

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

PLASMA RICO EM PLAQUETAS: PADRONIZAÇÃO EM
EQUÍDEOS, CRIOPRESERVAÇÃO E EFEITO
TERAPÊUTICO NA DESMITE DO LIGAMENTO
SUPRAESPINHOSO DE EQUINOS

PRISCILA FANTINI

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2014

Priscila Fantini

PLASMA RICO EM PLAQUETAS: PADRONIZAÇÃO EM EQUÍDEOS,
CRIOPRESERVAÇÃO E EFEITO TERAPÊUTICO NA DESMITE DO LIGAMENTO
SUPRAESPINHOSO DE EQUINOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia

Orientadora: Profa Maristela Silveira Palhares

Comitê de orientação:

Profa Fabíola de Oliveira Paes Leme

Profa Renata de Pino Albuquerque Maranhão

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE ASSINATURAS

DEDICATÓRIA

À minha família, amigos e familiares que nessa longa caminhada, sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu uma vida abençoada e iluminada e que sempre me mostra que as coisas boas chegam.

A minha família que sempre está do meu lado, especialmente à minha mãe Vera que se sente orgulhosa por cada conquista minha. Minha irmã Viviane que comemora todos os momentos que vivo. Meu irmão William e meu pai Eder por acreditarem em mim.

A orientadora professora Maristela Silveira Palhares por aceitar novos desafios e me dar a oportunidade de trabalhar com o que escolhi.

A co-orientadora no exterior, professora Marta Prades Robles, da *Universitat Autònoma de Barcelona*, por compartilhar seu conhecimento e lições de vida, além da amizade que construímos.

A co-orientadora professora Fabíola de Oliveira Paes Leme, pela sua magia em ensinar, por transformar tantos problemas em soluções, por todas as correções sempre melhorando a tese e pela amizade construída.

A professora Renata de Pino Albuquerque Maranhão pela paciência em meio à guerra e pela luz no fim do túnel.

Ao professor Jorge Uriel Carmona, da *Universidad de Caldas*, por me apresentar o PRP, pela sua atenção em responder todos os emails e por compartilhar todo o seu conhecimento.

Aos amigos que fiz na Espanha Román Jiménez, Laura García, Karina Vilés, Gemma Souto, Jackeline Maldonado, Pilar Peres Alvite, Marina Argilés, pela maravilhosa companhia, pelos sorrisos que sempre nos acompanhavam e por permanecerem presentes mesmo à distância.

Ao Antoni Iborra, da *Universitat Autònoma de Barcelona* pelas análises de ELISA e apoio durante o período experimental na Espanha.

Aos estagiários e alunos que me ajudaram nos experimentos realizados na UFMG, em especial, Jéssica Guerra de Oliveira e Stéffany Oliveira.

As residentes e enfermeiros da clínica de Equídeos d HV – UFMG – Ana Luisa Miranda, Iolanda Gea Kassen, Jackeline Rezende, Patrícia Castro, Sebastião Alves e Isabel Vinagre, pela ajuda nos dias de experimento.

Aos irmãos acadêmicos e grandes amigos Filipe Moraghi Moreira, Isabel Roussoulières Soares, Luan Gavião Prado, Roberta Carvalho, Karen Medina Teixeira, pela amizade e companheirismo mesmo nos momentos mais difíceis, em que tudo está dando errado e parece que nunca vai acabar.

Ao Vicente Conceição Macedo, pela gentileza e cooperação em ceder o laboratório para a realização dos testes de agregometria, na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia – Hemominas.

As amigas Geane Maciel Pagliosa pelas horas de boas conversas, produtivas ou não e Letícia Leal, pelos momentos de boas risadas e conversas sérias.

Ao CNPq pela bolsa de estudos no país.

A CAPES pelo suporte financeiro para a realização do doutorado sanduíche na “Universitat Autònoma de Barcelona”.

A Escola de Veterinária da UFMG pela oportunidade de realização deste experimento que tanto me enriqueceu profissional e pessoalmente.

A *Universitat Autònoma de Barcelona* por abrir as portas em minha chegada e por continuarem abertas para quando queira voltar.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho, sejam com atitudes, gestos, palavras ou pensamentos, agradeço.

Aos cavalos, minha paixão e amor eterno, fonte de inspiração para tamanha dedicação.

E finalmente ao amor, o primeiro elo que nos une aos nossos sonhos e nos torna capazes de realizá-los.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

(Paulo Freire)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ORIGEM, FISIOLOGIA E FUNÇÕES DAS PLAQUETAS	16
2.2 FATORES DE CRESCIMENTO	19
2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE PLAQUETAS	20
2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).....	22
2.5 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DO PRP.....	24
2.6 SISTEMAS COMERCIAIS DE OBTENÇÃO DO PRP	26
2.7 TÉCNICAS DE ARMAZENAMENTO DO PRP	26
2.8 LOMBALGIA	27
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
4. CAPÍTULO I: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) UTILIZANDO SIMPLES CENTRIFUGADO	35
5. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA FECHADO DE TUBOS PARA A OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM EQUINOS	40
6. CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DO SIMPLES CENTRIFUGADO PARA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM JUMENTOS	50
7. CAPÍTULO IV: CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS	59
8. CAPÍTULO V: UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO TRATAMENTO DA DESMITE DO LIGAMENTO SUPRAESPINHOSO, EM EQUINOS	69
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
10. ANEXOS	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I:	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS - PRP UTILIZANDO SIMPLES CENTRIFUGADO	Página
Tabela 1:	Valores médios \pm desvio padrão das variáveis hematológicas em amostras de sangue total (EDTA) e no PRP (ACD), de equinos hípidos	38
CAPÍTULO II:	AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA FECHADO DE TUBOS PARA A OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS – PRP - EM EQUINOS.	
Tabela 1:	Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas em amostras de sangue total e PRP	46
Tabela 2:	Valores médios e desvio padrão de TGF- β 1 em amostras de PRP	46
CAPÍTULO III:	AVALIAÇÃO DO SIMPLES CENTRIFUGADO PARA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM JUMENTOS	
Tabela 1:	Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas nas amostras de sangue total (EDTA) e PRP (ACD) obtido por única centrifugação, em tubos convencionais	54
CAPÍTULO IV:	CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS	
Tabela 1:	Contagem manual de plaquetas no Plasma Rico em Plaquetas (PRP), em câmara de Neubauer (média \pm erro padrão)	62
Tabela 2:	Morfologia plaquetária no Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco, acrescidos de DMSO 3% ou 6%, resfriado lentamente e congelado a -196°C, (média \pm erro padrão)	62
Tabela 3:	Percentual máximo de agregação plaquetária, realizada utilizando ADP como agente agregante (média \pm erro padrão)	63
Tabela 4:	Percentual de redução da agregação plaquetária máxima inicial, considerando o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco como valor inicial, realizada na presença do ADP 10% como agente agregante.	63
CAPÍTULO V:	UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO TRATAMENTO DA DESMITE DO LIGAMENTO SUPRAESPINHOSO, EM EQUINOS	
Tabela 1:	Diferença de temperatura (máxima – mínima) da coluna,	

