM (tabela 3). Encontrou-se correlação positiva ( $\rho = 0,734$   $P = 0,007$ ) entre o número de plaquetas presentes nos CAP (PLT-CAP) e o número de plaquetas no sangue total. A eficiência na concentração de plaquetas foi de 35,39%. A concentração de plaquetas foi 147,70% superior nos concentrados de plaquetas em relação às amostras de sangue total.

Tabela 3. Contagens hematológicas /  $\mu\text{L}$  no sangue total e nos concentrados autólogos de plaquetas de gatos (média, erro padrão da média)

Variável	Sangue total	Concentrado Autólogo de Plaquetas
PLT (fragmentos $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	412,33 (49,59) a	1021,50 (111,55) b
PCV %	33,86 (1,39) a	2,11 (0,36) b
WBC (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	10,18 (0,84) a	6,59 (0,78) b
LYM (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	2,95 (0,37) a	3,71 (0,57) a
LYM%	29,73 (3,22) a	55,80 (4,53) b
MON (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	0,63 (0,07) a	0,26 (0,03) b
MON%	6,15 (0,44) a	4,35 (0,52) b
GRA (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	6,62 (0,67) a	2,64 (0,41) b
GRA%	64,13 (3,08) a	39,98 (4,19) b
MPV (fL)	7,6 (0,37) a	10,5 (0,41) b
PDW %	34,09 (1,15) a	42,58 (0,93) b

PLT, plaquetas; PCV, hematócrito; WBC, leucócitos; LYM, linfócitos; MON, monócitos; GRA, granulócitos, MPV, volume plaquetário médio; PDW, índice de distribuição de plaquetas. Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste t ( $P < 0,01$ ), n=12.

Na segunda etapa do estudo em gatos (n=16), as contagens celulares do sangue total e das frações A e B dos CAP, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre os valores de PLT, PCV e MPV no sangue total e as frações de CAP, mas não entre elas. Houveram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre os valores absolutos de WBC e relativos de LYM, GRA e MON de sangue total, fração A e

fração B dos CAP. Encontrou-se diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre os valores absolutos de MON e GRA quando comparados sangue total e as frações de CAP, mas não entre elas. Não se verificou diferença entre o valor absoluto de LYM de sangue total e fração A, mas sim entre elas e a fração B do CAP (tabela 4). Não se encontrou nenhum tipo de correlação entre os parâmetros avaliados no CAP e sangue total. A eficiência na concentração de

plaquetas foi de 26,16% na fração A e 24,75% na fração B dos CAP, obtendo então uma eficiência conjunta das duas frações de 50,91%. A concentração de

plaquetas foi 83,10% e 73,28% superior nas frações A e B, respectivamente, dos concentrados de plaquetas em relação às amostras de sangue total.

Tabela 4. Contagens hematológicas /  $\mu\text{L}$  no sangue total e nas frações A e B dos concentrados autólogos de plaquetas de gatos (média, erro padrão da média)

Variável	Sangue total	Concentrado Autólogo de Plaquetas – fração A.	Concentrado Autólogo de Plaquetas – fração B.
PLT (fragmentos $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	349,35 (28,64) a	639,62 (44,30) b	605,34 (41,72) b
PCV %	33,73 (0,99) a	2,23 (0,30) b	1,32 (0,17) b
WBC (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	7,91 (0,75) a	5,19 (0,65) b	2,24 (0,35) c
LYM (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	3,22 (0,26) a	3,44 (0,34) a	1,84 (0,31) b
LYM%	42,80 (3,50) a	71,19 (4,31) b	79,25 (2,93) c
MON (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	1,09 (0,02) a	0,35 (0,01) b	0,00 (0,00) b
MON%	1,28 (0,23) a	0,39 (0,17) b	0,00 (0,00) c
GRA (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	4,58 (0,53) a	1,72 (0,30) b	0,40 (0,07) b
GRA%	56,00 (3,28) a	28,49 (3,83) b	20,13 (2,97) c
MPV (fL)	8,96 (0,38) a	11,58 (0,46) b	11,57 (0,44) b
PDW %	15,51 (0,38) a	16,66 (0,34) b	16,88 (0,28) b

PLT, plaquetas; PCV, hematócrito; WBC, leucócitos; LYM, linfócitos; MON, monócitos; GRA, granulócitos; MPV, volume plaquetário médio; PDW, índice de distribuição de plaquetas. Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P < 0,01$ ),  $n = 16$ .

No campo da hematologia felina o emprego de plaquetas com finalidade terapêutica na medicina regenerativa ainda não foi considerado, sendo este portanto, um estudo inédito. O método padronizado no presente trabalho permite obter CAP no gato colhendo pouco volume de sangue. Esta situação é importante na prática terapêutica de medicina regenerativa em gatos, onde o volume de sangue necessário para aplicação clínica poderia ser um fator limitante. A literatura (Grossklaus et al., 1976; Burke et al., 1983a; Burke et al. 1983b; Hayes et al., 1989; Johnson et al., 1990; Murohara et al., 1996; Hayward, 1999) não relata dados sobre o número de plaquetas concentradas nem tampouco as características hematológicas dos concentrados autólogos de plaquetas, obtidos utilizando citrato de sódio como anticoagulante. As características celulares do CAP de gato foram muito similares as do CAP de cão no presente estudo, portanto são pertinentes as mesmas considerações já feitas para a

espécie canina com relação à eficiência de concentração de plaquetas e número de leucócitos presentes no CAP. Mas, a presença de diferença significativa entre o número de linfócitos em cada fração de CAP, pode sugerir diferentes aplicações clínicas para cada fração, devido ao fato dos linfócitos serem uma das maiores fontes de fator estimulador de colônia de granulócitos, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos, IL-1 e TNF que tem funções relacionadas com a cicatrização de feridas como: estimular a produção de neutrófilos, incrementar as funções de neutrófilos e monócitos, promover a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, mediar a proliferação de células epidérmicas, a quimiotaxia dos neutrófilos e outras ainda não claramente definidas. Estas ações teriam maior importância durante a fase inflamatória da cicatrização (Enoch e Leaper, 2008). Tudo isto é só uma hipótese que requer estudos adicionais para ser comprovada.

Muito embora, os resultados das duas etapas nos gatos, mostram que o valor de MPV e PDW é menor ( $P < 0,01$ ) no sangue total do que no CAP, os valores de MPV e PDW continuaram dentro da faixa considerada normal para a espécie (Boudreaux e Ebbe 1998, Moritz et al., 2004). O PDW é um indicador da variação no tamanho das plaquetas e o MPV representa o tamanho médio da plaqueta, cujos valores frequentemente se incrementam durante a ativação plaquetária em aparelhos automatizados de hematologia (Vagdatli et al., 2010). Isto indica que a metodologia utilizada neste estudo produz baixo grau de ativação das plaquetas em gato. Se considerar o exposto por Marx (2004) de que o mais importante num método para concentrar plaquetas é obtê-las inativas, pode-se concluir que o método usado no presente estudo é aplicável na prática médica das espécies canina e felina.

As diferenças encontradas entre os dois grupos de animais utilizados nas duas etapas do estudo com relação à eficiência de concentração de plaquetas podem, em termos gerais, estar relacionadas com características ambientais, zootécnicas, genotípicas, fisiológicas e individuais. Os cães utilizados na segunda etapa e os gatos da primeira etapa, eram animais de experimentação em pesquisa cirúrgica, estavam confinados, submetidos a procedimentos cirúrgicos com frequentes colheitas de sangue, e estresse permanente, o que pode explicar os maiores valores encontrados nas contagens sanguíneas (incluindo as plaquetas). Também é importante considerar que os gatos utilizados na segunda etapa do estudo vivem a mais de 2000 metros acima do nível do mar, e segundo Lehmann et al. (2006), a exposição a grandes altitudes ativa as plaquetas o que leva a agregação plaquetária, consumo de plaquetas e diminuição da contagem, portanto o menor número de plaquetas tanto no sangue total

quanto no CAP encontrado pode ser decorrente da posição geográfica onde habitam.

Em ambas as espécies, a metodologia avaliada permitiu concentrar plaquetas e diminuir significativamente os MON e GRA e o percentual dos LYM. Ou seja, a população celular concentrada é diferente daquela sanguínea basal. Pode ser que esta modificação tenha alguma influência no efeito clínico dos CAP devido à ação reguladora dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos sobre a cicatrização (Park et al., 2004). O uso de ACD-A no presente estudo é inédito e representa um avanço científico na metodologia para obtenção de CAP com fins terapêuticos em cães e gatos, pois segundo Lei et al. (2009), a qualidade do CAP está estreitamente relacionada com o anticoagulante empregado e a utilização de ACD-A produz CAP de qualidade superior em relação àqueles obtidos com citrato de sódio ou heparina. A eficiência de concentração de plaquetas encontrada no presente estudo em cão e gato, é um achado característico de métodos manuais para concentrar plaquetas, descritos em seres humanos (Weibrich et al., 2005) e equinos (Argüelles et al., 2006). E como já discutido acima, ainda é motivo de controvérsia o número ideal de plaquetas no CAP para se obter efeito biológico. As características celulares obtidas nas frações A e B no segundo grupo de cães mostram que a fração A do CAP é a ideal para utilização clínica em termos de concentração de plaquetas, mas a fração B apresenta também concentração relativamente alta de plaquetas. Já nos gatos onde se encontrou diferença significativa apenas entre a contagem total de linfócitos, pode inferir diferentes aplicações clínicas para cada fração.

## 2.4 Referências bibliográficas

ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; ORIVE, G.; ANDÍA, I. The potential impact of the

preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. v. 28, n. 31, p. 4551–4560, 2007.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTÍNEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci*. v. 81, n. 2, p. 237-245, 2006.

BONOMI, S.; AUADA, C. R.; DE ALMEIDA, F.; BRANCO, D. C.; BRAGA, K. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. *Ciência Rural*. v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007.

BOUDREAUX, M. K.; EBBE, S. Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comp Haematol Int.*, v. 8, n. 1, p. 16 – 20, 1998.

BURKE, S. E.; DICOLA, G.; LEFER, A. M. Protection of ischemic cat myocardium by cgs-13080, a selective potent thromboxane A<sub>2</sub> synthesis inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol*. v. 5, n. 5, p. 842-847, 1983a.

BURKE, S. E.; LEFER, A. M.; NICOLAOU, K. C.; SMITH, G. M.; SMITH, J. B. Responsiveness of platelets and coronary arteries from different species to synthetic thromboxane and prostaglandin endoperoxide analogues. *Br J Pharmacol*. v. 78, n. 2, p. 287-292, 1983b.

CARMONA, J. U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Sci*. v. 27, n. 4, p. 167-170, 2007.

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. 2009. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos.

*Arch Med Vet*. v. 41, n. 2, p. 175-179, 2009.

CARMONA, J. U.; PRADES, M. Platelet concentrates to treat musculoskeletal disease in horses. VDM Verlag Dr. Müller Aktiengesellschaft & Co. KG, Saarbrücken, Germany, 2009.

CASATI, M. Z.; DE VASCONCELOS GURGEL, B. C.; GONÇALVES, P. F.; PIMENTEL, S. P.; DA ROCHA NOGUEIRA FILHO, G.; NOCITI, J. R. F. H.; SALLUM, E. A. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects – A pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac. Surg*. v. 36, n. 2, p. 132-136, 2007.

CHANDLER, J. C.; BEALE, B. S. Feline orthopedics. *Clin Tech Small Anim Pract*. v. 17, n. 4, p. 190-203, 2002.

CHOI, B. H.; ZHU, S. J.; KIM, B. Y.; HUH, S. H.; LEE, S. H.; JUNG, J. H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an *in vitro* study. *Int J Oral Maxillofac. Surg*. v. 34, n. 4, p. 420-424, 2005.

DUTRA, C. E. A.; PEREIRA, M. M.; SERAKIDES, R.; REZENDE, M. C. F. *In vivo* evaluation of bioactive glass foams associated with platelet-rich plasma in bone defects. *J Tissue Eng Regen Med*. v. 2, n. 4, p. 221-227, 2008.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. *Surgery*. v. 26, n. 2, p. 31-37, 2008.

EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G.; SCHONBERGER, J. P.

- A. M.; HOFFMANN, J. J. H. L.; OVERDEVEST, E. P.; BOX, H. A. M.; VAN ZUNDERT, A. Platelet rich plasma and platelet gel, A review. *J Extra Corpor Techn.*, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006
- FERRAZ, V. C. M.; FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dog, obtained through three centrifugation speeds. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.
- GROSSKLAUS, C. H. R.; DAMERAU, B.; LEMGO, E.; VOGT, W. Induction of platelet aggregation by the complement-derived peptides C3a and C5a. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* v. 295, n. 1, p. 71-76, 1976.
- HAYES, K. G.; PRONCZUK, A.; ADDESA, A. E.; STEPHAN, Z. F. Taurine modulates platelet aggregation in cats and humans. *Am J Clin Nutr.* v. 49, n. 6, p. 1211-1216, 1989.
- HAYWARD, R.; CAMPBELL, B.; SHIN, Y. K.; SCALIA, R.; LEFER, A. M. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res.* v. 41, n. 1, p. 65-76, 1999.
- INTINI, G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials.* v. 30, n. 28, p. 4956-4966, 2009.
- JENSEN, T. B., RAHBEK, O.; OVERGAARD, S.; SØBALLE, K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation - An experimental study in dogs. *J Orthop Res.* v. 22, n. 3, p. 653-658, 2004.
- JOHNSON, G.; TSAO, P. S.; MULLOY, D.; LEFER, A. M. Cardioprotective effects of acidified sodium nitrite in myocardial ischemia with reperfusion. *J Pharm Exp Ther.* v. 252, n. 1, p. 35-41, 1990.
- LEI, H.; GUI, L.; XIAO, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem.* v. 42, n. 13-14., p. 1452-1460, 2009.
- LI, N. Y.; YUAN, R. T.; CHEN, T.; CHEN, L. Q.; JIN, X. M. Effect of platelet-rich plasma and latissimus dorsi muscle flap on osteogenesis and vascularization of tissue-engineered bone in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* v. 67, n. 9, p. 1850-1858, 2009.
- LEHMANN, T.; MAIRBÄURL, H.; PLEISCH, B.; MAGGIORINI, M.; BÄRTSCH, P.; REINHART, W. H. Platelet count and function at high altitude and in high-altitude pulmonary edema. *J Appl Physiol.* v. 100, n. 2, p. 690-694, 2006
- MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Sur.* v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.
- MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O. M.; THEORET, C. L. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res.* v. 70, n. 2, p. 277-282, 2009.
- MORENO, L.; MARÍN, J.; ENRÍQUEZ, F.; GONZÁLEZ, G.; MORENO, L.; CISNEROS, L.; SANCHA, L. M. Utilización de plasma rico en plaquetas para regeneración periodontal en un perro. *Rev Odont Mex.* v. 8, n. 3, p. 64-69, 2004.
- MORITZ, A.; FICKENSCHER, Y.; MEYER, K.; FAILING, K.; WEISS, D. J. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol.* v. 33, n. 1, p. 32-38, 2004.

- MORITZ, A.; WALCHECK, B. K.; WEISS, D. J. Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *Am J Vet Res.* v. 66, n. 2, p.325-329, 2005.
- MUROHARA, T.; SCALIA, R.; LEFER, A. M. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors. *Circ Res.* v. 78, n. 5, p. 780-789, 1996.
- NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* v. 105, S 13-33, 2011.
- PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* v. 187, n. 5A, p. 11S–16S, 2004.
- THOESSEN, M. S.; VANDER BERG-FOELS, W. S.; STOKOL, T.; RASSNICK, K. M.; JACOBSON, M. S.; KEVI, S. B.; TODHUNTER, R. J. Used of a centrifugation-based, point-of-care device for production of canine autologous bone marrow and platelet concentrates. *Am J Vet Res.* v. 67, n. 10, p. 1655-1661, 2006.
- THOR, A.; FRANKE-STENPORT, V.; JOHANSSON, C. B.; RASMUSSEN, L. Early bone formation in humans bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *Int J Oral Maxillofac Surg.* v. 36, n. 12, p. 1164-1171, 2007.
- VAGDATLI, E.; GOUNARI, E.; LAZARIDOU, E.; KATSIBOURLIA, E.; TSIKOPOULOU, F.; LABRIANOU, I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia.* v. 14, n. 1, p. 28-32, 2010.
- WEIBRICH, G.; WILFRIED, K. G. K.; RAINER, B.; HITZLER, W. E.; HAFNER, G. The Harvest Smart PRPTM system versus the Friudent-Schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Impl Res.* v. 14, n. 2, p. 233–239, 2003.
- WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W.; BUCH, R.; HITZLER, W.E. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* v. 34, n. 4, p. 665– 671, 2004.
- WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K.; HITZLER, W. E.; HAFNER, G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in growth factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* v. 20, n. 1, p.118–123, 2005.
- WHITE, G.; ESCOLAR, G. EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. *Platelets.* v. 11, n. 1, p. 56-61, 2000.
- YOU, T. M.; CHOI, B.H.; LI, J.; JUNG, J. H.; LEE, H. J.; LEE, S. H.; JEONG, S. M. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated With Bio-oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 103, n. 4, p. e8-e12, 2007.