	obtida pela termografia na área que compreende a lesão no ligamento supraespinhoso (média \pm erro padrão)	73
Tabela 2:	Área total da lesão (cm ²), obtida pela ultrassonografia do ligamento supraespinhoso (média \pm erro padrão)	74

LISTA DE FIGURAS

		Página
REVISAO DE LITERATURA		
Figura 1:	Principais fatores de crescimento e citocinas presentes nos grânulos- α das plaquetas e seus efeitos biológicos	21
CAPÍTULO II:	AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA FECHADO DE TUBOS PARA A OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS – PRP - EM EQUINOS.	
Figura 1:	Sistema comercial fechado de tubos da Proteal®. Observa-se a agulha com filtro para a saída de ar (1A); transferência do sangue da seringa para o tubo multifuncional do sistema fechado de tubos (1B); obtenção do PRP pressionando a parte externa da seringa para baixo (1C); êmbolo do tubo multifuncional de formato côncavo (1D)	44
CAPÍTULO IV:	CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS	
Figura 1:	Esfregaço de PRP, corado em Panótico e avaliado em microscopia óptica, em aumento de 1000X. Observa-se plaqueta inativada, plaqueta alongada ou discóide (setas brancas curva); em estado incerto de ativação, plaqueta arredondada (setas brancas); ativada, observa-se presença de pseudópodes (setas pretas). (Adaptado de Wurzinger e Schmid-Shönbein (1990), para a microscopia óptica)	66
CAPÍTULO V:	UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO TRATAMENTO DA DESMITE DO LIGAMENTO SUPRAESPINHOSO, EM EQUINOS	
Figura 1:	Indução da lesão no ligamento supraespinhoso na região torácica, utilizando agulha para punção de medula óssea 11G (1A); termograma pela vista dorsal da coluna, apresentando temperatura superficial mínima e máxima na área selecionada (1B)	72
Figura 2:	Imagem ultrassonográfica do ligamento supraespinhoso. Observa-se: lesão hipoecóica sobre o ligamento supraespinhoso, sete dias após a indução, no grupo controle (2A); lesão hipoecóica no ligamento supraespinhoso, 21 dias após a indução lesão, no grupo controle (2B); ausência de leão após 35 dias de indução, e com 20 dias após 1ª aplicação do PRP (2C); lesão hipoecóica no ligamento supraespinhoso, 45 dias após indução da lesão e 30 dias após 2ª aplicação da solução fisiológica, no grupo controle (2D)	72

Figura 3:	<p>Porcentagem de animais com da lesão da coluna, de acordo com o dia após o início do tratamento. Setas: dia da aplicação do PRP ou solução salina 0,9%. LN_PR: lesão pré-existente e tratamento com PRP; LI_SF: lesão induzida e tratada com solução salina 0,9% (controle); LI_PRP lesão induzida e tratada com PRP. Dia 14: antes da primeira dose; Dia 21: sete dias após aplicação dose; Dia 28: 14 dias após a primeira aplicação da primeira dose e aplicação da segunda dose; Dia 35: sete dias após aplicação da segunda dose; Dia 42: 14 dias após aplicação da segunda dose.</p>	75
Figura 4:	<p>Área da lesão da coluna, em equinos, de acordo com o dia após o início do tratamento. Setas: dia da aplicação do PRP ou solução salina 0,9%. LN_PR: lesão pré-existente e tratamento com PRP; LI_SF: lesão induzida e tratada com solução salina 0,9% (controle); LI_PRP lesão induzida e tratada com Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Dia 14: antes da primeira dose; Dia 21: sete dias após aplicação dose; Dia 28: 14 dias após a primeira aplicação da primeira dose e aplicação da segunda dose; Dia 35: sete dias após aplicação da segunda dose; Dia 42: 14 dias após aplicação da segunda dose</p>	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