## CAPITULO III

### 3. DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO E CARACTERÍSTICAS ULTRA-ESTRUTURAIS DO COÁGULO OBTIDO A PARTIR DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS EM CÃES E GATOS.

#### Resumo

Os objetivos foram: medir as concentrações do fator de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ) em cães e fator de crescimento derivado das plaquetas tipo AB (PDGF-AB) em cães e gatos no plasma e nos concentrados autólogos de plaquetas (CAP) ativados com gluconato ou cloreto de cálcio, medir as concentrações do TGF- $\beta_1$  em cães no plasma e nos CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, medir as concentrações do TGF- $\beta_1$  e fator de crescimento derivado das plaquetas tipo BB (PDGF-BB) em gatos no plasma e nos CAP ativados com gluconato de cálcio ou trombina bovina, avaliar por microscopia eletrônica de transmissão as características ultra-estruturais de coágulos sanguíneos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, em cães e gatos. Para determinar a concentração de TGF- $\beta_1$  e PDGF-AB após ativação com gluconato ou cloreto de cálcio, utilizou-se doze cães Fila Brasileiro. Para o estudo com os felinos, utilizou-se 12 gatos sem raça definida. O plasma foi obtido de sangue colhido em frascos com EDTA e o CAP de sangue colhido em frasco com solução ACD-A. Para determinar a concentração de TGF- $\beta_1$  após ativação com gluconato de cálcio ou batroxobina, utilizou-se 16 cães. O sangue foi colhido em frascos com solução ACD-A para obtenção de plasma e CAP, o CAP foi dividido em frações A e B. Para medir a concentração de TGF- $\beta_1$  e PDGF-BB, utilizou-se sangue de 16 gatos. Foram utilizados para colheita do sangue frascos com solução ACD-A para obtenção de plasma e CAP, o CAP foi dividido em frações A e B. Determinou-se as correlações entre a quantidade de células e as concentrações dos fatores de crescimento. Para o estudo em microscopia eletrônica, empregou-se sangue colhido de quatro cães e quatro gatos. Em cães, a concentração de TGF- $\beta_1$  foi estatisticamente ( $P < 0,01$ ) mais alta na fração A do CAP. No gato, não se verificou diferença significativa ( $P > 0,01$ ) na concentração de TGF- $\beta_1$  e de PDGF-BB entre as frações A e B do CAP. Verificou-se, nos cães, diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ) em relação à área de espaço intracelular e área de fibras de fibrina nos coágulos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina. Em gatos os coágulos obtidos a partir de CAP apresentaram diferença estatística ( $P < 0,01$ ), em relação à área das plaquetas, área de fibras de fibrina, relação eixo menor–eixo maior, relação eixo maior–eixo menor, quando ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina. conclui-se que o gluconato de cálcio é a substância indicada para ativação de CAP no cão e no gato, a fração A no cão deve ser aquela empregada para fins terapêuticos, enquanto no gato ambas frações podem ser usadas.

#### Abstract

The objectives of this study were: 1) Measure the concentrations of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) and platelet-derived growth factor type AB (PDGF-AB) in dogs and cats, in plasma and autologous platelet concentrates (APC) activated with calcium gluconate or calcium chloride, 2) Measure the concentrations of TGF- $\beta_1$  in dogs, in plasma and APC activated with calcium gluconate or batroxobin, 3) Measuring the concentrations of TGF- $\beta_1$  and platelet derived growth factor type BB (PDGF-BB) in cats, in plasma and APC activated with calcium gluconate or bovine thrombin, 4) Evaluate by transmission electron microscopy ultrastructural characteristics of blood clots of APC activated with calcium gluconate or batroxobin, in dogs

and cats. To determine the concentration of TGF- $\beta_1$  and PDGF-AB after activation with gluconate or calcium chloride was used twelve Fila Brasileiro dogs. For the study in cats, we used 12 mongrel cats. To obtain the plasma blood was collected with EDTA and APC was obtained from blood collected with ACD-A solution. To determine the concentration of TGF- $\beta_1$  after activation with calcium gluconate or batroxobin, we used 16 healthy male mongrel dogs. For blood collection was used vials with ACD-A solution to obtain the plasma and APC, APC was divided into fractions A and B. To measure the concentration of TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB, we used the blood of 16 healthy mongrel cats. For blood collection was used vials with ACD-A solution to obtain the plasma and APC, APC was divided into fractions A and B. In all animals, were determined correlations between the results of the amount of cells and concentrations of growth factors. For the study in electron microscopy, we used blood of four dogs and four cats. In dogs the concentration of TGF- $\beta_1$  was statically significantly high ( $P < 0.01$ ) in fraction A of APC. In cats there was no significant difference ( $P > 0.01$ ) in TGF- $\beta_1$  and PDGF-BB concentrations between the fractions A and B of APC. In dogs was found statistically significant difference ( $P < 0.01$ ) when compared intracellular space area and fiber area, in clots of APC that were activated with calcium gluconate or batroxobin. In cats clots obtained from APC activated with batroxobin show statistical difference ( $P < 0.01$ ) in area of platelets, area of fibrin fibers, ratio minor-major axes, ratio major-minor axes. From the results it is concluded that the calcium gluconate is the substance suitable for activation of PAC in dogs and cats, and that PC-A fraction must be used for therapeutic purposes in dogs, while in cats both fractions (A and B) can be used.

### 3.1 Introdução

O processo de cicatrização celular é dependente de um grande número de mecanismos celulares e moleculares. Neste processo participam células que são sensíveis à ação de grande quantidade de moléculas como citocinas, fatores de crescimento, eicosanoides dentre outros, que permitem, em condições fisiológicas, a cicatrização ou regeneração de tecidos lesados (Enoch e Leaper, 2008; Beldon, 2010).

As plaquetas (PLTs) exercem um papel central no processo de cicatrização. Estes fragmentos citoplasmáticos não só possuem propriedades hemostáticas (Hartwig e Italiano, 2003), como também propriedades pró-inflamatórias, reguladoras, (Mannaioni et al., 1997), e regenerativas, as quais são mediadas por interação com outras células (neutrófilos, e células endoteliais) e por liberação de GFs, quimiosinas e outras moléculas reguladoras (Anitua et al., 2004).

O uso de concentrados autólogos de plaquetas (CAP) para estimular o processo de cicatrização tem sido frequentemente relatado. As plaquetas dos mamíferos contém grânulos citoplasmáticos (Mannaioni et al., 1997; Pelagalli et al., 2002), dentre eles os grânulos alfa que contém várias moléculas (citocinas, quimiosinas, fatores de crescimento, entre outros) importantes para as funções plaquetárias, como: na formação e crescimento do trombo, modulação da inflamação e síntese de matriz extracelular (ECM) durante o processo de cicatrização (Enoch e Leaper, 2008, Beldon 2010). Os grânulos alfa armazenam principalmente sete fatores de crescimento diretamente implicados no processo de cicatrização incluindo: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta_1$ ), TGF- $\beta_2$ , fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-I) e fator de crescimento hepático (HGF) (Anitua et al., 2005; Weibrich et al., 2005). Os objetivos deste

estudo foram medir as concentrações dos fatores de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ) e fator de crescimento derivado das plaquetas tipo AB (PDGF-AB) em cães e gatos no plasma e nos concentrados autólogos de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou cloreto de cálcio e gluconato de cálcio; medir a concentração de TGF-  $\beta_1$  no plasma e nos CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina em cães; medir as concentrações de TGF-  $\beta_1$  e PDGF tipo BB no plasma e nos CAP ativados com gluconato de cálcio ou trombina bovina em gatos; determinar as correlações entre a quantidade de células e as concentrações de fatores de crescimento, assim como descrever as características ultra-estruturais dos coágulos obtidos a partir de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, em cães e gatos.

### **3.2 Material e métodos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo número 125/2009.

#### **3.2.1 Animais**

O estudo foi realizado em duas etapas: uma etapa de padronização do método e outra para testar a reprodutibilidade do mesmo. Para a etapa de padronização (grupo 1), utilizaram-se doze cães da raça Fila Brasileiro, seis machos na faixa etária entre 24 e 108 meses e seis fêmeas entre 18 e 60 meses, com massa corporal entre 42 e 63 kg, clinicamente sadios no momento da colheita do sangue e sorologicamente negativos para leishmaniose e erlichiose. Para o estudo com os felinos, utilizaram-se 12 gatos sem raça definida, seis machos e seis fêmeas com faixa etária entre 12 e 36 meses, com massa corporal média de 3,8 kg, clinicamente sadios no momento da colheita do sangue e sorologicamente negativos para imunodeficiência viral felina e leucemia viral felina. Todos os animais

eram provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (altitude 852 metros sobre o nível do mar). Os cães Fila Brasileiro pertenciam a criadores da região, e os gatos eram animais de experimentação da Escola de Veterinária da UFMG.

Para avaliar a reprodutibilidade da metodologia e das características celulares dos CAP (grupo 2) utilizaram-se 16 cães experimentais (UFMG) machos sem raça definida na faixa etária de 16 a 24 meses, massa corporal média de 15 kg, também provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais e 16 gatos sem raça definida, oito machos e oito fêmeas na faixa etária entre 36 e 96 meses, com massa corporal média de 3,4 kg, provenientes da cidade de Manizales, Caldas, Colômbia (altitude 2160 metros acima do nível do mar), pertencentes a proprietários da região.

Para avaliação ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão amostras de CAP, foram utilizados quatro cães machos sadios, com massa corporal entre 15 e 18 kg, e idade entre 14 e 16 meses e quatro gatos machos sadios, com massa corporal entre 3 e 3,5 kg, e idade entre 24 e 60 meses.

#### **3.2.2 Determinação da concentração dos fatores de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ), derivado das plaquetas tipo AB (PDGF-AB) e tipo BB (PDGF-BB)**

Antes da colheita do plasma e do CAP (com solução ACD-A) de cada animal, foi desprezado o primeiro mL do fundo de cada tubo, em ambos os grupos. No primeiro grupo, foi colhido 1 mL de CAP de cada animal que foi dividido em alíquotas de 500  $\mu$ L ativadas com adição de 50  $\mu$ L de

gluconato de cálcio 10%<sup>9</sup> ou cloreto de cálcio 10%<sup>10</sup>. Amostras adicionais para se obter plasma foram colhidas com anticoagulante EDTA. No segundo grupo de cães (n=16) as amostras de CAP foram divididas em frações A e B que foram subdivididas em alíquotas de 500 µL ativadas com adição de 50 µL de gluconato de cálcio 10%<sup>9</sup> ou batroxobina<sup>11</sup> (reconstituída com 1 mL de gluconato de cálcio 10%). O mesmo procedimento foi adotado com as amostras de CAP felina que foram ativadas com gluconato de cálcio 10%<sup>9</sup> ou trombina bovina<sup>12</sup>. Amostras adicionais de plasma canino e felino foram obtidas a partir de sangue colhido com ACD-A.

As amostras dos cães dos dois grupos e dos gatos do primeiro grupo foram ativadas à temperatura ambiente (22-26 °C) e deixadas em repouso por duas horas para estimular a degranulação das plaquetas (Argüelles et al., 2006). Uma vez formado o coágulo de fibrina em cada amostra de CAP, estes foram liberados das paredes dos tubos e centrifugados a 1500g por 10 minutos, como também o sangue de cada animal colhido em frascos com EDTA ou ACD-A. O plasma e o sobrenadante dos CAP foram obtidos, alíquotados e congelados a -80°C para posterior determinação da concentração do TGF-β<sub>1</sub>, PDGF-AB e PDGF-BB. A concentração dos fatores de crescimento do plasma e do CAP de cada animal foi determinada pelo teste ELISA sanduíche desenvolvido com anticorpos comerciais específicos para cão TGF-β<sub>1</sub><sup>13</sup>,

TGF-β<sub>1</sub><sup>14</sup>, PDGF-AB<sup>15</sup> e PDGF-BB<sup>16</sup> específicos para humano.

O teste ELISA foi feito em duplicata para cada amostra, de acordo com as indicações do fabricante e a leitura foi feita a 450 nm para TGF-β<sub>1</sub> e PDGF-BB e 540 nm para o PDGF-AB num leitor automático<sup>17</sup>. No grupo dois de cães e gatos (n=16) calculou-se os níveis de TGF-β<sub>1</sub> e PDGF-BB em relação à proteína total (ng/mg). A concentração de proteína total foi mensurada pelo método do biureto<sup>18</sup> num analisador semiautomático de química sanguínea<sup>19</sup>. No segundo grupo de gatos (n=16) determinou-se a concentração de TGF-β<sub>1</sub> e PDGF-BB nas frações A e B dos CAP às 3 e 12 horas após ativados, incubados a 37 °C, visando descrever a dinâmica de liberação destes fatores de crescimento.

### 3.2.3 Descrição das características ultra-estruturais dos coágulos obtidos a partir de concentrados autólogos de plaquetas

A metodologia para se obter os CAP foi como previamente relatada. Foram colhidas quatro amostras que foram divididas em duas alíquotas formando assim dois grupos. Um grupo cujas plaquetas foram ativadas com gluconato de cálcio 10%<sup>5</sup> e o outro com batroxobina<sup>11</sup> reconstituída com 1 mL de gluconato de cálcio 10%<sup>5</sup>. Pipetou-se 500 µL de CAP e 50 µL de cada substância ativadora. Duas horas depois de ativadas, retirou-se o sobrenadante de cada amostra e seguiu-se o protocolo desenvolvido pelo

<sup>9</sup> Ropsohn Therapeutics Ltda, Colômbia

<sup>10</sup> Cromoline, Brasil.

<sup>11</sup> Plateltext, Praha, Czech Republic

<sup>12</sup> BioPharm Laboratories LLC, Bluffdale, Utah, USA

<sup>13</sup> Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-β<sub>1</sub> MB100B, R&D Systems, United States of America

<sup>14</sup> Human TGF-β<sub>1</sub> R&D Systems, United States of America

<sup>15</sup> Human PDGF-AB DHD00B, R&D Systems, United States of America

<sup>16</sup> Human PDGF-BB R&D Systems, United States of America

<sup>17</sup> Biochrom Anthos 2010, United Kingdom

<sup>18</sup> Biosystems, Barcelona, Espanha.

<sup>19</sup> RT-1904CV, Shenzhen, China

centro de microscopia da UFMG. Os coágulos foram submetidos a fixação primária com solução de “Karnovsky modificada” (glutaraldeído<sup>20</sup> 2,5% + paraformaldeído<sup>11</sup> 2%, misturadas em partes iguais). Realizou-se a pós-fixação com ósmio que consistiu em: descarte do fixador, lavagem com solução tampão (fosfato) 0,1 M, seguida de transferência para uma solução de tetróxido de ósmio<sup>11</sup> 2% tamponada, mantidos em refrigeração (4°C) por 1 hora, e lavados três vezes com solução tampão. Posteriormente, os coágulos foram desidratados em passagens sucessivas de 10 minutos em álcool 50%, 15 minutos em álcool 70% (2 vezes), 15 minutos em álcool 85% (2 vezes), 15 minutos em álcool 95% (2 vezes), 15 minutos em álcool 100% (3 vezes) e por último 15 minutos em acetona (2 vezes). O processo de inclusão em resina Epon 812 consistiu de inclusão em resina-acetona (1:2) por 1 hora, resina-acetona (1:1) por 1 hora, resina-acetona (2:1) durante 12 horas a temperatura ambiente, resina pura por 1 hora, seguida de inclusão nos moldes e manutenção em estufa a 40 °C por 1 hora e 60 °C por 48 horas. Uma vez polimerizadas as amostras, procedeu-se a microtomia de cortes semifinos (300nm aproximadamente) e cortes ultrafinos (60 nm aproximadamente). Finalmente realizou-se contração com acetato de uranila e citrato de chumbo. As placas foram visualizadas num Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-Spirit - FEI – 2006 de 120 kV<sup>21</sup>. Todos os procedimentos foram feitos no centro de microscopia eletrônica da Universidade Federal de Minas Gerais.