FC: fator de crescimento

G: gauge

g: gauss

MPC: componente plaquetário médio

MPM: massa plaquetária média

MPV: volume plaquetário médio

NEUT: neutrófilo

PCDW: amplitude de distribuição do componente plaquetário

PCT: plaquetócrito

PLT: plaquetas

PMDW: amplitude de distribuição da massa plaquetária

PPP: plasma pobre em plaquetas

PRF: fibrina rica em plaquetas

PRP: plasma rico em plaquetas

RBC: glóbulos vermelhos

WBC: glóbulos brancos

RESUMO

O potencial terapêutico do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), baixo custo e facilidade de obtenção, grande número de trabalhos vem desvendando sua importância na medicina regenerativa, porém muitas lacunas ainda estão abertas. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram: (1) padronizar nos equinos e jumentos um protocolo de preparo do PRP utilizando única centrifugação, recuperando o máximo de plaquetas e o mínimo de leucócitos possível; (2) validar um sistema comercial fechado para a obtenção do PRP, em equinos; (3) definir um sistema de criopreservação do PRP após resfriamento lento, em equinos; (4) avaliar o efeito terapêutico do PRP em desmiste do ligamento supraespinhoso, em equinos. Os protocolos utilizando simples centrifugado a baixa velocidade, foram eficazes em equinos e jumentos, para concentrar plaquetas, recuperar poucos leucócitos e apresentar níveis aceitáveis do fator de crescimento TGF- β 1. A criopreservação do PRP de equinos, utilizando DMSO a 3%, resfriado lento a 4-5°C, em curva controlada na taxa de -0,07°C/minuto e posteriormente congelado em nitrogênio líquido a -196°C apresentou menor percentual de ativação plaquetária avaliada pela microscopia óptica e manteve aproximadamente 35% do valor inicial de agregação plaquetária. Indica-se a terapia com PRP no tratamento da desmiste do ligamento supraespinhoso em equinos, por não apresentar efeitos adversos, acelerar em 5,85 vezes o tempo de resolução das lesões, diminuindo a área da lesão induzida, avaliada pela ultrassonografia. Os resultados encontrados reforçam a necessidade da continuidade de pesquisas na área.

Palavras-chave: equino, jumento, Plasma Rico em Plaquetas (PRP), criopreservação, lombalgia.

ABSTRACT

The therapeutic potential, its low cost and easiness of preparation, Platelet Rich Plasma (PRP) use in regenerative medicine has been unveiled by many studies. However, many gaps remain to be clarified regarding its therapeutic use. This study objectived to: (1) standardize a protocol to obtain equine PRP, using a single centrifugation step in order to recover a majority of the platelets and a minimal amount of leucocytes; (2) validate a closed commercial system for equine PRP obtainment; (3) define a cryopreservation system for equine PRP after slow refrigeration; (4) evaluate the therapeutic effects of PRP on desmopathy of the supraspinous ligament of equines. Protocols using low-speed simple centrifugation were most efficient concentrating platelets, recovering reduced amounts of leucocytes and presented with acceptable levels of TGF- β 1. Cryopreservation of equine PRP using 3% DMSO, slowly refrigerated to 4-5°C at a controlled rate of -0,07°C/minute, followed by freezing at liquid nitrogen (-196°C), presented a lower percentage of platelet activation when evaluated by optic microscopy, maintaining approximately 35% of the initial value of platelet aggregation. This study suggest the use of PRP for treating desmopathy of the supraspinous ligament of equines, given no adverse effect was observed, accelerating by 5.85 times the resolution time of lesions, reducing the area of the induced lesion, when evaluated by ultrasound. Results presented here support to further studies on the therapeutic application of PRP.

Keywords: equine, donkey, Platelet Rich Plasma (PRP), cryopreservation, back pain.

1 INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas, rico em fatores de crescimento (FC), o que lhe confere capacidade regenerativa sobre tecidos lesados (Anitua et al., 2012).

Na Medicina Veterinária, o PRP vem sendo utilizado em casos de osteoartrite (Carmona et al., 2007), no tratamento de lesões cutâneas (Carter et al., 2003), em tendinopatias (Argüelles et al., 2008; Maia, 2008), desmiste de suspensório (Argüelles et al., 2008), fraturas em cães (Silva et al., 2007), fraturas e lesões musculares (Carmona e López, 2011a) e laminite em equinos (Carmona et al., 2012), com resultados satisfatórios e promissores.

Atualmente, existe grande variedade de protocolos e sistemas comerciais (Marlovits et al., 2004; Castelijnns et al., 2011; Sundman et al., 2011) para a obtenção do PRP, o que resulta em diferentes composições, podendo levar a resultados insatisfatórios da aplicação terapêutica (Ehrenfest et al., 2007; Ehrenfest et al., 2009; Lei et al., 2009; Silva et al., 2011).

Algumas características que podem limitar o uso destes concentrados plaquetários estão relacionadas ao fato do tratamento envolver várias aplicações e a necessidade do preparo imediato no momento da aplicação. Uma alternativa plausível seria o armazenamento do PRP, mantendo viáveis as plaquetas e, portanto, seu efeito terapêutico.

Os objetivos deste estudo foram:

1. Padronizar nos equinos e jumentos um protocolo de preparo do PRP utilizando única centrifugação, recuperando o máximo de plaquetas e o mínimo de leucócitos possível;
2. Validar um sistema comercial fechado para a obtenção do PRP, em equinos;
3. Definir um sistema de criopreservação do PRP após resfriamento lento, em equinos;
4. Avaliar o efeito terapêutico do PRP em desmiste do ligamento supraespinhoso, em equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem, fisiologia e funções das plaquetas

Ainda que careçam de núcleo e possam ser definidas como fragmentos citoplasmáticos provenientes dos megacariócitos, as plaquetas possuem componentes estruturais, metabólicos e de sinalização, próprios de células nucleadas (Pereira, 1993). Os megacariócitos representam aproximadamente 0,1 a 0,5% das células nucleadas da medula óssea. Eles são derivados de células progenitoras mielóides multipotenciais CD34+ que residem no tecido hemopoiético na corrente sanguínea e na região mais profunda dos capilares sinusóides, além de emitirem prolongamentos citoplasmáticos (pró-plaquetas). Estes prolongamentos são seccionados e as plaquetas liberadas na corrente circulatória (Hartwig e Italiano, 2003).

As plaquetas de seres humanos circulam no sangue em formato de disco biconvexo (discócitos) de aproximadamente 3 a 4 μ m de diâmetro, 4 a 7 μ m³ de volume e 10pg de peso. Possuem carga elétrica negativa em sua superfície e estão em uma concentração sanguínea de 150 a 350 x 10⁶/mL, com vida média entre 7 a 10 dias (Klinger, 1996). As plaquetas dos equinos apresentam forma discóide, medindo aproximadamente 5 a 7 μ m de comprimento, largura inferior a 3 μ m, apresentam formato lentiforme e podem alcançar até 20 μ m de diâmetro

(Pereira, 1993; Feldman et al., 2000; Argüelles et al., 2006).

A membrana das plaquetas (PLT) é composta por três camadas:

- glicocálix (mais externa): esta membrana contém receptores glicoproteicos relacionados ao processo de ativação e adesão plaquetária. O glicocálix constitui os antígenos de membrana das plaquetas e se dividem em três famílias – integrinas, proteínas ricas em leucina e selectinas;
- bicamada fosfolipídica (central): apresenta distribuição assimétrica, sendo responsável pelas propriedades anticoagulantes;
- submembranosa: formada por microtúbulos de actina, atuando como um esqueleto que confere a forma discóide da PLT em repouso (Hale et al., 1996; Tablin, 2000).

No seu citoplasma as PLT contêm actina, atuando como suporte estrutural para diferentes grânulos e mitocôndria e os microtúbulos, mantendo a forma discóide das PLT a partir dos movimentos gerados pela polimerização do complexo actina-miosina (Hartwig e Italiano, 2003). Três tipos de grânulos estão presentes no citoplasma das PLT dos mamíferos:

- lisossomal: contém hidrolases ácidas, guanina, fosfolipases e quinases, que atuam como enzimas proteolíticas e hidrolíticas (Tablin, 2000; Lalko et al., 2003);
- denso: contém componentes de baixo peso molecular que regulam a agregação (Lalko et al., 2003) como a adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio,

fósforo, serotonina e catecolamina. O ADP induz a migração plaquetária e combinado com a serotonina produz a contração de artérias lesionadas. O ATP antagoniza a ação do ADP (Pelagalli et al., 2002);

- alfa (α): contém proteínas reguladoras de numerosos processos biológicos, incluindo adesão, agregação, coagulação, quimiotaxia, proliferação e inflamação (Lalko et al., 2003). São organelas secretoras que possuem compartimentalização e várias moléculas como citocinas, quimiocinas, FC, fator plaquetário 4, tromboglobulina, albumina, condroitina, fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator V, fator Va e fator Von Willebrand (Mannaioni et al., 1997; Anitua et al., 2004). Essas proteínas são importantes para as funções plaquetárias, como formação de trombos, modulação da inflamação e síntese de matriz extracelular.

Assim como as demais células do organismo, as plaquetas sofrem envelhecimento e são removidas por apoptose após a perda da assimetria dos fosfolípidios. Durante seu envelhecimento na circulação, as plaquetas sofrem uma série de alterações físicas, bioquímicas e funcionais, o que determina em grande parte sua heterogeneidade (Hale et al., 1996; Pereira, 2008).

As plaquetas desempenham diversas funções no organismo dos mamíferos. São responsáveis pelo processo de hemostasia primária, em que secretam o conteúdo dos seus grânulos e interagem com outras plaquetas, além de serem capazes de sintetizar e expressar fatores teciduais funcionais, despertando grande interesse como terapia celular (Pereira, 2008).

Normalmente, as plaquetas encontram-se em seu estado inativo e podem ser ativadas por agentes fisiológicos (exemplos: serotonina, epinefrina, trombina, adenosina difosfato, tromboxano, colágeno) ou farmacológicos (cloreto de cálcio, ionóforo de cálcio) (Carmona et al., 2007). Após a ativação, emitem pseudópodes desencadeando a agregação e a liberação dos grânulos que contém os FC. Como o efeito regenerador das plaquetas depende do nível de FC liberados pelas mesmas, a viabilidade das plaquetas é crucial para se alcançar o efeito terapêutico com os concentrados de plaquetas (Lei et al., 2009).

A P-Selectina é a principal molécula de adesão das plaquetas e megacariócitos e está presente na superfície dos grânulos- α que interatuam com fibrinogênio, fator Von Willebrand, fibronectina e vitronectina (Mannaioni et al., 1997; Pelagalli et al., 2003). Lalko et al. (2003) investigaram as propriedades fenotípicas e morfológicas das plaquetas de equinos quando ativadas, com foco na expressão da P-Selectina (CD62P). Estes autores partiram do pressuposto que a expressão da P-Selectina em equinos se assemelha como nos seres humanos, em que apresentam menos de 5% expressas na ausência de ativação agonista. Porém, observaram que a P-selectina, está constitutivamente expressa em 20-25% de plaquetas em repouso, nos equinos. Este nível de base elevado da expressão de P-Selectina pode sugerir que elas também estão preparadas para a adesão de leucócitos, podendo ser ativadas por estes, possivelmente resultando em condições pró-trombóticas. Este fenômeno poderia ser de relevância clínica significativa, pela possibilidade de estar relacionado com a rápida piora clínica, muitas vezes observada em equinos com cólica e endotoxemia, em que lesão vascular e complicações trombóticas comprometem a taxa de sobrevivência do paciente. A ativação plaquetária em equinos está bem relatada após exercícios (Weiss et al., 1998;

Kingston et al., 1999), em potros septicêmicos, em casos de laminite e em outras situações envolvendo endotoxemia e gastroenteropatias agudas com o risco de coagulação intravascular disseminada (Evans, 1992; Dolente et al., 2002).

A grande variabilidade no tamanho das plaquetas, somada à rápida capacidade de alterar sua forma e tendência a aglutinar-se *in vitro*, mais que qualquer outra célula sanguínea, torna a contagem de plaquetas em contadores tradicionais, pouco confiável. Contadores de células tradicionais que utilizam impedância ou espalhamento de luz contribuem para resultados relativamente falhos. O analisador hematológico automático ADVIA 120 ¹ utiliza simultaneamente medidas de volume e densidade ou índice de refração das plaquetas, célula-a-célula, com dois ângulos de dispersão de luz laser, sendo mais confiável para a obtenção precisa do número de plaquetas, permitindo melhor discriminação entre as plaquetas de todos os tamanhos e outras partículas (Kunicka, 2000). O ADVIA 120 ¹ permite contagem mais precisa de plaquetas que os analisadores hematológicos convencionais automatizados e fornecem novos parâmetros, incluindo componente médio plaquetário (MPC), amplitude de distribuição do componente médio plaquetário (MPCDW), massa média plaquetária (MPM), volume médio plaquetário (MPV), plaquetócrito (PCT), amplitude de distribuição de plaquetas (PDW), amplitude de distribuição da massa plaquetária (PMDW), macro plaquetas e agregados (Ifiran et al., 2005).