De cada amostra foi avaliada uma placa ao microscópio eletrônico de transmissão. Realizou-se a descrição microscópica com observação de 25 microfotografias por placa, totalizando 100 microfotografias por

substância de ativação, em cada espécie (200 no cão e 200 no gato). As alterações morfológicas das plaquetas (Wurzinger, 1990), foram classificadas e atribuídos os seguintes escores: 0- não ativada- ligeiramente oval, com organelas uniformemente dispersas no citoplasma; I- incerta- perfil arredondado, organelas não centralizadas; II - ativada- forma oval irregular com centralização de organelas e emissão de pseudópodes; III - com alteração irreversível- discóide com organelas na periferia; IV - com lise total- perda da arquitetura normal. De acordo com esta classificação, determinou-se nos cães a área e porcentagem de área do espaço intercelular, área e porcentagem de área das fibras de fibrina. Nos gatos, determinou-se a área e a porcentagem de área das plaquetas, área e porcentagem de área das fibras de fibrina e relações entre eixo menor - eixo maior e eixo maior – eixo menor das plaquetas. As análises foram feitas com aumento de 18000 X, e as medições foram realizadas com o software de análise digital Image J<sup>22</sup>. Nos gatos foram contados o número de grânulos- $\alpha$  dentro de cada plaqueta.

### 3.2.4 Análise estatística

Determinou-se para a totalidade dos dados a apresentação de distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados das concentrações de TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB e proteína total foram apresentados como média e erro padrão da média e as concentrações de PDGF-AB foram apresentados como mediana e intervalo interquartil. As concentrações de TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB e proteína total no plasma e nos CAP foram analisadas mediante análise de variância (ANOVA) e como prova post-hoc se utilizou o teste Student Newman-Keuls (SNK). As concentrações de PDGF-AB foram analisadas pelo teste de Friedman, os valores da concentração de

<sup>20</sup> Sigma-Aldrich, United States of America

<sup>21</sup> Oregon, United States of America

<sup>22</sup> United States of America

PDGF-AB (dados censurados à esquerda), foram comparados com o limiar de detecção (1,7 pg / mL) do teste de ELISA. Os fatores de crescimento foram testados para correlação com a contagem de células mediante testes de Pearson e Spearman. A comparação entre substâncias ativadoras, a dinâmica de liberação de TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB entre 3 e 12 horas, bem como os dados de microscopia eletrônica de transmissão foram analisados pelo teste de t pareado, e número de grânulos- $\alpha$  pelo teste de Wilcoxon. Aceitou-se uma diferença estatisticamente significativa de  $P \leq 0,05$  para todos os testes. A eficiência de concentração de TGF- $\beta_1$  e PDGF-BB foi determinada mediante a fórmula de Weibrich et al. (2005): (concentração do fator de crescimento no CAP x volume do CAP / concentração do fator de crescimento no sangue total x volume de sangue total) x 100.

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1. Determinação da concentração de Fatores de crescimento beta transformador 1 (TGF- $\beta_1$ ), derivado das plaquetas tipo AB (PDGF-AB) e derivado das plaquetas tipo BB (PDGF-BB).

Os resultados da concentração dos PDGF estão expressos nas tabelas 5 e 6. No primeiro grupo de cães (n=12), não se encontrou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nas concentrações de TGF- $\beta_1$  no plasma e nos CAP ativados com gluconato de cálcio ou com cloreto de cálcio (tabela 5). Não houve correlação entre os níveis plasmáticos e as demais células nas contagens hematológicas, mas encontrou-se correlação positiva entre a contagem de plaquetas nos CAP e as concentrações de TGF- $\beta_1$  nas amostras ativadas com gluconato de cálcio ( $\rho = 0,746$   $P = 0,05$ ) ou cloreto de cálcio ( $\rho = 0,836$   $P = 0,01$ ), ao nível de significância de  $P < 0,01$ .

Nos cães, o PDGF-AB foi detectado em 66% (12/08) das amostras de plasma em EDTA. Em amostras de CAP ativado com gluconato de cálcio ou cloreto de cálcio o PDGF-AB foi detectado em 41,6% (12/05) dos cães, mas nem sempre ocorreu na mesma amostra (tabela 6). Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre as concentrações plasmáticas e as concentrações deste fator de crescimento no CAP ativado com gluconato de cálcio ou cloreto de cálcio, bem como nenhum tipo de correlação.

Tabela 5. Concentração de TGF- $\beta_1$  no plasma e no sobrenadante de CAP ativado com gluconato de cálcio e cloreto de cálcio, em cães (média, erro padrão da média)

Variável	Concentração TGF- $\beta_1$ ng/mL
Plasma (EDTA)	22,08 (3,79) a
Gluconato de cálcio	17,66 (2,69) a
Cloreto de cálcio	14,45 (1,58) a

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste SNK ( $P > 0,05$ )

Tabela 6. Mediana (intervalo interquartilico) da concentração (pg / mL) de PDGF-AB no plasma e no sobrenadante de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativado com gluconato de cálcio ou cloreto de cálcio

Cão	Plasma pg/mL (EDTA)	CAP ativado com Gluconato cálcio pg/mL	CAP ativado com Cloreto cálcio pg/mL
1	140,46	222,3	167,64
2	305,19	167,64	59,26
3	86,31	-	-
4	140,46	194,92	113,36
5	167,64	-	-
6	222,3	-	86,31
7	113,36	59,26	194,92
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	59,26	249,8	-
12	-	-	-
Mediana	99,84 (159,15) a	1,70 (214,62) a	1,70 (120,88) a

Medianas seguidas de letras iguais nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Friedmann (P>0,05)

Os resultados no segundo grupo de cães (n=16) expressos na tabela 7, mostram diferença significativa (P<0,05) nas concentrações de TGF- $\beta_1$  (ng/mL ou ng/mg de proteína total) do plasma e nas frações A e B do CAP, apresentando a fração A maior concentração, tanto nas amostras ativadas com gluconato de cálcio quanto naquelas ativadas com batroxobina. Não houve diferença significativa na proteína total entre plasma e as frações A ou B do CAP (tabela 7). A eficiência de concentração de TGF- $\beta_1$  nos CAP ativados com gluconato de cálcio foi de 47,75% na fração A e 31,77% na fração B. Nos CAP ativados com batroxobina observou-se eficiência de concentração de 46,87% na fração A e 32,24% na fração B. A eficiência de

concentração de TGF- $\beta_1$  nas frações A e B associadas, quando ativadas com gluconato de cálcio ou batroxobina foi de 165,57% e 158,22%, respectivamente. Não se encontrou nenhuma correlação entre as demais características celulares dos CAP, as concentrações de TGF- $\beta_1$  e proteína total. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre as substâncias ativadoras nas duas frações do CAP. Como no primeiro grupo de cães, verificou-se correlação significativa entre o número de plaquetas no CAP e a concentração de TGF- $\beta_1$  nas frações A ( $\rho=0,699$  P=0,049) e B ( $\rho=0,747$  P=0,03) ativadas com gluconato de cálcio, e A ( $\rho=0,714$  P=0,042) e B ( $\rho=0,755$  P=0,026) ativadas com batroxobina.

Tabela 7. Concentração de TGF- $\beta_1$  (ng/mL e ng/mg da proteína total) no plasma e no sobrenadante das frações A e B do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativado com gluconato de cálcio ou batroxobina, em cães (média, erro padrão da média)

Gluconato de cálcio	Plasma (ACD-A)	CAP - A	CAP - B
TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	13,71 (2,88) a	45,83 (5,43) b	30,49 (3,11) c
Proteína Total (mg/mL)	62,00 (0,96) a	62,25 (0,79) a	62,56 (1,06) a
TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,22 (0,05) a	0,73 (0,09) b	0,49 (0,05) c
Batroxobina			
TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	13,71 (2,88) a	44,98 (5,65) b	30,94 (3,20) c
Proteína Total (mg/mL)	62,00 (0,96) a	63,06 (1,25) a	64,69 (1,65) a
TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,22 (0,05) a	0,72 (0,09) b	0,48 (0,05) c

Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as substâncias ativadoras pelo teste de t ( $P > 0,05$ ).

O EDTA foi utilizado para a colheita do sangue total no primeiro grupo de cães e gatos por ser considerado o anticoagulante de eleição para contagem de células sanguíneas (Wayne, 2003) bem como, por ser utilizado rotineiramente em pequenos animais, por conservar a morfologia celular e ter pouco efeito diluidor da amostra (Meinkoth e Allison, 2007). O EDTA pode, todavia, segundo Abdelouahed et al. (2000), aumentar as concentrações de TGF- $\beta_1$  no sobrenadante de plaquetas, o que poderia ter acontecido no grupo (n=12) de animais utilizados na primeira etapa deste estudo, onde a concentração de TGF- $\beta_1$  no plasma foi igual a dos sobrenadantes dos CAP, possivelmente pelo efeito do anticoagulante. Soma-se a este efeito, o fato de que o EDTA pode provocar lesões estruturais, bioquímicas e funcionais nas plaquetas (White e Escolar, 2000) que levam ao aumento na liberação de TGF- $\beta_1$  e teria um efeito diluidor no plasma diminuindo assim a concentração a ser depositada na lesão. Os CAP obtidos com solução ACD-A mantém as plaquetas inativas até o momento da ativação com cálcio, e como já mencionado neste estudo, a concentração de TGF- $\beta_1$  está fortemente correlacionada com a concentração de plaquetas o que reforça o observado por Lei et al. (2009), de que a utilização de ACD-A produz CAP de qualidade superior. Porém, a utilização de diferentes anticoagulantes com o objetivo de comparar níveis deste

fator de crescimento poderia ser a principal limitante deste primeiro grupo de animais, mas por outro lado apresenta dados de níveis plasmáticos de TGF- $\beta_1$  em cães.

Utilizando-se um teste de ELISA comercial para determinação quantitativa da concentração de TGF- $\beta_1$  humano, Vercelli et al. (2003) relataram em dois cães, concentrações de 16,5 e 19,9 ng/mL em soro, não foram descritas informações sobre a metodologia de colheita da amostra e do processamento, além do reduzido n amostral. Por outro lado, Neumann et al. (2008) descreveram concentrações plasmáticas em 29 cães, entre 0,193 e 0,598 ng/mL em sangue colhido com EDTA, com dupla centrifugação a 1000 g x 15 minutos e a 10000 por 10 minutos a uma temperatura média de 4 °C. Estes são valores inferiores aos obtidos neste estudo, em plasma com uma única centrifugação, utilizando-se o mesmo anticoagulante e a mesma temperatura à centrifugação. Stief et al. (2011), citaram em plasma autólogo condicionado obtido de amostras em ACD-A em 10 cães, concentração média de  $1,2399 \pm 0,5908$  ng/mL, valor também inferior aos dados apresentados neste estudo tanto em plasma como em sobrenadante de CAP. A metodologia usada no presente estudo permitiu concentrar maior quantidade de plaquetas do que a citada por Stief et al. (2011) (293500/ $\mu$ L), e como relatado no presente trabalho, existe

alta correlação entre o número de plaquetas e a concentração de TGF- $\beta_1$  nos sobrenadantes de CAP. Estas diferenças também, podem ser devidas à metodologia de colheita e processamento das amostras. No presente trabalho, utilizou-se também, o kit ELISA comercial específico para a espécie canina diferente dos estudos relatados nos quais se utilizaram kits ELISA comerciais específicos para ser humano. Embora, não tenha sido encontrada diferença entre a concentração de TGF- $\beta_1$  no sobrenadante de CAP ativado com gluconato de cálcio ou batroxobina, segundo Mazzucco et al. (2008), a batroxobina reconstituída com gluconato de cálcio promoveria liberação mais lenta e por tempo mais prolongado do conteúdo dos grânulos alfa das plaquetas (incluído o TGF- $\beta_1$ ), mantendo assim níveis constantes por tempo mais longo do que as plaquetas ativadas com sais de cálcio que produziriam liberação rápida e em grande quantidade (Roberts et al., 2004). Este fato seria esclarecido por um estudo de dinâmica de liberação de fatores de crescimento no sobrenadante de CAP ativados com uma ou outra destas substâncias.

Também Vieweg et al. (1999), utilizando um kit ELISA comercial para determinação quantitativa da concentração de PDGF-AB humano, verificaram um valor médio de  $410.77 \pm 177.56$  pg/mL no soro de sete cães, enquanto Stief et al. (2011) relataram ausência de leitura em dez cães. No presente trabalho, onde se utilizou o mesmo Kit ELISA usado nos estudos já mencionados, não se obteve leitura de todas as amostras tanto em plasma como em sobrenadante de CAP (tabela 6). As amostras que apresentaram leitura tinham aproximadamente a metade da concentração relatada por Vieweg et al. (1999). Essas diferenças podem ser provocadas pela metodologia de colheita da amostra e processamento antes da leitura que poderia ativar plaquetas e liberar

PDGF-AB no plasma ou no soro sanguíneo. A não obtenção de leitura pelo kit ELISA para PDGF-AB pode ser devido em termos gerais, ao fato de que o PDGF apresenta baixa atividade no soro de cão (Bowen-Pope et al., 1989) e, possivelmente, à baixa homologia entre as sequências peptídicas do PDGF-AB humano e do cão. Os resultados obtidos na determinação da concentração de PDGF-AB indicam que os dados não são representativos da concentração deste fator no plasma ou no sobrenadante de CAP de cães.

Os resultados da concentração de TGF- $\beta_1$  em gatos estão expressos na tabela 8. Os resultados no segundo grupo de gatos (n=16) apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as concentrações de TGF- $\beta_1$  (ng/mL ou ng/mg de proteína total) e proteína total (mg/mL) no plasma e nas frações A e B dos CAP às três horas após ativação com gluconato de cálcio ou trombina bovina, mas não houve diferença entre as duas frações (tabela 8). Na dinâmica de liberação de TGF- $\beta_1$  não se encontrou diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre os tempos (de 3 para 12 horas) nem entre as substâncias ativadoras por tempo, em nenhuma das frações de CAP (tabela 9). A eficiência de concentração de TGF- $\beta_1$  às 3 horas dos CAP ativados com gluconato de cálcio foi de 42,86% na fração A e 46,54% na fração B. Dos CAP ativados com trombina bovina foi de 42,88% na fração A e 54,64% na fração B. Os CAP às 12 horas apresentaram uma eficiência de concentração de TGF- $\beta_1$  em amostras ativadas com gluconato de cálcio de 44,32% na fração A, 45,95% na fração B, e nas amostras ativadas com trombina bovina de 50,46% na fração A e 63,90% na fração B. A eficiência de concentração de TGF- $\beta_1$  quando se associou as frações A e B, após ativadas com gluconato de cálcio ou trombina bovina foi de 178,80% e 195,03% às 3 horas respectivamente, e de 180,55 e 228,71% às 12 horas, respectivamente.

Tabela 8. Concentração de TGF- $\beta_1$  (ng/mL e ng/mg da proteína total) no plasma e no sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina bovina, em gatos depois de 3 h (média, erro padrão da média)

Gluconato de cálcio	Plasma	CAP - A	CAP - B
TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	7,99 (1,59) a	23,97 (2,03) b	26,03 (2,23) b
Proteína Total (mg/mL)	52,93 (1,15) a	44,88 (0,93) b	46,21 (1,54) b
TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,15 (0,03) a	0,53 (0,04) b	0,57 (0,05) b
Trombina bovina			
TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	7,99 (1,59) a	23,98 (2,43) b	30,56 (4,47) b
Proteína Total (mg/mL)	52,93 (1,15) a	42,29 (1,37) b	43,20 (2,35) b
TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,15 (0,03) a	0,57 (0,06) b	0,69 (0,08) b

Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as substâncias ativadoras pelo teste de t ( $P > 0,05$ )

Tabela 9. Concentração de TGF- $\beta_1$  (ng/mL e ng/mg da proteína total) às 3 e 12 horas, em sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina bovina, em gatos (média, erro padrão da média)

		3 horas	12 horas
		CAP-A	
Gluconato de cálcio	TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	23,97 (2,03) a	24,79 (2,22) a
	Proteína Total (mg/mL)	44,88 (0,93) a	46,70 (1,36) a
	TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,53 (0,04) a	0,53 (0,05) a
Trombina bovina	TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	23,98 (2,43) a	28,22 (2,59) a
	Proteína Total (mg/mL)	42,29 (1,37) a	45,05 (2,25) a
	TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,57 (0,06) a	0,65 (0,07) a
		CAP -B	
Gluconato de cálcio	TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	26,03 (2,23) a	25,70 (2,43) a
	Proteína Total (mg/mL)	46,21 (1,54) a	46,67 (1,71) a
	TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,57 (0,05) a	0,56 (0,52) a
Trombina bovina	TGF- $\beta_1$ (ng/mL)	30,56 (4,47) a	35,74 (4,18) a
	Proteína Total (mg/mL)	43,20 (2,35) a	44,92 (2,15) a
	TGF- $\beta_1$ (ng/mg de PT)	0,69 (0,08) a	0,79 (0,09) a

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem significativamente pelo teste t ( $P > 0,01$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as substâncias ativadoras pelo teste de t ( $P > 0,05$ )

Arata et al. (2005) relataram em 12 gatos, concentração de  $21,48 \pm 8,948$  no soro sanguíneo, valor similar aos encontrados neste estudo no sobrenadante dos CAP, mas bem superiores aos observados no plasma (tabela 8). Esta diferença nas concentrações podem ter sido provocadas por diferenças na metodologia de colheita da amostra e no processamento antes da leitura do kit ELISA. O soro sanguíneo é o plasma sem fibrinogênio e os outros fatores de coagulação (Adkins et al., 2002) o que implica coagulação previa do sangue,

ativação das plaquetas e liberação no soro dos fatores de crescimento contidos nos grânulos alfa, incluindo o TGF- $\beta_1$ .