A determinação do MPC foi proposta como um parâmetro de rastreio válido para avaliação da ativação das plaquetas (Macey et al., 1999; Segura et al., 2007). Este parâmetro representa o índice médio de refração e pode ser obtido de forma simples e rápida pela citometria de fluxo. Uma

¹ Bayer Corporation, Pittsburg, United States

relação linear foi demonstrada entre a densidade das plaquetas e o grau de ativação, sendo que o valor é reduzido quando as plaquetas degranulam, o que indica a ativação (Ifran et al., 2005). O MPC foi avaliado em cães (Moritz et al., 2003; Moritz et al., 2005) e gatos (Zelmanovic e Hetherington, 1998) e mostrou valores inversamente proporcionais à expressão de P-selectina. A combinação de P-selectina e MPC são eficazes para detectar a ativação de plaquetas em cães (Moritz et al., 2005). Em um estudo sobre as propriedades morfológicas e fenotípicas da ativação das plaquetas equina, centrado na expressão de P-selectina (CD62), observou-se 20-25% das plaquetas em repouso com expressão constitutiva de P-selectina. Atribui-se este achado, a estímulos prévios, mediado pela interação plaquetas-leucócitos, o que dificulta a avaliação da ativação por este marcador em equinos (Lalko et al., 2003). Segura et al. (2007) avaliaram potros e cavalos adultos com coagulação intravascular disseminada (condição que ativa as plaquetas) e observaram que o MPC poderia ser usado como um indicador de doenças inflamatórias, no entanto, mais estudos são necessários.

2.2 Fatores de crescimento

Os FC são peptídeos sinalizadores contidos nos grânulos- α das plaquetas e são as moléculas de maior interesse terapêutico. Os FC são produzidos pelos megacariócitos e sua liberação ocorre quando há a ativação das plaquetas, sendo o fator de crescimento transformante (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) predominantes (Textor, 2011).

Suas propriedades incluem modulação da inflamação, aumento da capacidade regenerativa dos tecidos, como regeneração óssea (Silva e Sampaio, 2009), reparação e maturação dos tecidos moles, indução de quimiotaxia, neovascularização, deposição de matriz celular, proliferação e

diferenciação celular (Anitua et al., 2004; Argüelles et al., 2006; Everts, 2006; Oleza, 2009).

Além dos efeitos anabólicos, os FC inibem as citocinas catabólicas que degradam a matriz extracelular. Dentre os de maior interesse, cita-se: o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (FGF), fator de crescimento derivado de insulina I (IGF-I), proteína morfogenética óssea - 2 (BMP-2), fator de crescimento hepatócito (HGF) e fator de crescimento diferenciador (GDF) (Oleza, 2009). O comportamento de distintos fatores de crescimento tem sido avaliado em diferentes biomateriais (Jann et al., 2004). Os principais FC e citocinas contidas nos grânulos- α e seus efeitos biológicos estão dispostos na Fig.1.

De acordo com Marx (2004) e Pietrzak e Eppley (2005), os FC são ativamente secretados dos grânulos alfa durante os primeiros 10 minutos após ocorrer a ativação plaquetária e mais de 95% de fatores pré-sintetizados são liberados na primeira hora (Kevy e Jacobson, 2001). Portanto, recomenda-se o uso imediato do PRP após o seu preparo, sendo de oito horas o tempo máximo para a sua utilização (Marx, 2004).

O interesse pelo TGF- β 1 começou quando foi demonstrado o seu valor terapêutico no tratamento de feridas crônicas (Anitua et al., 2004). Este FC é encontrado de forma abundante nas plaquetas e também está presente no tecido ósseo. Possui amplo espectro de ação, se caracterizando por atuar como regulador multifuncional da atividade celular e afetar a maioria dos aspectos da reparação tecidual após sua ativação (Anitua et al., 2004). É o agente mais poderoso dentre as citocinas (Ehrenfest et al., 2006) e, por isso, é

considerado como sentinela, refletindo o aumento da concentração dos outros FC (Visser et al., 2009). O TGF- β 1 estimula a síntese de colágeno tipo I, fibronectina, glicosaminoglicanos (Carmona et al., 2009) e a quimiotaxia de monócitos (Montenero et al., 2002; Galvez-Gastélum et al., 2004), a qual promove indiretamente angiogênese por meio dos macrófagos e motilidade celular (Anitua et al., 2004; Galvez-Gastélum et al., 2004). Além disso, promove a proliferação de miofibroblastos fazendo com que haja boa contração da ferida, melhorando a cicatrização ao tracionar a matriz extracelular, orientando as fibras de colágeno. Possui, ainda, a propriedade de diminuir a síntese de metaloproteinases e do fator ativador de plasminogênio, que degradam a matriz extracelular (Montenero et al., 2002; Reyes et al., 2004). É considerado um potente regulador da inflamação (Argüelles et al., 2006; Ehrenfest et al., 2006; Carmona et al., 2009) e agente analgésico, uma vez que inibe a expressão de fatores nucleares e bloqueia a ação de metabólitos proinflamatórios (Argüelles et al., 2006; Carmona et al., 2009). Estudos *in vivo* com TGF- β 1 exógeno confirmam o aumento da granulação dos tecidos e a resistência tensil quando utilizado via tópica em feridas em modelo animal (Carter et al., 2003).

Por todas estas características o uso de componentes ricos em plaquetas tem sido proposto como agente essencial para acelerar o processo de cicatrização de feridas e estimular a capacidade regenerativa dos tecidos afetados (Carmona, 2006).

2.3 Classificação dos concentrados de plaquetas

Apesar de recente e promissor, o uso dos concentrados de plaquetas, várias técnicas estão descritas na literatura sem a definição de um método padrão. Atribui-se a esta controvérsia, o método de obtenção dos concentrados que leva a produtos biologicamente diferentes em relação ao seu conteúdo e, conseqüentemente, potencial terapêutico (Ehrenfest et al., 2009).