No primeiro grupo de gatos ( $n=12$ ), não houve leitura do kit ELISA para medir a concentração de PDGF-AB. Já no segundo grupo de gatos ( $n=16$ ), foi possível, mas sem diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre as concentrações de PDGF-BB (pg/mL ou pg/mg de proteína total) e proteína total (mg/mL) nas frações A e B dos CAP, mas houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre a

concentração de PDGF-BB nas frações A e B do CAP e a concentração plasmática após 3 horas de ativação com gluconato de cálcio ou trombina bovina (tabela 10). Na dinâmica de liberação de PDGF-BB de 3 para 12 horas, não se encontrou diferença significativa ( $P > 0,01$ ), entre as substâncias ativadoras por tempo, nas duas frações de CAP (tabela 11). A eficiência de concentração de PDGF-BB às 3 horas nos CAP ativados com gluconato de cálcio foi de 61,36% na fração A e 60,61% na fração B. Nos CAP ativados com trombina bovina foi de 65,64% na fração A e 72,12% na fração B. Os CAP às 12 horas apresentaram

uma eficiência de concentração de PDGF-BB de 55,46% na fração A, 54,69% na B, nas amostras ativadas com gluconato de cálcio, e de 65,88% na fração A e 65,72% na B nas amostras ativadas com trombina bovina. A eficiência de concentração de PDGF-BB quando se associou as frações A e B, após ativação com gluconato de cálcio ou trombina bovina às 3 horas foi de 243,93% e 275,52%, respectivamente, e de 220,29 e 263,20% às 12 horas, respectivamente. Não se encontrou nenhum tipo de correlação entre as características celulares dos CAP e as concentrações de PDGF-BB e proteína total.

Tabela 10. Concentração de PDGF-BB (pg/mL e pg/mg da proteína total) no plasma e no sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina bovina, em gatos (média, erro padrão da média)

	Gluconato de cálcio	Plasma	CAP – A	CAP – B
PDGF-BB (pg/mL)		365,89 (91,02) a	1571,56 (204,54) b	1552,23 (188,06) b
Proteína Total (mg/mL)		52,93 (1,15) a	44,88 (0,93) b	46,21 (1,54) b
PDGF-BB (pg/mg de PT)		6,91 (1,82) a	35,02 (4,12) b	33,59 (3,66) b
Trombina bovina				
PDGF-BB (pg/mL)		365,89 (91,02) a	1681,15 (188,26) b	1847,15 (208,34) b
Proteína Total (mg/mL)		52,93 (1,15) a	42,29 (1,37) b	43,20 (2,35) b
PDGF-BB (pg/mg de PT)		6,91 (1,82) a	39,75 (4,38) b	42,77 (5,29) b

Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as substâncias ativadoras pelo teste de t ( $P > 0,05$ )

Tabela 11. Concentração de PDGF-BB (pg/mL e pg/mg da proteína total) as 3 e 12 horas, no sobrenadante das frações A e B de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) ativados com gluconato de cálcio ou trombina bovina em gatos (média, erro padrão da média)

	3 horas		12 horas	
	CAP-A			
Gluconato de cálcio	PDGF-BB (pg/mL)	1571,56 (204,54) a	1420,32 (139,39) a	
	Proteína Total (mg/mL)	44,88 (0,93) a	46,70 (1,36) a	
	PDGF-BB (pg/mg de PT)	35,02 (4,12) a	30,41 (2,50) a	
Trombina bovina	PDGF-BB (pg/mL)	1681,15 (188,26) a	1687,40 (138,82) a	
	Proteína Total (mg/mL)	42,29 (1,37) a	45,05 (2,25) a	
	PDGF-BB (pg/mg de PT)	39,75 (4,38) a	37,45 (3,49) a	
CAP-B				
Gluconato de cálcio	PDGF-BB (pg/mL)	1552,23 (188,06) a	1400,75 (131,54) a	
	Proteína Total (mg/mL)	46,21 (1,54) a	46,67 (1,71) a	
	PDGF-BB (pg/mg de PT)	33,59 (3,66) a	30,01 (3,08) a	
Trombina bovina	PDGF-BB (pg/mL)	1847,15 (208,34) a	1683,16 (122,70) a	
	Proteína Total (mg/mL)	43,20 (2,35) a	44,92 (2,15) a	
	PDGF-BB (pg/mg de PT)	42,77 (5,29) a	37,47 (3,11) a	

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem significativamente pelo teste t ( $P > 0,01$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as substâncias ativadoras pelo teste de t ( $P > 0,05$ )

Não foram encontrados relatos sobre a concentração de PDGF-AB em gato. O fato de não conseguir leitura no kit ELISA no presente estudo, deve-se possivelmente as mesmas razões mencionadas para o cão. Também, para o PDGF-BB não foram encontrados relatos sobre sua concentração no plasma ou no sobrenadante de CAP. A leitura de concentração de PDGF-BB em gato com o emprego de um kit ELISA desenvolvido para humano, está de acordo com o relato de Van den Ouweland et al. (1987) que citam alta homologia entre a sequência peptídica do PDGF-BB humano e felino. Nos felinos não se encontrou nenhum tipo de correlação entre as características celulares dos CAP e as concentrações de TGF- $\beta_1$ , PDGF-BB e proteína total.

As substâncias mais frequentemente usadas para ativar CAP para propósitos clínicos são a trombina e os sais de cálcio. Existem relatos que correlacionam a utilização de trombina bovina com a formação de anticorpos contra o fator de coagulação V, protrombina e trombina, em humanos (Ortel et al., 2001). Em camundongo, existem relatos sobre a formação de anticorpos contra fatores autólogos de coagulação e indução de autoimunidade com características similares a lúpus eritematoso sistêmico (Schoenecker et al., 2001). Por esta razão o uso clínico de trombina bovina como ativador das plaquetas em medicina felina deve ser cuidadosamente estudado. Existem relatos sobre o uso de trombina autóloga obtida pela adição de gluconato de cálcio ao plasma, em seres humanos (Crovetti et al., 2004) e em cavalos (DeRossi et al., 2009). A Ativação de CAP com trombina autóloga, gluconato de cálcio ou ambos,

pode ser uma outra opção na prática clínica em gatos.

As diferenças encontradas entre os níveis de TGF- $\beta_1$  nos grupos de cães utilizados nas duas etapas do presente estudo, podem ser devidas à correlação altamente significativa entre o número de plaquetas e a concentração deste fator de crescimento, além das características próprias de cada grupo de animais. Um grupo de animais de cada espécie no presente estudo corresponde a animais de experimentação em pesquisa cirúrgica, que estavam confinados, submetidos a procedimentos cirúrgicos, frequentes extrações de sangue, e estresse permanente.

A presença de quantidades significativamente maiores de fatores de crescimento no sobrenadante de CAP indica-o como fonte deles. A dinâmica de liberação dos fatores de crescimento medida em gatos (tabelas 9 e 11) indica que a maior quantidade é liberada durante as primeiras horas depois da ativação. No presente estudo, não se verificou diferença entre as concentrações dos fatores de crescimento em sobrenadantes de CAP ativados com gluconato, cloreto de cálcio, trombina ou batroxobina o que sugere que a ativação de CAP pode ser feita com qualquer uma destas substâncias em cão e gato, e em termos de facilidade prática de aplicação clínica e relação custo-benefício, o gluconato de cálcio é a melhor opção.

### **3.3.2 Características ultra-estruturais dos concentrados autólogos de plaquetas (CAP).**

As características celulares dos CAP de cães e gatos foram similares às previamente descritas (tabela 12).

Tabela 12. Características celulares dos concentrados de plaquetas de cão e gato, utilizados para obter as amostras para avaliação ultra-estrutural

Variável	Cão	Gato
PLT (fragmentos x 10 <sup>3</sup> / μL)	529,29	863,31
PCV %	4,7	1,48
WBC (células x 10 <sup>3</sup> / μL)	7391	4280
LYM (células x 10 <sup>3</sup> / μL)	3390	2930
MON (células x 10 <sup>3</sup> / μL)	178	120
GRA (células x 10 <sup>3</sup> / μL)	3823	1230
MPV (fL)	9,15	9,3
PDW %	37,6	42,58

PLT, plaquetas; PCV, hematócrito; WBC, leucócitos; LYM, linfócitos; MON, monócitos; GRA, granulócitos, MPV, volume plaquetário médio; PDW, índice de distribuição de plaquetas.

Em cães, todas as plaquetas apresentavam lise com perda da arquitetura normal que segundo Wurzinger (1990) corresponde ao tipo IV na classificação das alterações morfológicas. Já em gatos, as plaquetas apresentavam alterações classificadas tipo III com alteração irreversível - discóide com organelas na periferia. No cão,

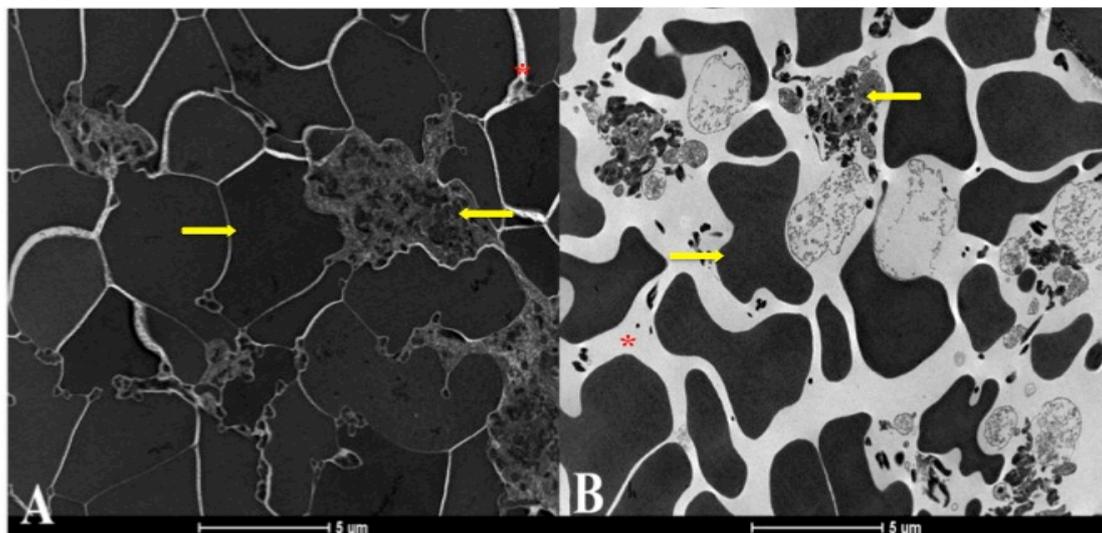
encontrou-se diferença significativa ( $P < 0,01$ ) quanto a área do espaço intercelular ( $\mu\text{m}^2$ ) ou sua porcentagem, área de fibras de fibrina ( $\mu\text{m}^2$ ) ou sua porcentagem, entre coágulos obtidos de CAP ativado com gluconato de cálcio ou batroxobina (tabela 13, Figuras 3 e 4).

Tabela 13. Características ultra-estruturais dos coágulos obtidos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, em cães (média, erro padrão da média)

Variável	Gluconato de cálcio	Batroxobina
Área do espaço intercelular ( $\mu\text{m}^2$ )	4,44 (0,22) a	12,83 (0,33) b
Porcentagem espaço intercelular (%)	19,19 (0,95) a	55,41 (1,42) b
Área de fibras de fibrina ( $\mu\text{m}^2$ )	4,44 (2,19) a	2,64 (1,53) b
Porcentagem fibras de fibrina (%)	19,18 (9,45) a	11,45 (6,60) b

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste t ( $P < 0,01$ ).

Figura 3. Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão mostrando as características microscópicas dos coágulos de CAP ativados com gluconato de cálcio (A) ou batroxobina (B), em cães.



← Plaqueta (seta para esquerda), → Hemácia (seta para direita), \* espaço intercelular. Aumento de 4800X.

Em gatos, verificou-se diferença significativa entre as áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) ou porcentagem de área das plaquetas e das fibras de fibrina, assim como nas relações eixo menor – eixo maior e eixo maior – eixo menor (tabela 14, Figuras 5 e 6). A mediana (intervalo interquartilico), do

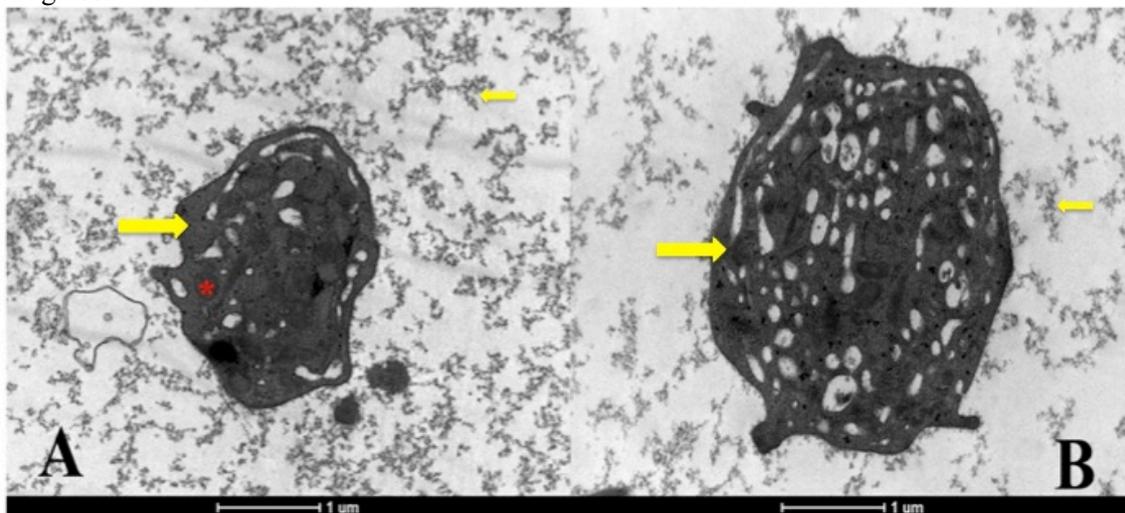
número de grânulos- $\alpha$  nas plaquetas ativadas com gluconato de cálcio foi 4,0 (1,0) e nas plaquetas ativadas com batroxobina foi 8,0 (10), com diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ).

Tabela 14. Características ultra-estruturais dos coágulos obtidos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina, em gatos (média, erro padrão da média)

Variável	Gluconato de cálcio	Batroxobina
Área plaquetas ( $\mu\text{m}^2$ )	2,86 (0,24) a	3,79 (0,28) b
Porcentagem área plaquetas (%)	12,34 (1,05) a	16,36 (1,20) b
Relação eixo menor / maior das plaquetas	0,50 (0,03) a	0,60 (0,03) b
Relação eixo maior / menor das plaquetas	2,28 (0,13) a	1,86 (0,01) b
Área fibras de fibrina ( $\mu\text{m}^2$ )	2,66 (0,17) a	1,58 (0,14) b
Porcentagem área de fibras de fibrina (%)	11,50 (0,74) a	6,80 (0,58) b

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste t ( $P < 0,01$ ).

Figura 4. Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão mostrando as características microscópicas dos coágulos de CAP ativados com gluconato de cálcio (A) ou batroxobina (B), em gatos.



→ Plaqueta (seta para direita), ← Fibrina (seta para esquerda), \* granulo alfa. Aumento de 18000X.

Figura 5. Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão mostrando os eixos maior e menor de plaquetas ativadas com gluconato de cálcio (A) ou batroxobina (B).



\*Medida de referência, Eixo maior (linha contínua), eixo menor (linha pontilhada). Aumento de 18000X.