Três parâmetros principais são necessários para a classificação dos concentrados plaquetários, sendo eles relacionados à centrifugação e ao sistema comercial, ao conteúdo do concentrado e à rede de fibrina. O primeiro define as características práticas de cada técnica, como tempo de duração do procedimento, custo, ergonomia, risco, reprodutibilidade e complexidade do sistema comercial. O segundo define a base farmacológica e o potencial para a sua aplicação, considerando-se volume final, recuperação de plaquetas e leucócitos, bem como sua preservação durante todo o processo. E aqueles relacionados à rede de fibrina, define a densidade da malha de fibrina, determinada pela quantidade de fibrinogênio e o processo de polimerização da fibrina. A maioria dos protocolos leva a um gel de fibrina de baixa densidade, o qual permite determinadas aplicações, mas perde o valor como malha de fibrina para dar suporte à matriz. Em contraste, com a malha de fibrina de alta densidade as plaquetas podem ser consideradas um biomaterial e a própria matriz de fibrina pode apresentar efeito cicatrizante (Choukroun et al., 2006).

Fator de crescimento	Fonte	Efeitos biológicos	Referências
TGF- β (β 1, β 2, β 3)	PLT, matriz óssea e cartilaginosa, linfócitos T, célula natural killer, macrófagos, monócitos e neutrófilos.	Regula a expressão de colágeno e fibronectina; estimula proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; diminui degradação da matriz extracelular; promove síntese de TIMP's e do fator de crescimento de fibroblasto e diminui expressão das MMP's; estimula quimiotaxia e angiogênese; inibe proliferação de macrófagos e linfócitos.	Huang e Huang (2005).
PDGF (-AA, -BB, -AB, -CC e -DD).	PLT, osteoblastos, células endoteliais, macrófagos, monócitos e células musculares lisas.	Estimula quimiotaxia, síntese de colágeno, mitogênese em fibroblastos, angiogênese, expressão de MMP-1 e TIMP-1.	Pierce et al. (1991); Nimmi (1997); Theoret, (2005)
EGF	PLT, macrófagos e monócitos.	Induz proliferação celular, diferenciação, motilidade e expressão de MMP-1; promove reepitelização; regula a troca de colágeno tipo I; estimula quimiotaxia endotelial, angiogênese, mitogênese epitelial e mesenquimal.	Wang, (1996); Nimmi, (1997); Calvin (1998); Rosier et al. (1998).
VEGF (-B, -C, -D)	PLT e células endoteliais	Promove vascularização, aumenta permeabilidade; atua sobre a proliferação de células do endotélio vascular.	Nimmi (1997); Ferrara, (2001); Theoret (2005).
IGF (-I, -II)	PLT	Peptídeo anabólico que estimula as células mesenquimais e epiteliais a migrarem, dividirem e aumentarem a síntese de colágeno e matriz extracelular.	Frisbie et al. (2000).
HGF	PLT e hepatócitos	Peptídeo de efeito angiogênico; estimula a expressão do VEGF.	Anitua et al. (2005).
FGF (-1, -2, -4, -7, -9, -10, -19)	PLT, macrófagos, célula mesenquimal, condrócito e osteoblasto	Promove proliferação e diferenciação de condrócitos; mitogênico para células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos; proteína angiogênica, controla deposição de matriz extracelular inibindo a síntese de colágeno tipo I.	Nimmi (1997); Rosier et al. (1998); Theoret, (2005).

Figura 1: Principais fatores de crescimento e citocinas presentes nos grânulos- α das plaquetas e seus efeitos biológicos. PLT, plaquetas; TGF- β , fator de crescimento transformante – β ; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; EGF, fator de crescimento epidérmico; VEGF, fator de crescimento endotélio vascular, MMP, metaloproteínas de matriz; TIMP, inibidor tissular de metaloproteínas; IGF, fator de crescimento insulínico; HGF, fator de crescimento de hepatócito; FGF, fator de crescimento de fibroblasto.

Três parâmetros principais são necessários para a classificação dos concentrados plaquetários, sendo eles relacionados à centrifugação e ao sistema comercial, ao conteúdo do concentrado e à rede de fibrina. O primeiro define as características práticas de cada técnica, como tempo de duração do procedimento, custo, ergonomia, risco, reprodutibilidade e complexidade do sistema comercial. O segundo define a base farmacológica e o potencial para a sua aplicação, considerando-se volume final, recuperação de plaquetas e leucócitos, bem como sua preservação durante todo o processo. E aqueles relacionados à rede de fibrina, define a densidade da malha de fibrina, determinada pela quantidade de fibrinogênio e o processo de polimerização da fibrina. A maioria dos protocolos leva a um gel de fibrina de baixa densidade, o qual permite determinadas aplicações, mas perde o valor como malha de fibrina para dar suporte à matriz. Em contraste, com a malha de fibrina de alta densidade as plaquetas podem ser consideradas um biomaterial e a própria matriz de fibrina pode apresentar efeito cicatrizante (Choukroun et al., 2006).

Utilizando os três parâmetros descritos, Ehrenfest et al. (2009) classificaram os concentrados de plaquetas em quatro categorias, dependendo da composição em leucócito e fibrina, sendo:

- plasma rico em plaquetas puro (P-PRP);
- plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP);
- fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF);
- fibrina rica em plaqueta e leucócitos (L-PRF).

O P-PRP apresenta aumento na contagem de plaquetas de 1,3 a 4 vezes quando comparado ao valor no sangue total, e 0,5 a 2 vezes mais leucócitos. O L-PRP por sua

vez contém mais plaquetas que o P-PRP, variando em aproximadamente cinco vezes mais plaquetas e três vezes mais leucócitos quando comparado ao sangue total (Ehrenfest et al., 2009; Carmona et al., 2013).