As diferentes características ultra-estruturais dos coágulos obtidos a partir de CAP de cão e de gato ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina não permitiram realizar as mesmas análises para as duas espécies. Estas diferenças podem ter acontecido pelas características hematológicas dos CAP de cada espécie no

presente estudo, além das particularidades da fisiologia hematológica própria de cada espécie. Também, podem se dever a características morfológicas das plaquetas de cães e gatos. As plaquetas dos gatos tem maior diâmetro (2-6 µm) (Boudreaux et al., 2010) e maior volume plaquetário (8.6-14.1 fL) (Boudreaux e Ebbe, 1998) do que as

plaquetas de cão, com menor diâmetro (1-3 µm) (Wilkerson et al., 2001) e volume plaquetário médio (8.4-11.5) (Moritz et al., 2005), além de outros fatores muito complexos como os receptores de glicoproteínas e diferentes vias de sinais de transdução que poderiam estar envolvidas na resposta estrutural das plaquetas no presente estudo (Mazzucco et al., 2010).

Nos coágulos de fibrina obtidos de CAP ativados com gluconato de cálcio em cães, a menor área e porcentagem de área de espaço intercelular é um indicativo de maior agregação celular. A maior área ou porcentagem de área de fibras de fibrina sugerem maior grau de ativação das plaquetas e formação rápida do coágulo de fibrina formado com fibras mais grossas do que os ativados com batroxobina, pelo menos durante o tempo do estudo (2 horas de incubação após ativação).

Segundo Sweet et al. (2011) a plaqueta tem a forma aproximadamente elíptica, cuja relação eixo menor – eixo maior deve ser próxima de 0,5, e segundo Mody e King (2005), em termos gerais, a forma elíptica se determina pela relação eixo menor - eixo maior que é sempre inferior a 1. Quando essa forma se torna mais longa inverte-se a determinação de forma que passa a ser feita pela relação eixo maior – eixo menor que é sempre superior a 1. No presente trabalho, as plaquetas de gato ativadas com gluconato de cálcio apresentam relação eixos menor – maior igual a 0,5 mas uma relação de eixos maior – menor igual a 2,28 o que sugere uma alteração superior da forma elíptica do que as ativadas com batroxobina, que embora apresentassem uma relação eixo menor-maior igual a 0,60 também tinham uma relação eixo maior menor de 1,86, o que as coloca mais próximas da forma elíptica. As plaquetas de gato ativadas com batroxobina apresentaram maior área e porcentagem de área do que as ativadas com gluconato de cálcio, assim como maior número de

grânulos- $\alpha$  no citoplasma. Estes achados, associados às relações entre os eixos, sugerem menor grau de ativação. Em termos gerais, as plaquetas de gato requerem maior tempo de incubação após ativação para atingir a classificação das alterações morfológicas tipo IV (Wurzinger,1990), do que as plaquetas de cão, com as substâncias ativadoras aqui estudadas.

As diferenças encontradas entre os coágulos obtidos de CAP ativados com gluconato de cálcio ou batroxobina podem derivar de seu mecanismo de ação, já que esta última não produz ativação das plaquetas presas entre a rede de fibrina (Mazzucco et al., 20008). Embora seja reconstituída com gluconato de cálcio, a quantidade de sal de cálcio livre é proporcionalmente menor quando o CAP é ativado só com gluconato de cálcio. De acordo com este mecanismo de ação, o objetivo principal de ativação de CAP com batroxobina não é a liberação rápida e em grande quantidade do conteúdo dos grânulos alfa das plaquetas, como na ativação com sais de cálcio (Roberts et al., 2004).

Embora não tenham sido encontrados relatos sobre a descrição morfológica de CAP em cães e gatos, os achados do presente estudo sugerem que, a ativação com gluconato de cálcio produz liberação rápida e em grande quantidade dos fatores de crescimento armazenados nos grânulos alfa das plaquetas (Marx, 2004, Lacci e Dardik, 2010), pelo menos durante o tempo do estudo (2 horas de incubação após ativação). Portanto, acredita-se que esta substância pode ser utilizada para ativar CAP com fins terapêuticos onde se requeira rápida liberação de fatores de crescimento. Em gatos, durante as primeiras duas horas, a produção de fibrina é maior quando os CAP são ativados com gluconato de cálcio. Em cães, os achados indicam que, a ativação com gluconato de cálcio durante o tempo estudado, produz fibras de fibrina

grossas que podem constituir uma matriz resistente que, segundo Dohan Ehrenfest et al. (2009) seria considerada um biomaterial de fibrina.

### 3.4 Referências bibliográficas

ABDELOUAHED, M.; LUDLOW, A.; BRUNNER, G.; LAWLER, J. Activation of platelet transforming growth factor b-1 in the absence of thrombospondin-1. *J Biol Chem.* v. 275, n. 24, p. 17933-17936, 2000.

ADKINS, J. N.; VARNUM, S. M.; AUBERRY, J. K.; MOORE, R. J.; ANGELL, N. H.; SMITH, R. D.; SPRINGER, L. D.; POUND, J. G. Toward a human blood serum proteome. *Mol Cell Proteomics.* v. 1, n. 12, p. 947-955, 2002.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* v. 91, n. 1, p.4-15, 2004.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M.; AZOFRA, J.; del MAR ZANDUENDO, M.; de la FUENTE, M.; NURDEN, P.; NURDEN A. T. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* v. 23, n. 2, p.281-286, 2005.

ARATA, S.; OHMI, A.; MIZUKOSHI, F.; BABA, K.; OHNO, K.; SETOGUCHI, A.; TSUJIMOTO, H. Urinary transforming growth factor-beta1 in feline chronic renal failure. *J Vet Med Sci.* v. 67, n. 12, p. 1253-1255, 2005.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTÍNEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci.* v. 81, n. 2, p. 237-245, 2006.

BELDON, P. Basic Science of wound healing. *Surgery.* v. 28, n. 9, p. 409-412. 2010.

BOUDREAUX, M. K.; EBBE, S. Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comp Haematol Int.*, v. 8, n. 1, p. 16-20, 1998.

BOUDREAUX, M. K.; OSBORNE, C. D.; HERRE, A. C.; RIVERA, E. R.; SPANGLER, E. A. Unique structure of the Mloop region of b1-tubulin may contribute to size variability of platelets in the family Felidae. *Vet Clin Pathol.*, v. 39, n. 4, p. 417-423, 2010.

BOWEN-POPE, D. F.; HART, C. E.; SEIFERT, R. A. Sera and conditioned media contain different isoforms of platelet-derived growth factor (PDGF) which bind to different classes of PDGF receptor. *J Biol Chem.* v. 264, n. 5, p. 2502-2508, 1989.

CROVETTI, G.; MARTINELLI, G.; ISSI, M.; BARONE, M.; GUIZZARDI, M.; CAMPANATI, B.; MORONI, M.; CARABELLI, A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci.* v. 30, n. 2, p. 145-151, 2004.

DEROSSI, R.; COELHO, A. C.; MELLO, G. S.; FRAZILIO, F. O.; LEAL, C. R.; FACCO, G. G.; BRUM, K. B. Effects of platelet rich-plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir Bras.* v. 24, n. 4, p. 276-281, 2009.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.

- ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. *Surgery*. v. 26, n. 2, p. 31-37, 2008.
- HARTWIG, J.; ITALIANO, J.. The birth of the platelet. *J Thromb Hemost.*, v. 1, n. 7, p. 1580-1586, 2003.
- LACCI, K. M.; DARDIK, A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med*. v. 83, n. 1, p. 1-9, 2010.
- LEI, H.; GUI, L.; XIAO, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem*. v. 42, n. 13-14., p. 1452-1460, 2009.
- MANNAIONI, P. F.; DI BELLO, G. M.; MASINI, E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res*. v. 46, n. 1, p. 4-18, 1997.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Sur*. v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.
- MAZZUCCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E.; BORZINI, P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Vox Sang*. v. 94, n. 3, p. 202-208, 2008.
- MAZZUCCO, L.; BORZINI, P.; GOPE, R. Platelet-derived factors involved in tissue repair-from signal to function. *Transfus Med Rev*. v. 24, n. 3, p. 218-234, 2010.
- MEINKOTH, J. H.; ALLISON, R. W. Sampling collection and handling: getting accurate results. *Vet Clin Small Anim*. v. 37, n. 2, p. 203-219, 2007.
- MODY, N. A.; KING, M. R. Three-dimensional simulations of a platelet-shaped spheroid near a wall in shear flow. *Phys Fluids*. v. 17, n. 11, p. 113302, 2005.
- MORITZ, A.; WALCHECK, B. K.; WEISS, D. J. Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *Am J Vet Res*. v. 66, n. 2, p. 325-329, 2005.
- NEUMANN, S.; KAUP, F. J.; BEARDI, B. Plasma concentration of transforming growth factor-beta1 and hepatic fibrosis in dogs. *Can J Vet Res*. v. 72, n. 5, p. 428-431, 2008.
- ORTEL, T. L.; MERCER, M. C.; THAMES, E. H.; MOORE, K. D.; LAWSON, J. H. Immunologic impact and clinical outcomes after surgical exposure to bovine thrombin. *Ann Surg*. v. 233, n. 1, p. 88-96, 2001.
- PELAGALLI, A., LOMBARDA, D., D'ANGELO, R.; DELLA MORTE, R.; AVALLONE, L.; STAIANO, N. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Pathol*. v. 127, n. 2-3, p. 126-132, 2002.
- SCHOENECKER, J. G.; JOHNSON, R. K.; LESHER, A. P.; DAY, J. D.; LOVE, S. D.; HOFFMAN, M. R.; ORTEL, T. L.; PARKER, W.; LAWSON, J. H. Exposure of mice to topical bovine thrombin induces systemic autoimmunity. *Am J Pathol*. v. 159, n. 5, p. 1957-1969, 2001.
- STIEF, M.; GOTTSCHALK, J.; IONITA, J. C.; EINSPANIER, A.; OECHTERING, G.; BÖTTCHER, P. Concentration of platelets and growth factors in canine autologous conditioned plasma. *Vet Comp Orthop Traumatol*. v. 24, n. 2, p. 122-1225, 2011.
- SWEET, C. R.; CHATTERJEE, S.; XU, Z.; BISORDI, K.; ROSEN, E. D.; ALBER, M. Modelling platelet-blood flow interaction

using the subcellular element Langevin method. *J R Soc.* v. 8, n. 65, p. 1760–1771, 2011.

ROBERTS, D. E.; McNICOL, A.; BOSE, R. Mechanism of collagen activation in human platelets. *J Biol Chem.* v. 279, n. 9, p. 19421–19430, 2004.

Van den OUWELAND, A. M.; Van GRONINGEN, J.J.; SCHALKEN, J.A.; Van NECK, H. W.; BLOEMERS, H.P.; Van de VEN, W. J. Genetic organization of the c-sis transcription unit. *Nucleid Acids Res.* v. 15, n. 3, p. 959-970, 1987.

VERCELLI, A.; BELLONE, G.; ABATE, O.; EMANUELLI, G.; CAGNASSO, A. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in the skin, kidney, pancreas and bladder in a German shepherd dog affected by renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* v. 50, n. 10, p. 506-10, 2003.

VIEWEG, U.; SCHRAMM, J.; URBACH, H. Platelet-derived growth factor (PDGF-AB) like immune reactivity in serum and in cerebral spinal fluid following experimental subarachnoid haemorrhage in dogs. *Acta Neurochir (Wien).* v. 141, n. 8, p. 861-855, 1999.

WAYNE, P. A. Tubes and additives for venous blood specimen collection; approved standard - fifth edition. Document H1-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 33, 2003.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K.; HITZLER, W. E.; HAFNER, G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in growth factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* v. 20, n. 1, p. 118–123, 2005.

WHITE, G.; ESCOLAR, G. EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. *Platelets.* v. 11, n. 1, p. 56-61, 2000.

WILKERSON, M. J.; SHUMAN, W.; SWIST, S.; HARKIN, K.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol.*, v. 30, n. 3, p. 141- 149, 2001.

WURZINGER, L.J. Histophysiology of the circulating platelet. Springer-Verlag, 1990, p.9.

## CAPITULO IV

### 4. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E EM PLATAFORMA DE FORÇA DO EFEITO DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP) NO TRATAMENTO DA OSTEOARTROSE (OA) ADQUIRIDA NO CÃO.

#### Resumo

Foram utilizados 10 cães, cinco machos e cinco fêmeas, de diferentes raças, com idade variando de dois a oito anos e massa corporal de 17 a 40 kg, com ruptura de ligamento cruzado cranial (RLCCr). Os cães foram submetidos a tratamento cirúrgico para substituição do ligamento por auto enxerto de fâscia lata guiado por vídeo artroscopia. Os cães foram divididos em dois grupos conforme o pós operatório. Seis cães receberam três injeções intra-articulares de concentrado autólogo de plaquetas (CAP), iniciando imediatamente após a cirurgia e em intervalos de 15 dias, e quatro cães receberam um agente modificador da osteoartrose (OA) diariamente, durante o tempo de avaliação. Todos receberam muleta de Thomas modificada por 15 dias. Os animais foram submetidos a avaliação radiográfica e em plataforma de força com intervalos mensais até 90 dias. Na avaliação radiográfica verificou-se no grupo tratado com CAP, em um cão mineralização intra-articular e osteofitose no pré operatório que evoluiu para maior grau no dia 60 do pós operatório, e em outro paciente verificou-se osteofitose no pré operatório que progrediu para maior grau no dia 60 do pós operatório. No grupo controle positivo verificou-se, em um cão osteofitose no pré operatório que evoluiu para maior grau no dia 30 do pós operatório. Na avaliação biomecânica verificou-se que, no grupo tratado com CAP os valores de pico de força vertical ( $Pf_z$ ) e impulso vertical ( $If_z$ ) foram iguais ao do membro contralateral aos 90 dias de estudo, o que não ocorreu no grupo controle positivo. Neste grupo, os valores de  $Pf_z$  e  $If_z$  aos 90 dias eram iguais que aos de 30 dias. Em termos clínicos estes resultados demonstram melhor apoio do membro operado e melhor distribuição do peso nos membros posteriores (membro operado e o contralateral) no grupo tratado com CAP. Os resultados obtidos nas avaliações radiográficas e em plataforma de força, nestes pacientes, indicam o possível potencial do concentrado autólogo de plaquetas como alternativa biológica, versátil e econômica, como possibilidade terapêutica na OA.

#### Abstract

Were used 10 dogs, five males and five females of different races, ages ranging from two to eight years and weight 17-40 kg, ages ranging from two to eight years and weight 17-40 kg, with cranial cruciate ligament (CCL) rupture. These dogs were treated surgically by replacement of CCL with auto-graft of fascia lata, guided for video arthroscopy. The Dogs were divided into two groups according to postoperative period, six dogs received three intra-articular injections of autologous platelet concentrate (APC), starting immediately after surgery and at intervals of 15 days, and four dogs received a modifying agent of osteoarthritis (OA) daily, for all time of evaluation. All were treated with modified crutch of Thomas for 15 days. The animals were subjected to radiographic and force plate evaluation at monthly intervals up to 90 days. In the radiographic evaluation was found in the treated group, in one dog, mineralization and intra-articular osteophytes preoperatively that progressed to a greater degree in the 60 days after surgery, another patient was found osteophytes preoperatively that progressed to a greater degree on the 60 postoperatively. In the control group was found not mineralization, and in one dog was found osteophytes preoperatively that progressed to a greater degree in 30 days after operation. In biomechanical evaluation found that the group treated with CAP values of peak

vertical force ( $Pf_z$ ) and vertical thrust ( $If_z$ ) were similar to the contralateral limb at 90 days of study, which was not observed in the control group. In this group the values of  $Pf_z$  and  $If_z$  at 90 days was equal to that 30 days. In clinical terms, these results demonstrate better support the operated limb and better weight distribution to the hind limbs (operated and contralateral limb) in the group treated with CAP. The results obtained in the force platform in these patients indicate the possible potential of autologous platelet concentrate CAP as a biological alternative, versatile and economical, as a therapeutic option in the treatment of OA.

## 4.1 Introdução

A ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCCr) é uma das principais causas de claudicação no cão (Jhonson et al., 1994; Vasseur, 2003). O tratamento cirúrgico inclui estabilização extra e intra capsular, e técnicas de osteotomia (TPLO) (Conzemius et al., 2005). Independentemente da técnica utilizada, as maiores complicações pós-cirúrgicas são a diminuição da funcionalidade e progressão da osteoartrose (OA) na articulação fêmoro-tíbio-patelar (Elkins et al., 1991; Hurley et al., 2007). O concentrado autólogo de plaquetas (CAP) é um concentrado natural de fatores de crescimento, principalmente fator de crescimento beta transformador 1 ( $TGF-\beta_1$ ), fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e outras proteínas que modulam a inflamação e a cicatrização (Carmona et al., 2009). Estudos indicam que, o tratamento com injeções intra-articulares (IA) de CAP é seguro e tem potencial para reduzir a dor e melhorar a funcionalidade da articulação fêmoro-tíbio-patelar e a qualidade de vida em pacientes humanos com degeneração articular (Kon et al., 2009; Filardo et al., 2011). Existem relatos, em medicina veterinária, sobre a utilização de IA de CAP no tratamento de OA em cavalos (Carmona et al., 2007) e de osteocondrite dissecante da articulação escápulo-umeral em um cão (Neumann e Viefhues, 2010) mas, os estudos em pequenos animais ainda são incipientes. O objetivo deste estudo foi avaliar, radiograficamente e em plataforma de força, o efeito da utilização de CAP no pós-cirúrgico de cães com RLCCr

submetidos a tratamento cirúrgico por substituição do ligamento por auto enxerto de fâscia lata guiado por vídeo artroscopia.

## 4.2 Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo número 125/2009.

### 4.2.1 Animais

Para avaliar o efeito do CAP no tratamento da OA adquirida no cão, utilizaram-se dez cães que foram encaminhados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais, com graus moderado e acentuado de claudicação e sinais clínicos de ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCCr). Os pacientes foram divididos em dois grupos, um constituído por seis animais que receberam CAP no pós-cirúrgico e outro grupo controle positivo, constituído por quatro cães, que receberam administração oral de sulfato de condroitina, glucosamina, ácido ascórbico, colágeno e sulfato de manganês<sup>23</sup> diariamente por 90 dias (tempo final do estudo). As características de cada animal estão expressas na tabela 15.

Os fatores de inclusão dos pacientes no estudo foram: ruptura do ligamento cruzado cranial, possibilidade de intervenção artroscópica, cooperação do proprietário e temperamento do paciente. Todos os cães foram submetidos à avaliação clínica

<sup>23</sup> Condroton, São Paulo, Brasil.

ortopédica considerando o grau de instabilidade articular pelo teste de compressão tibial e deslocamento cranial da tibia em relação ao fêmur, antes do tratamento cirúrgico, bem como à avaliação radiográfica e em plataforma de força antes do tratamento, aos 30, 60 e 90 dias.

Ao exame radiográfico foram avaliados os sinais de OA e classificados segundo a escala de Innes et al. (2004) considerando: efusão articular (0-2), osteofitose (0-3), mineralização intra-articular (0-2) e esclerose subcondral tibial (0-1), sendo o escore 0 normal, e cada parâmetro foi avaliado individualmente.

Ao exame artroscópico (figura 7) foram avaliadas as estruturas moles e duras considerando as alterações das vilosidades e vascularização na membrana sinovial segundo McIlwraith e Fessler (1978), como indicador do grau de sinovite com escore 0 (normal), I discreta (vilosidades delgadas, filamentosas, atrofiadas, brancas ou rosadas, com presença de vasos sanguíneos ingurgitados), II moderada (vilosidades em forma de pólipo, leque, galho de árvore, bastão, avermelhadas, com vascularização e hiperemia da membrana sinovial), III

acentuada (vilosidades numerosas, densas em forma de couve-flor, de franja, de aspecto hemorrágico e coloração vermelha, com hipervascularização, hiperemia, e hemorragia articular). Foram avaliadas as alterações da cartilagem e classificadas segundo Outerbridge (Beale et al., 2003): graus 0 (normal), I (condromalacia), II (fibrilação, fissuras superficiais com aparência aveludada, erosão superficial, lesões sem exposição do osso subcondral), III (fissuras profundas com exposição do osso subcondral, úlceras profundas sem exposição do osso subcondral), IV (exposição do osso subcondral com ou sem formação de cavidade óssea), V (eburnação óssea). Foi avaliada a presença de osteofitose (Beale et al., 2003) como discreta (osteófitos pouco visíveis), moderada (osteófitos isolados e claramente visíveis e de superfície lisa), acentuada (séries contínuas de osteófitos medianos ou grandes, com aspecto nodoso).

As características da avaliação radiográfica e artroscópica dos pacientes antes do tratamento cirúrgico estão expressas na tabela 16.

Tabela 15. Características dos cães incluídos no estudo clínico de avaliação do efeito terapêutico do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) no tratamento da osteoartrose

Paciente	Grupo	Raça	Sexo	Idade (anos)	Massa corporal	Membro Acometido
1	CAP	Sharpei	Fêmea	2	19	Direito
2	CAP	Pit bull	Macho	3	24	Esquerdo
3	CAP	Pit bull	Fêmea	2	17	Esquerdo
4	CAP	Boxer	Macho	4	34	Direito
5	CAP	Boxer	Macho	2	23	Direito
6	CAP	Labrador	Macho	8	38	Direito
7	Controle positivo	Bull Dog	Macho	2	34	Esquerdo
8	Controle positivo	Rottweiler	Fêmea	2	34	Esquerdo
9	Controle positivo	Pit bull	Fêmea	5	22	Direito
10	Controle positivo	Rottweiler	Fêmea	7	40	Esquerdo

Tabela 16. Características radiográficas e artroscópicas da articulação femoro-tibio-patelar dos cães antes do tratamento cirúrgico

Paciente	Avaliação Radiográfica			Classificação Vilosidades e vascularização	Classificação Macroscópica Outerbridge	Osteofitose
	O	MIA	EST			
1	0	0	1	II	III	Acentuada
2	1	1	1	III	IV	Acentuada
3	1	0	1	II	IV	Acentuada
4	1	0	1	III	IV	Acentuada
5	1	0	1	II	IV	Acentuada
6	1	0	1	II	III	Acentuada
7	1	0	1	II	IV	Acentuada
8	1	0	1	III	IV	Acentuada
9	0	0	1	II	III	Acentuada
10	0	0	1	II	III	Acentuada

O, osteofitose (0-3); MIA, mineralização intra-articular (0-2); EST esclerose subcondral tibial (0-1), vilosidades e vascularização (0-III), classificação macroscópica Outerbridge (0-V), osteofitose (discreta, moderada, acentuada).

Foi feita artroscopia para avaliação das condições articulares, confirmação do diagnóstico de RLCCr e tratamento cirúrgico mediante substituição do LCCr por auto enxerto de fásia lata guiado por vídeo artroscopia (Muzzi et al., 2009). Realizou-se a pré anestesia com acepromazina<sup>24</sup> (0,02 mg/kg) + morfina<sup>25</sup> (0,25 mg/kg) via intramuscular, indução anestésica com propofol<sup>26</sup> (6 mg/Kg até efeito) via intravenosa e anestesia inalatória com isoflurano<sup>27</sup>, e uma única aplicação intramuscular de cloridrato de tramadol<sup>28</sup> (2 mg/kg), ao término da cirurgia. Os pacientes receberam carprofeno<sup>29</sup> 2,2 mg/kg e cefalexina<sup>30</sup> 30 mg/kg a cada 12 horas, ambos por via oral, durante sete dias. O membro foi imobilizado durante 15 dias com muleta de Thomas modificada.

Foram feitas três injeções intra-articulares (IA) de fração A do CAP como terapia pós-cirúrgica em intervalos de duas semanas, ocorrendo a primeira imediatamente após a cirurgia. Utilizou-se a fração A do CAP, como descrito no capítulo II. Em cada aplicação foram injetados 2 mL de CAP ativado mediante adição de 0,2 mL de gluconato de cálcio 10%. Os pacientes foram avaliados radiograficamente e em plataforma de força antes da intervenção cirúrgica, aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório.

<sup>24</sup> Acepran 0,2%, Vetnil, São Paulo, Brasil

<sup>25</sup> Dimorf 0,1 mg/mL, Cristália, São Paulo, Brasil

<sup>26</sup> Propofol 1%, Blausiege, São Paulo, Brasil

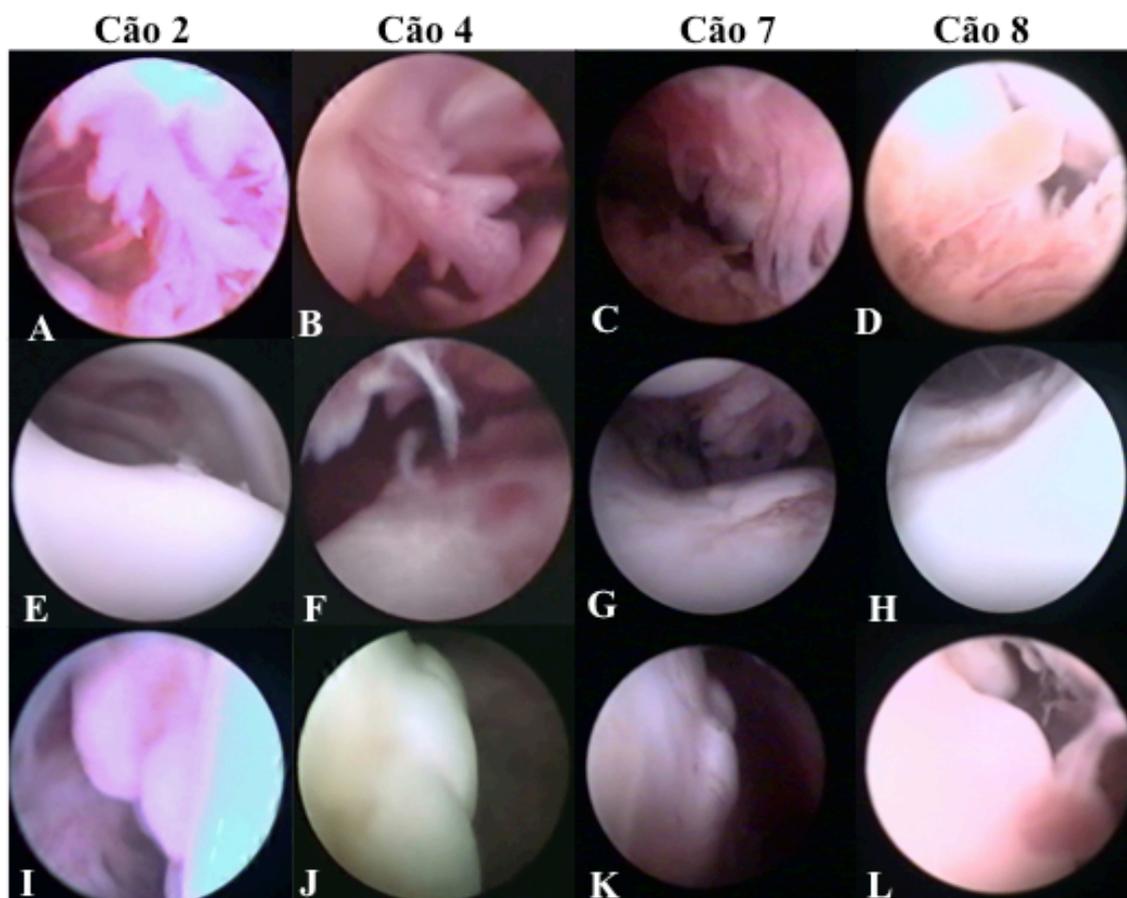
<sup>27</sup> Isoforine, Cristália, São Paulo, Brasil

<sup>28</sup> Tramal 5%, Pfizer, São Paulo, Brasil

<sup>29</sup> Rimadyl, Pfizer, São Paulo, Brasil

<sup>30</sup> Cefalexina 500 mg, Billi Farmacêutica, São Paulo, Brasil

Figura 6. Imagens artroscópicas da articulação femoro-tibio-patelar de cães tratados (2 e 4) e não tratados (7 e 8) com concentrado autólogo de plaquetas antes do tratamento cirúrgico de estabilização articular



Vilosidades em forma de galho de árvore (A), leque (B), franja (C), bastão (D); úlceras sem (E, H) e com (F, G) exposição do osso subcondral; osteófitos claramente visíveis (I – L).

#### 4.2.2. Avaliação radiográfica

A avaliação radiográfica de ambas articulações fêmoro-tíbio-patellares foi feita antes da cirurgia, aos 30, 60 e 90 dias do pós-cirúrgico nas posições medio-lateral e crânio-caudal e os sinais radiográficos de OA foram analisados mediante a escala de Innes et al. (2004). Cada radiografia foi avaliada três vezes, pelo mesmo avaliador com intervalo de uma semana entre cada avaliação, cujo resultado final foi a pontuação com maior frequência de qualificação. O estudo foi descritivo, com

identificação da evolução dos pacientes ao longo de 90 dias.

#### 4.2.3 Avaliação em plataforma de força

A avaliação da marcha para determinar objetivamente o grau de claudicação e indiretamente da dor, foi feita em plataforma de força colocada numa pista de marcha de 3 metros de comprimento com 50 cm de largura e 10 cm de altura. As forças verticais de reação do solo que atuam entre o membro e a plataforma, foram avaliadas na fase de apoio do ciclo de

marcha. O paciente caminhou no seu próprio ritmo. A velocidade de marcha foi calculada com base no tempo de ciclo do membro torácico esquerdo, pela fórmula: velocidade = frequência (ciclos/s) x amplitude (m) (Bertram e Ruina, 2001), para o qual se utilizou uma videocâmara 60 Hz<sup>31</sup>. Avaliaram-se três ciclos válidos por cada membro. Considerou-se como ciclo válido o apoio ipsilateral dos membros. Os dados foram adquiridos a uma velocidade de 300 Hz e processados com o programa DasyLab 10<sup>32</sup>. Os dados avaliados foram o pico de força vertical (P<sub>fz</sub>) e o impulso vertical (I<sub>fz</sub>) que foram normalizados à massa corporal (N/kg e N/kg/s, respectivamente). Cada variável foi expressa em porcentagem do total da força-impulso exercido por todos os membros mediante o uso da fórmula:  $X\%_{(\text{membro A})} = F_{(\text{membro A})} / (F_{(\text{membro A})} + F_{(\text{membro B})} + F_{(\text{membro C})} + F_{(\text{membro D})})$  (Katic et al., 2009), onde X% representa a porcentagem de peso distribuído através dos membros e A, B, C e D representam os quatro membros do cão e F representa o valor de força-impulso do membro correspondente. Para as análises classificaram-se os membros como membro acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D). Calculou-se a média do valor dos três ciclos de marcha por membro para a normalização das variáveis e utilizou-se este valor para as análises. As análises cinéticas foram feitas nos mesmos tempos das avaliações radiográficas. Compararam-se os membros de cada grupo de cães no tempo e entre cada grupo.

#### 4.2.4 Análise estatística

As variáveis do estudo foram testadas em relação à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Para determinar o comportamento dos valores da plataforma de força ao longo

do tempo foi feito um teste ANOVA independente para cada membro num desenho de blocos ao acaso onde o cão é o bloco e se considerou como tratamento, os dias de avaliação. Como prova post-hoc se utilizou o teste Student Newman-Keuls (SNK). Para comparar o comportamento dos valores da plataforma de força por dia entre membros contralaterais utilizou-se um teste t pareado e para comparar por grupo, e por membro, em cada membro em cada dia, utilizou-se um teste t para amostras independentes. Foi feito o coeficiente de correlação de Pearson (ρ) para determinar o grau de associação entre a velocidade e os parâmetros avaliados. Aceitou-se uma diferença estatisticamente significativa de P ≤ 0,01 para t, e P ≤ 0,05 para o ANOVA, e para ρ.

#### 4.3 Resultados e discussão

Após a obtenção do CAP foi feita a contagem celular por impedância volumétrica. A média das contagens celulares das três aplicações nos seis pacientes tratados estão expressos na tabela 17. Os resultados obtidos no sangue total e no CAP são similares aos achados na etapa de padronização do método do tubo no presente estudo. O único valor que se apresenta diferente são os LYM cujas contagens são superiores nos CAP de cães tratados, fato não observado durante a padronização. Os pacientes não mostraram nenhuma complicação sistêmica ou local associada com o procedimento cirúrgico, mas um cão apresentou dor e inflamação articular após aproximadamente duas horas da injeção intra-articular (IA) de CAP, na segunda aplicação aos 15 dias do pós-cirúrgico, que se resolveu sem tratamento ao término de aproximadamente 12 horas.

<sup>31</sup> SONY DCR-SX63, China

<sup>32</sup> Measurement Computing, United States of America

Tabela 17. Contagens hematológicas /  $\mu\text{L}$  em sangue total e nos concentrados autólogos de plaquetas dos cães tratados com CAP (média, erro padrão da média)

Variável	Sangue total	Concentrado Autólogo de Plaquetas
PLT (fragmentos $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	379,61 (28,89) a	639,97 (56,75) b
PCV %	40,87 (1,59) a	5,57 (0,82) b
WBC (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	10,56 (0,74) a	7,66 (1,23) b
LYM (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	1,19 (0,18) a	3,80 (0,57) b
MON (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	0,39 (0,06) a	0,19 (0,04) b
GRA (células $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	8,99 (0,70) a	3,82 (0,82) b
MPV (fL)	8,42 (0,21) a	8,47 (0,24) a
PDW (%)	37,15 (0,55) a	36,96 (0,57) a

PLT, plaquetas; PCV, hematócrito; WBC, leucócitos; LYM, linfócitos; MON, monócitos; GRA, granulócitos. Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste t ( $P < 0,01$ )

Na avaliação radiográfica não se observou efusão articular, mas foi confirmada ao exame clínico pré-cirúrgico em todos os cães, não mais clinicamente aparente 30 dias após a o tratamento cirúrgico. A esclerose subcondral tibial esteve presente em todos os cães e se manteve até o dia 90.