Quando ocorre a ativação dos concentrados plaquetários, seja pela adição de trombina ou cloreto de cálcio, ocorre a polimerização da fibrina e este preparado passa a ser conhecido como gel de plaquetas. Este gel quando originário do P-PRP, é denominado gel rico em plaquetas puro (P-PRG) e quando originário do L-PRP é denominado gel rico em plaquetas e leucócitos (L-PRG) (Carmona et al., 2013).

2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O PRP é um concentrado de plaquetas que acelera o processo de cicatrização e estimula a capacidade regenerativa dos tecidos (Anitua et al., 2004; Bosch et al., 2010). Apresenta efeito analgésico, como possível resultado da liberação de serotonina e catecolamina presentes nos grânulos densos (Xu et al., 2011). Apresenta composição complexa, pois além de plaquetas, contém alguns eritrócitos, leucócitos, células mesenquimais circulantes e proteínas séricas, como fibrina, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e trombopodina, importantes no processo de cicatrização. Trata-se de um método econômico para obter e administrar simultaneamente, diversos FC (Oleza, 2009).

Tem sido utilizado em reconstrução alvéolo-maxilar (Thor et al., 2007), em cirurgias plásticas, cirurgias ortopédicas e na medicina desportiva, no tratamento de lesões tendíneas (Anitua et al., 2006). São encontrados na literatura outros relatos clínicos como: associação com enxertos e implantes, na cicatrização de feridas, como carreador de fármacos (González-Lagunas, 2006), no tratamento de úlceras gástricas,

cutâneas crônicas, corneais e na regeneração de nervos (Anitua et al., 2007).

Na Medicina Veterinária, a terapia com o concentrado de plaquetas foi utilizada em estudo preliminar, em quatro casos de osteoartrite (articulação femorotibial, metacarpofalangeana, tarsocrural e talocalcâneo-central-calcâneoquartal), observando melhora no grau de claudicação e redução na efusão articular (Carmona et al., 2007) e na forma de gel para tratar lesões cutâneas experimentais (Carter et al., 2003). Em outro estudo realizado por Argüelles et al. (2008), o concentrado de plaquetas foi utilizado em dois equinos com tendinopatia no tendão flexor digital superficial e estes animais apresentaram melhora clínica e ultrassonográfica, e em outros três animais com desmite do ligamento suspensório, foi observada melhora na claudicação.

Em estudos *in vitro* com fragmentos do tendão do músculo flexor digital superficial de equinos, foi observada a eficiência do PRP, com concentração média de 395.000 plaquetas/ μ L, com efeitos anabólicos sobre a síntese da matriz tendínea, quando comparado com produtos pobre em plaquetas (Schnabel et al., 2007). Em outro estudo com cultivos de explantes de tendões do músculo flexor digital superficial, foi observado que o PRP, em comparação com aspirados de medula óssea, apresentou melhor efeito anabólico, melhor relação de colágeno tipo I em relação ao colágeno tipo III e menor expressão de metaloproteinases, como consequência provável de um maior aporte do TGF- β e do PDGF e um menor número de leucócitos no preparado (McCarrel e Fortier, 2009).

Ainda são poucos os estudos controlados utilizando estes compostos ricos em plaquetas em região toracolombar e nenhum trabalho foi encontrado utilizando-se a espécie equina. Akeda et al. (2006), estudando disco intervertebral de suínos *in vitro*, observaram a eficácia do PRP na

estimulação da proliferação celular, bem como no metabolismo da matriz extracelular. Assim pode ser útil como suplemento de cultura de tecidos para a engenharia de tecidos ou para a reparação biológica do disco intervertebral. Os resultados deste estudo fornecem evidência preliminar para a possível utilização clínica do PRP para o reparo de disco intervertebral, porém, novos estudos são necessários para confirmar a eficácia e a reprodutibilidade do PRP e sua aplicabilidade no animal vivo.

Nagae et al. (2007) também realizando estudo *in vitro* com PRP em degeneração do disco intervertebral induzida em coelhos, observaram que a associação do PRP com microesferas de gelatina de hidrogel promove supressão do processo degenerativo, além de intensa imunomarcção de proteoglicanos no núcleo pulposo e na camada interior do anel fibroso, em comparação com o uso isolado do PRP e das microesferas de gelatina de hidrogel.

A técnica utilizada na Medicina Veterinária, para obtenção do PRP vem sendo baseada na técnica utilizada em seres humanos (Carter et al., 2003; Sutter et al., 2004; Barbosa et al., 2006; Carmona, 2006; Carmona et al., 2007; Schnabel et al., 2007; Argüelles et al., 2008). Por ser autólogo, não existe risco de transmissão de enfermidades infecciosas ou rejeição. Esse componente pode ser obtido mediante uma ou duas centrifugações, entre 200 e 2000g, durante três a cinco minutos, com tempo total para o preparo entre 20 e 30 minutos (Oleza, 2009). O concentrado de plaquetas, por sua vez, é preparado a partir da centrifugação do plasma rico em plaquetas, sendo utilizada uma força gravitacional mais alta (entre 2000 e 6000g, durante dois minutos e meio a seis minutos), dependendo da força anteriormente utilizada (Barbosa et al., 2006; Carmona et al., 2007; Pagliosa e Alves, 2007; Maia, 2008).

Pagliosa e Alves (2007) ressaltaram que, embora haja resultados contraditórios no uso do PRP como fonte de FC, é evidente o potencial de seu uso como estimulador na osteogênese em focos de fraturas. No entanto, é necessária a padronização na obtenção e no emprego desse material, já que a técnica de produção é relativamente simples e de baixo custo.

O primeiro passo antes do uso experimental ou clínico de um concentrado de plaquetas é conhecer o perfil celular e dos FC. Fatores intrínsecos como raça, sexo e idade podem influenciar a composição celular e molecular destes compostos, bem como fatores extrínsecos envolvidos na preparação (Giraldo et al., 2013).