No grupo tratado com CAP, verificou-se em um dos pacientes (cão 2), mineralização intra-articular de pontuação 1 visível no pré cirúrgico que evoluiu no dia 60 para pontuação 2, bem como osteofitose de pontuação 1 no pré cirúrgico que evoluiu para pontuação 2 no dia 60. Em outro paciente (cão 4) verificou-se osteofitose de pontuação 1 desde antes da cirurgia que evoluiu para pontuação 2 no dia 60 (Figura 8). Outros pacientes deste grupo (cães 3, 5 e 6) apresentaram osteofitose de pontuação 1 do pré-cirúrgico até o dia 90.

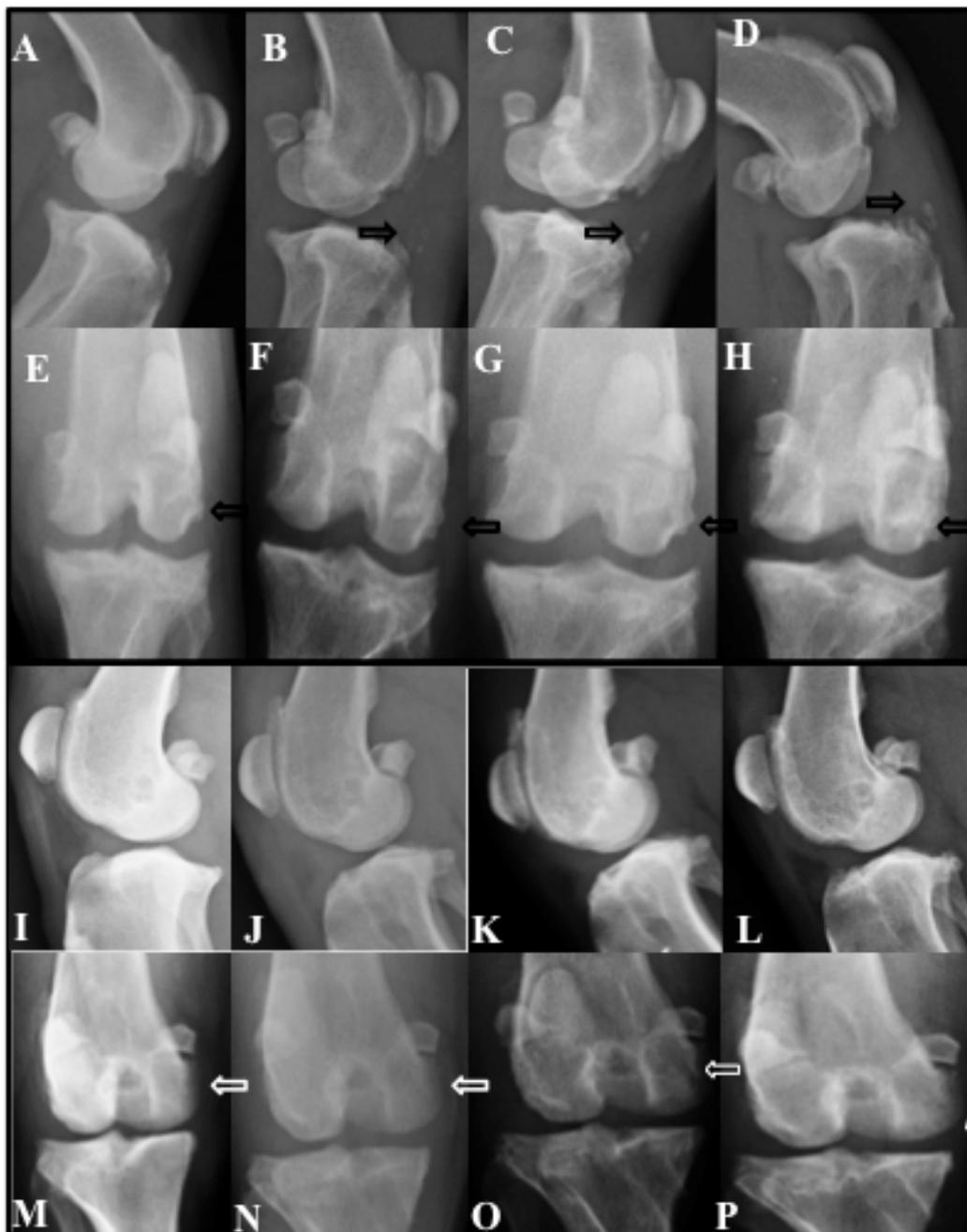
No grupo controle positivo, nenhum paciente apresentou mineralização articular durante o tempo de avaliação. Um dos pacientes (cão 7) apresentou osteofitose de pontuação 1 no pré-cirúrgico que se manteve até os 90 dias, e outro (cão 8), osteofitose de pontuação 1 no pré cirúrgico que evoluiu para grau 2 aos 30 dias, mantendo-se até o final do estudo (figura 9).

Em termos gerais os achados radiográficos do presente trabalho, se mostraram como o relatado por Harasen (2002), inespecíficos e inconsistentes e inevitavelmente menos graves do que os achados observados ao exame artroscópico. É pouco frequente encontrar, no cão, após tratamento de RLCCr, uma articulação fêmoro-tíbio-patelar sem evidência radiográfica de progressão da OA. No presente trabalho, no grupo tratado com CAP, quatro pacientes não apresentaram progressão radiográfica de OA, o que sugere que a injeção IA de CAP preveniu ou retardou a progressão das alterações, pelo menos até as 12 semanas do pós-cirúrgico. A mineralização articular verificada pode ser devida a RLCCr, uma vez que já estava presente no pré-operatório. Já no grupo controle positivo, um paciente mostrou progressão da OA no período de 0 a 30 dias. Nos demais não foram evidenciados sinais radiográficos de progressão da OA, neste período, fato que pode ser atribuído ao tratamento com medicamentos modificadores da OA, que tem efeito protetor da cartilagem articular e alívio dos sinais clínicos (Neil et al., 2005). Mas também, deve-se considerar que este grupo apresentou menor grau de lesões compatíveis com OA no pré-cirúrgico (tabela 16). Em quatro pacientes do grupo tratado com CAP, não se verificou

evidência radiográfica de progressão da OA, diferente do relatado por Heffron e Campbell (1979), Elkins et al. (1991), Vasseur e Berry (1992) que encontraram evidência radiográfica de OA a partir das quatro semanas do pós-operatório após emprego de técnicas cirúrgicas intra-capsulares, sem nenhum tratamento pós cirúrgico. Hurley et al. (2007) relataram evidência radiográfica de OA oito semanas após a realização de TPLO, mas só foram realizados dois exames radiográficos, um

antes do tratamento cirúrgico e outro oito semanas depois, pelo que não se descarta a possibilidade da presença dos mesmos antes da oitava semana. Muzzi et al., (2009) relataram animais com RLCCr experimental, apresentaram alterações compatíveis com OA às quatro semanas de pós-operatório após o emprego de auto enxerto de fâscia lata guiado por vídeo artroscopia. Estes achados sugerem o efeito benéfico do CAP descrito no presente trabalho.

Figura 7. Radiografias da articulação femoro-tibio-patelar de cães tratados com concentrado autólogo de plaquetas antes do tratamento cirúrgico, aos 30, 60 e 90 dias do pós cirúrgico, nas posições médio-lateral (A-D, I-L) e crânio-caudal (E-H, M-P).



A, E, I, M pre-cirúrgico (dia 0); B, F, J, N: 30 dias pós-cirúrgico; C, G, K, O: 60 dias pós-cirúrgico; D, H, L, P: 90 dias pós-cirúrgico. Seta a direita (→) Mineralização intra-articular. Seta a esquerda (←) osteofitose.

Figura 8. Radiografias da articulação femoro-tibio-patelar de cães do grupo controle positivo antes do tratamento cirúrgico, aos 30, 60 e 90 dias do pós cirúrgico, nas posições médio-lateral (A-D, I-L) e crânio-caudal (E-H, M-P).



A, E, I, M pre-cirúrgico (dia 0); B, F, J, N: 30 dias pós-cirúrgico; C, G, K, O: 60 dias pós-cirúrgico; D, H, L, P: 90 dias pós-cirúrgico. ← osteofitose.

Os resultados da avaliação da locomoção em plataforma de força no grupo tratado com CAP, quando se compara cada membro ao longo dos tempos, indicam aumento do  $Pf_z$  do membro acometido (A) a partir de 60 dias de pós-operatório, progredindo até alcançar um valor estatisticamente significativo ( $P<0,05$ ) aos 90 dias. O membro contralateral (B) apresentou o mesmo comportamento, mas com valores de  $Pf_z$  significativamente menores ( $P<0,05$ ) aos 90 dias de pós-operatório. Quando se comparou cada membro com o seu contralateral em cada dia de avaliação, encontrou-se diferença significativamente menor ( $P<0,01$ ) no membro acometido (A) durante os primeiros 60 dias de pós-operatório, mas os valores foram estatisticamente iguais no dia

90 do pós-cirúrgico. Os membros torácicos não apresentaram diferenças em nenhuma das análises durante o tempo de avaliação (tabela 18). Os resultados da locomoção na plataforma de força para o valor de  $If_z$  quando comparado cada membro ao longo dos tempos de avaliação indicam que os membros acometido (A) e contralateral (B) apresentavam o mesmo comportamento observado no  $Pf_z$ , tanto na avaliação ao longo do tempo quanto na comparação entre membros contralaterais. Os membros torácicos só apresentaram diferença no primeiro dia de avaliação (antes do tratamento cirúrgico). Neste momento o valor do membro ipsilateral (C) foi significativamente ( $P<0,01$ ) menor do que o membro contralateral torácico (D) (tabela 19)

Tabela 18. Média da distribuição percentual do pico de força vertical ( $Pf_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D). (média, erro padrão da média), dos animais tratados com concentrado autólogo de plaquetas

Membro	Dia			
	0	30	60	90
A	11,20 (2,93) A a	9,96 (1,88) A a	13,89 (1,25) AB a	16,97 (1,00) B a
B	22,42 (2,15) A b	21,93 (1,54) A b	20,67 (1,63) A b	17,67 (1,05) B a
C	33,11 (0,99) A a	33,92 (1,12) A a	32,40 (0,99) A a	32,79 (0,56) A a
D	33,27 (0,86) A a	34,20 (0,51) A a	33,03 (0,62) A a	32,58 (0,85) A a

Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P<0,05$ ) e minúsculas nas colunas diferem significativamente pelo teste t ( $P<0,01$ )

Tabela 19. Média da distribuição percentual do impulso vertical ( $If_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D). (média, erro padrão da média), dos animais tratados com concentrado autólogo de plaquetas

Membro	Dia			
	0	30	60	90
A	10,15 (2,57) A a	8,25 (1,22) A a	12,69 (1,12) AB a	16,66 (1,02) B a
B	20,21 (0,22) A b	20,16 (1,34) A b	20,03 (2,01) A b	17,52 (0,91) B a
C	31,99 (0,88) A a	33,43 (1,21) A a	33,04 (1,25) A a	31,66 (0,85) A a
D	37,64 (0,90) A b	38,17 (1,19) A a	34,24 (1,36) A a	34,17 (1,18) A a

Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P<0,05$ ) e minúsculas nas colunas diferem significativamente pelo teste t ( $P<0,01$ )

No grupo controle positivo, quando comparado cada membro ao longo dos tempos de avaliação da locomoção em plataforma de força verificou-se que tanto os valores de  $Pf_z$  quanto os valores de  $If_z$  não apresentaram diferenças (tabela 20). Já quando se comparou cada membro com o

seu contralateral só foram encontradas diferenças entre membro acometido (A) e contralateral (B) a partir do dia 30 do período pós-operatório. O valor de  $Pf_z$  e de  $If_z$  foi significativamente maior ( $P<0,01$ ) no membro contralateral (B) (tabela 21).

Tabela 20. Média da distribuição percentual do pico de força vertical ( $Pf_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D). (média, erro padrão da média), do grupo controle positivo

Membro	Dia			
	0	30	60	90
A	12,44 (2,19) A a	10,76 (1,50) A a	12,31 (0,84) A a	13,78 (0,42) A a
B	21,76 (1,84) A a	25,97 (2,29) A b	23,49 (1,36) A b	23,12 (1,62) A b
C	33,34 (0,93) A a	32,69 (1,60) A a	30,99 (2,27) A a	31,63 (1,02) A a
D	32,46 (0,95) A a	30,57 (2,52) A a	33,20 (1,49) A a	31,47 (1,08) A a

Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P<0,05$ ) e minúsculas nas colunas diferem significativamente pelo teste t ( $P<0,01$ )

Tabela 21. Média da distribuição percentual do impulso vertical ( $If_z$ ) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D). (média, erro padrão da média), do grupo controle positivo

Membro	Dia			
	0	30	60	90
A	11,05 (2,54) A a	10,05 (1,80) A a	11,10 (0,73) A a	12,41 (0,69) A a
B	21,90 (1,85) A a	25,09 (1,47) A b	22,30 (0,78) A b	22,40 (1,54) A b
C	31,57 (0,78) A a	32,01 (0,74) A a	30,41 (2,63) A a	30,32 (1,14) A a
D	35,49 (1,32) A a	32,85 (2,22) A a	36,19 (2,41) A a	34,88 (0,86) A a

Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas nas linhas diferem significativamente pelo teste SNK ( $P<0,05$ ) e minúsculas nas colunas diferem significativamente pelo teste t ( $P<0,01$ )

Quando se comparou entre grupos cada membro com o seu contralateral em cada tempo de avaliação, encontrou-se diferença entre o membro acometido (A) e contralateral (B) aos 90 dias do pós-cirúrgico. O valor de  $Pf_z$  e  $If_z$  foi

significativamente ( $P<0,01$ ) maior no grupo tratado com concentrado autólogo de plaquetas. Os membros torácicos não apresentaram diferenças nos tempos de avaliação (tabela 22).

Tabela 22. Média da distribuição percentual do pico de força vertical (Pf<sub>z</sub>) e impulso vertical (If<sub>z</sub>) para os membros: acometido (A), contralateral (B), ipsilateral (C), contralateral torácico (D). (média, erro padrão da média), do grupo tratado com CAP intra-articular e o grupo controle positivo, comparação entre membros contralaterais

	Dia	Pf <sub>z</sub>		If <sub>z</sub>	
		CAP	Controle positivo	CAP	Controle positivo
A	0	11,20 (2,93) a	12,44 (2,19) a	10,15 (2,57) a	11,05 (2,54) a
	30	9,96 (1,88) a	10,76 (1,50) a	8,25 (1,22) a	10,05 (1,80) a
	60	13,89 (1,25) a	12,31 (0,84) a	12,69 (1,12) a	11,10 (0,73) a
	90	16,97 (1,00) a	13,78 (0,42) b	16,66 (1,02) a	12,41 (0,69) b
B	0	22,42 (2,15) a	21,76 (1,84) a	20,21 (2,06) a	21,90 (1,85) a
	30	21,93 (1,54) a	25,97 (2,29) a	20,16 (1,34) a	25,09 (1,47) b
	60	20,67 (1,63) a	23,49 (1,36) a	20,03 (2,01) a	22,30 (0,78) a
	90	17,67 (1,05) a	23,12 (1,62) b	17,52 (0,91) a	22,40 (1,54) b
C	0	33,11 (0,99) a	33,34 (0,93) a	31,99 (0,88) a	31,57 (0,78) a
	30	33,92 (1,12) a	32,69 (1,60) a	33,43 (1,21) a	32,01 (0,74) a
	60	32,40 (0,99) a	30,99 (2,27) a	33,04 (1,25) a	30,41 (2,63) a
	90	32,79 (0,56) a	31,63 (1,02) a	31,66 (0,85) a	30,32 (1,14) a
D	0	33,27 (0,86) a	32,46 (0,95) a	37,64 (0,90) a	35,49 (1,32) a
	30	34,20 (0,51) a	30,57 (2,52) a	38,17 (1,19) a	32,85 (2,22) a
	60	33,03 (0,62) a	33,20 (1,49) a	34,24 (1,36) a	36,19 (2,41) a
	90	32,58 (0,85) a	31,47 (1,08) a	34,17 (1,18) a	34,82 (0,86) a

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste t (P<0,01)

A velocidade média de locomoção foi de 2,0 (±0,10) m/s no grupo tratado com CAP e de 1,83 (±0,15) m/s no grupo controle positivo. Não se encontrou correlação entre a velocidade e os parâmetros avaliados em cada dia de avaliação.

Os valores Pf<sub>z</sub> e If<sub>z</sub> do membro acometido (A) mostram que o grupo de pacientes tratados com CAP alcançou aos 90 dias, valores superiores às avaliações anteriores equiparando-se ao seu contralateral (B) (tabelas 18 e 19). O mesmo não aconteceu no grupo controle positivo, onde os valores foram semelhantes aos do dia 30 até ao final do estudo (tabela 20 e 21). Este fato foi observado também quando comparados os membros entre os dois grupos, onde o grupo tratado com CAP apresentou valores maiores de Pf<sub>z</sub> e If<sub>z</sub> para o membro acometido (A) e menores para o membro contralateral (B), fato não observado no grupo controle positivo (tabela 22). Isto demonstra que o grupo de pacientes tratado com CAP ao final do estudo apresentou

melhor desempenho na avaliação da locomoção em plataforma de força. As diferenças encontradas ao avaliar cada membro ao longo do tempo e ao comparar os membros contralaterais no grupo tratados com CAP e no grupo controle positivo, assim como as diferenças encontradas ao comparar cada membro por dia de avaliação entre grupos, podem ser devidas à ação do concentrado autólogo de plaquetas que são fonte de fatores de crescimento anabólicos como TGF-β<sub>1</sub>, PDGF, HGF e IGF-1, dentre outros (Sutter et al., 2004, Argüelles et al., 2006, Marinova-Mutafchieva et al., 2006). Fatores de crescimento como o TGF-β<sub>1</sub> possuem efeito anti-inflamatório e promovem a diferenciação de células tronco sinoviais em cartilagem (Pei et al., 2009). Estudos *in vitro* demonstraram que o CAP incrementa a produção de ácido hialurônico em sinoviócitos humanos (Anitua et al., 2007), além do efeito regulador dos macrófagos, neutrófilos e linfócitos presentes no CAP, sobre a cicatrização

(Park e Barbul, 2004). Segundo Aragon et al. (2007), o sulfato de condroitina, glucosamina, ácido ascórbico, colágeno e sulfato de manganês oferecem somente um moderado nível de conforto no tratamento da osteoartrose, provável razão da diferença entre os tratamentos. Segundo Muzzi et al. (2009), pacientes tratados com a mesma técnica, com ou sem fisioterapia pós-operatória, não melhoraram seus parâmetros cinéticos ao término de quatro meses, fato divergente dos achados no presente estudo, no qual se verificou evolução favorável dos pacientes tratados com CAP aos 60 dias.

Neste estudo, três mensurações válidas de cada membro permitiram obter médias representativas para avaliação na plataforma de força, diferente do citado por outros pesquisadores (Besancon et al., 2004; Mölsä et al., 2010; Voss et al., 2010). Eles relataram cinco medidas válidas, por membro, em cães sem alterações ortopédicas e previamente adestrados para se locomoverem na plataforma. Neste trabalho, tratou-se de pacientes clínicos sem adestramento prévio para caminhar na plataforma, com limitação de tempo para treiná-los, e pacientes que apresentavam dor intensa no membro acometido, o que dificultou ou impediu caminhadas para se obter cinco passadas válidas. Mas mesmo assim, a obtenção de três medições por membro permitiu obter dados confiáveis dos parâmetros avaliados, sem correlação alguma com a velocidade de deslocamento. Isto indica que três medições forneceram uma média confiável nas condições deste experimento.

Após avaliação histológica e testes de resistência biomecânica em modelos caninos (Murray et al., 2006; Murray et al., 2007a), caprinos (Spindler et al., 2009) e suínos (Murray et al., 2007b; Fleming et al., 2009; Joshi et al., 2009) os autores relatam o efeito biológico benéfico da resposta reparadora ao acrescentar CAP à estrutura

de colágeno no tratamento da RLCC. Os estudos levaram a conclusão de que a adição de CAP pode estimular a cicatrização do ligamento cruzado cranial. Mas, um outro estudo, num modelo suíno, concluiu que só a sutura do ligamento cruzado cranial rompido acompanhada de suplementação com CAP não foi efetiva para melhorar os parâmetros biomecânicos da reparação (Murray et al., 2009). A exemplo do citado na literatura, e com base nos resultados do presente estudo, acredita-se que aplicação de injeções intra-articulares de CAP como terapia adicional ao tratamento cirúrgico de RLCCr em cães, proporcione maior resistência do auto-enxerto e module a progressão da OA.

Os resultados observados com aplicação IA de três injeções de CAP com duas semanas de intervalo, são similares aos observados por Carmona et al. (2007), que relataram resultados clínicos satisfatórios ao tratar cavalos com osteoartrose, com o mesmo número e frequência de aplicações. Também coincidem com o verificado por Lyras et al. (2010) que observaram em coelhos, maior expressão de TGF- $\beta_1$  durante as primeiras duas semanas após o tratamento de ruptura do tendão calcâneo comum com CAP, tempo no qual a concentração deste fator de crescimento começa a diminuir. Isto sugere que os intervalos de aplicação utilizado no presente trabalho manteve os níveis altos de TGF- $\beta_1$  pelo menos durante as primeiras seis semanas de cicatrização.

Os resultados obtidos na plataforma de força nestes pacientes indicam o possível potencial do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) como alternativa biológica, versátil e econômica, como possibilidade terapêutica no tratamento da OA.

#### 4.4 Referências bibliográficas

- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A. T.; ZALDUENDO, M. M.; de la FUENTE, M.; AZOFRA, J.; ANDIA, I. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology*. v. 46, n. 12, p. 1769-1772, 2007.
- ARAGON, C. L.; HOFMEISTER, E. H.; BUDSBERG, S. C. Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. v. 230, n. 4, p. 514-521, 2007.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTÍNEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci*. v. 81, n. 2, p. 237-245, 2006.
- BEALE, B. S.; HULSE, D. A.; SCHULZ, K. S.; WHITNEY, W. O.; DOVAL, J. Small animal arthroscopy. Elsevier. Philadelphia, USA, p. 61, 152, 2003.
- BERTRAM, J.E.A.; RUINA, A. Multiple walking speed-frequency relations are predicted by constrained optimization. *J theor Biol*. v.209, n. 4, p.445-453, 2001.
- BESANCON, M. F.; CONZEMIUS, M. G.; EVANS, R. B.; RITTER, M. J. Distribution of vertical forces in the pads of Greyhounds and Labrador Retrievers during walking. *Am J Vet Res*. v. 65, n.11, p. 1497-1501, 2004.
- CARMONA, J. U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Scien*. v. 27, n. 4, p. 167-170, 2007.
- CARMONA, J. U.; PRADES, M.; ARGÜELLES, D. Concentrados autólogos de plaquetas como tratamiento de lesiones de tejidos blandos del aparato locomotor en caballos. *Arch Med Vet*, v. 41, n. 1, p. 77-82, 2009.
- CONZEMIUS, M. G.; EVANS, R. B.; BESANCON, M. F.; GORDON, W. J.; HORSTMAN, C. L.; HOEFLE, W. D.; NIEVES, M. A.; WAGNER, S. D. Effect of surgical technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. v. 226, n. 2, p. 232-236, 2005.
- ELKINS, A. D.; PECHMAN, R.; KEARNEY, M. T.; HERRON, M. A retrospective study evaluating the degree of degenerative joint disease in the stifle joint of dogs following surgical repair of anterior cruciate ligament rupture. *J Am Anim Hosp Assoc*. v.27, p.533-540, 1991.
- FILARDO, G.; KON, E.; BUDA, R.; TIMONCINI, A.; DI MARTINO, A.; CENACCHI, A.; FORNASARI, P. M.; GIANNINI, S.; MARCACCI, M. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. v. 19, n. 4., p. 528-535, 2011.
- FLEMING, B. C.; SPINDLER, K. P.; PALMER, M.; MAGARIAN, E.; MURRAY, M. M. Collagen-platelet composites improve the biomechanical properties of healing ACL grafts in a porcine model. *Am J Sports Med*. v. 37, n. 8, p. 1554-1563, 2009.
- HARASEN, G. Diagnosing rupture of the cranial cruciate ligament. *Can Vet J*. v. 43, n. 6., p. 475-476, 2002.
- HEFFRON, L.E.; CAMPBELL, J.R. Osteophyte formation in the canine stifle

joint following treatment for rupture of the cranial cruciate ligament. *J Small Anim Pract.* v.20, p.603-611, 1979.

HURLEY, C.R.; HAMMER, D.L.; SHOTT, S. Progression of radiographic evidence of osteoarthritis following tibial plateau leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate ligament rupture: 295 cases (2001–2005). *J Am Vet Med Assoc.* v.230, p.1674–1679, 2007.

INNES, J.F.; COSTELLO, M.; BARR, J.F.; RUDORF, H.; BARR, A.R.S. Radiographic progression of osteoarthritis of the canine stifle joint: a prospective study. *Vet Radiol Ultrasound.* v.45, n. 2, p.143–148, 2004.

JOHNSON, J. A.; AUSTIN, C.; BREUR, J. C. Incidence 222 of canine appendicular musculoskeletal disorders in 16 veterinary teaching hospitals from 1980 to 1989. *Vet Comp Orthop Traumatol.* v.7, n. 2, p. 56–69, 1994.

JOSHI, S. M.; MASTRANGELO, A. N.; MAGARIAN, E. M.; FLEMING, B. C.; MURRAY, M. M. Collagen-platelet composite enhances biomechanical and histologic healing of the porcine anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med.* v 37, n. 12, p. 2401-2410, 2009.

KATIC, N.; BOCKSTAHLER, B.A.; MUELLER, M.; PEHAM, C. Fourier analysis of vertical ground reaction forces in dogs with unilateral hind limb lameness caused by degenerative disease of the hip joint and in dogs without lameness. *Am J Vet Res.* v.70, n. 1, p.118–126, 2009.

KON, E.; BUDA, R.; FILARDO, G.; DI MARTINO, A.; TIMONCINI, A.; CENACCHI, A.; FORNASARI, P.M.; GIANNINI, S.; MARCACCI, M. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports*

*Traumatol Arthrosc.* v.18, n. 4, p.472-479, 2009.

LYRAS, D. N.; KAZAKOS, K.; TRYFONIDIS, M.; AGROGIANNIS, G.; BOTAITIS, S.; KOKKA, A.; DROSOS, G.; TILKERIDIS, K.; VERETTAS, D. Temporal and spatial expression of TGF-beta1 in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma. *Foot Ankle Surg.* v. 16, n. 3, p. 137-141, 2010.

MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; GABAY, C.; FUNA, K.; WILLIAMS, R. O. Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor-beta expression in the joint. *Clin Exp Immunol.* v. 46, n. 2, p. 287-293, 2006.

McILWRAITH, C.W.; FESSLER, J.F. Arthroscopy in the diagnosis of equine joint disease. *J Am Vet Med Assoc.* v.172, n. 3, p.263-268, 1978.

MÖLSÄ, S. H.; HIELM-BJÖRKMAN, A. K.; LAITINEN-VAPAAVUORI, O. M. Force platform analysis in clinically healthy Rottweilers: comparison with Labrador Retrievers. *Vet Surg.* v. 39, n. 6, p. 701-707, 2010.

MURRAY, M. M.; SPINDLER, K. P.; DEVIN, C.; SNYDER, B. S.; MULLER, J.; TAKAHASHI, M.; BALLARD, P.; NANNEY, L. B.; ZURAKOWSKI, D. Use of collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *J Orthop Res.* v. 24, n. 4, p. 820-830, 2006.

MURRAY, M. M.; SPINDLER, K. P.; BALLARD, P.; WELCH, T. P.; ZURAKOWSKI, D.; NANNEY, L. B. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet rich plasma

scaffold. *J Orthop Res.* v. 25, n. 8, p. 1007-1017, 2007a.

MURRAY, M. M.; SPINDLER, K. P.; ABREU, E.; MULLER, J. A.; NEDDER, A.; KELLY, M.; FRINO, J.; ZURAKOWSKY, D.; VALENZA, M.; SNYDER, B. D.; CONNOLLY, S. A. Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* v. 25, n. 1, p. 81-91, 2007b.

MURRAY, M. M.; PALMER, M.; ABREU, E.; SPINDLER, K. P.; ZURAKOWSKI, D.; FLEMING, B. D. Platelet-rich plasma alone is not sufficient to enhance suture repair of the ACL in skeletally immature animals: an in vivo study. *J Orthop Res.* v. 27, n. 5, p. 639-645, 2009.

MUZZI, L.A.L.; REZENDE, C.M.F.; MUZZI, R.A.L. Fisioterapia após substituição artroscópica do ligamento cruzado cranial em cães I - avaliação clínica, radiográfica e ultrassonográfica. *Arq Bras Med Vet Zootec.* v.61, p.805-814, 2009.

NEIL, K. M.; Caron, J. P.; Orth M. W. The role of glucosamine and chondroitin sulfate in treatment for and prevention of osteoarthritis in animals. *J Am Vet Med Assoc.* v. 226, n. 7, p. 1079-1088, 2005.

NEUMANN, S.; VIEFHUES, G. Intraartikuläre injektion von autologem thrombozytenkonzentrat bei der OCD. *Veterinärspiegel.* v.20, n. 1, p.22-26, 2010.

PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* v. 187, n. 5A, p. 11S-16S, 2004.

PEI, M.; CHEN, D.; LI, J.; LEI, W. Histone deacetylase 4 promotes TGF- $\beta_1$ -induced synovium-derived stem cell chondrogenesis

but inhibits chondrogenically differentiated stem cell hypertrophy. *Differentiation.* v. 78, n. 5, p. 260-268, 2009.

SPINDLER, K. P.; MURRAY, M. M.; CAREY, J. L.; ZURAKOWSKI, D.; FLEMING, B. C. The use of platelets to affect functional healing of an anterior cruciate ligament (ACL) autograft in a caprine ACL reconstruction model. *J Orthop Res.* v. 27, n. 5, p. 631-638, 2009.

SUTTER, W. W.; KANEPS, A. J.; BERTONE, A. L. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res.* v. 65, n. 7, p. 924-930, 2004.

VASSEUR, P.B.; BERRY, C.R. Progression of stifle osteoarthritis following reconstruction of the cranial cruciate ligament in 21 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* v.28, p.129-136, 1992.

VASSEUR, P.B. Stifle joint. In: SLATTER, D. Textbook of small animal surgery. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier. Philadelphia, USA, p.2090-2133, 2003.

VOSS, K.; GALEANDRO, L.; WIESTNER, T.; HAESSIG, M.; MONTAVON, P. M. Relationships of body weight, body size, subject velocity, and vertical ground reaction forces in trotting dogs. *Vet Surg.* v. 39, n. 7, p. 863-869, 2010.

## CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, os resultados obtidos permitem concluir que:

- Uma única centrifugação utilizando solução ACD-A como anticoagulante, permite obter CAP com número aceitável de plaquetas para utilização clínica como terapia regenerativa em cães e gatos
- No cão, a ativação dos CAP pode ser feita com gluconato de cálcio, cloreto de cálcio ou batroxobina, com os mesmo resultados.
- No cão o CAP é fonte importante de TGF- $\beta_1$ .
- No gato, a ativação dos CAP pode ser feita com gluconato de cálcio ou trombina bovina, com os mesmos resultados.
- O teste de ELISA humano para quantificação da concentração de PDGF-AB não é indicado para uso em cães e gatos.
- Nas lesões agudas a substância indicada para ativar CAP é o gluconato de cálcio 10%.
- O CAP é uma alternativa biológica, versátil e econômica, como possibilidade terapêutica no tratamento da OA.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Comparar a eficiência de concentração de plaquetas e fatores de crescimento com diferentes anticoagulantes, e com diferentes métodos para concentrar plaquetas.
- Realizar estudos duplo cego aleatórios e controlados, comparando o efeito terapêutico dos concentrados autólogos de plaquetas obtidos com diferentes anticoagulantes.
- Realizar pesquisas duplo cego aleatórias e controladas, com maior número de cães e grupos com o mesmo número de animais para demonstrar o potencial terapêutico desta substância como terapia pós-cirúrgica do tratamento cirúrgico de RLCCr em cães, e incluir avaliação artroscópica ao final do tempo de estudo, fato não permitido pelos proprietários.
- Realizar um estudo clínico em gatos.
- Avaliar o efeito terapêutico em outro tipo de lesões ortopédicas, e lesões de tecidos moles.
- Avaliação histológica do efeito do CAP nos tecidos da articulação.
- Avaliação microscópica e molecular do líquido sinovial em animais tratados com CAP.
- Avaliação de marcadores biológicos de anabolismo e catabolismo articular em animais com OA e tratados com CAP.
- Avaliação de diferentes dispositivos de liberação lenta, diferentes concentrações e tempos de liberação dos fatores de crescimento no CAP.