Os vários sistemas utilizados para a obtenção do PRP, incluso o tipo de anticoagulante utilizado, resultam em produtos distintos em sua composição final, variando desde a cor, volume até a composição de plaquetas, leucócitos, FC e outros tipos de células, o que pode gerar resultados indesejáveis (Ehrenfest et al., 2007; Ehrenfest et al., 2009; Lei et al., 2009; Silva et al., 2011). Foi demonstrado que concentrações de leucócitos têm correlação positiva para a expressão gênica de catabolismo e negativa para a expressão gênica da matriz, em tendões e ligamentos (Sundman et al., 2011). Os leucócitos ainda contêm citocinas ativas, capazes de exacerbar a resposta inflamatória e degradar a matriz do tecido (Kisiday et al., 2012).

A viabilidade das plaquetas é crucial para o efeito regenerador do PRP, pois elas irão liberar os FC. Portanto, se as plaquetas são ativadas durante o processo de produção de PRP, os FC são liberados para o plasma e a maioria descartados durante o preparo, o que conseqüentemente diminui a eficácia do PRP (Lei et al., 2009). Por conseguinte, menor ativação das plaquetas e maior retenção dos FC são a chave para melhorar o potencial terapêutico regenerativo do PRP. A quantidade ideal de plaquetas a ser

injetada numa lesão, ainda não foi definida, podendo variar conforme o tipo de tecido e o número de receptores disponíveis para os FC, uma vez que o excesso de plaquetas pode induzir um “feedback” negativo. No entanto, poucos estudos compararam o efeito do PRP na regeneração da lesão, com a concentração de plaquetas (DeLong et al., 2011), especialmente em Medicina Veterinária. Um estudo avaliando o efeito anabólico e catabólico, em diferentes composições, sugeriu que concentrações elevadas de plaquetas obtidas por centrifugação dupla, provocou um efeito pró-inflamatório, resultando numa síntese diminuída da matriz extracelular (Kisiday et al., 2012).

Também de grande importância é a escolha do anticoagulante que ajuda a inibir a ativação espontânea de plaquetas (Pignatelli et al., 1996; Macey et al., 2002). Em estudo de PRP em seres humanos, os autores concluíram que a qualidade do PRP é dependente da viabilidade das plaquetas, e está intimamente relacionada ao tipo de anticoagulante utilizado. A microestrutura das plaquetas coletadas em heparina, ácido citrato dextrose (ACD) e citrato de teofilina-adenosina-dipiridamol (LCAT) foi avaliada e observou-se que o ACD foi melhor do que o citrato e a heparina de sódio para a produção de PRP melhor qualidade, mantendo a integridade, das estruturas, das plaquetas e prevenindo a ativação espontânea (Lei et al., 2009). No entanto, não houve correlação entre o número de plaquetas e efeito regenerador, mas a chave para o tratamento bem sucedido com PRP está associada com a utilização de plaquetas viáveis e sem ativação (Marx, 2004; Carmona e López, 2011b; Silva et al., 2011).

2.5 Técnicas de obtenção do PRP

Todas as técnicas para a obtenção de PRP têm em comum a coleta de sangue total com anticoagulante e seu processamento

imediatamente, por centrifugação (Ehrenfest et al., 2009).

O PRP pode ser obtido pelo sistema de aférese (Marx et al., 1998), pelo *buffy coat* (Zimmermann et al., 2001), pelo sistema de filtros (Castelijns et al., 2011), pelo sistema de dupla seringa (Rindermann et al., 2010) e pelo sistema de tubos (Argüelles et al., 2006; Tamimi et al., 2007).

O sistema de tubos é o mais econômico e não exige equipamentos para a obtenção do produto, permitindo a obtenção do PRP de forma segura (Argüelles et al., 2006). Estes mesmos autores compararam o método de tubo com simples e duplo centrifugado e observaram concentrações de plaquetas de 45% e 71% superiores ao valor inicial, respectivamente, mas também concentraram mais leucócitos.

Dentro de cada sistema, existem diversos protocolos de obtenção de PRP, sendo que o método clássico é o manual, utilizando dupla centrifugação. Basicamente o objetivo da primeira centrifugação, em baixa velocidade, é separar o sangue em três camadas, sendo, células vermelhas, *buffy coat* (rico em plaquetas e leucócitos) e o plasma sobrenadante (Ehrenfest et al., 2009). A segunda centrifugação, em velocidade mais alta, objetiva descartar as células vermelhas e o sobrenadante pobre em plaquetas (Ehrenfest et al., 2009).

Diante de tantos protocolos para a obtenção de PRP na medicina equina, Vendruscolo et al. (2012) testaram 10 protocolos diferentes de centrifugação, sendo todos com dupla centrifugação. Observaram que os protocolos com menor força de centrifugação relativa resultaram em maior concentração de plaquetas e não houve diferença na variação do tempo de centrifugação. Observaram também, que com maior tempo concentrou-se menos leucócitos. Outra variável avaliada foi o TGF- β 1, não havendo diferença entre os protocolos testados. O melhor protocolo

avaliado concentrou 2,18 vezes a quantidade inicial de plaquetas e foi o proposto por Argüelles et al. (2006) que utiliza 120g durante cinco minutos na primeira centrifugação e 240g durante cinco minutos na segunda centrifugação.

Atualmente, têm-se observado o interesse de alguns autores pela técnica de simples centrifugado. Esta apresenta menos erros durante o processamento (Tamimi et al., 2007) e menor quantidade de leucócitos (Sundman et al., 2011; Kisiday et al., 2012), sendo mais seguro o seu uso, inclusive intrarticular (Kisiday et al., 2012). Outro fator importante a ser considerado é a força de centrifugação, uma vez que esta é responsável por ativar tanto plaquetas quanto leucócitos e conseqüentemente liberar os FC. Segundo os autores Marx (2000), Dugrillon et al. (2002) e Gonshor (2002), forças de centrifugação mais baixas preservam a integridade plaquetária, enquanto forças altas ativam prematuramente as plaquetas.

Em estudo em seres humanos comparando método de simples e duplo centrifugado foi observada maior concentração plaquetária no método de duplo centrifugado. Porém, neste método, também foi maior a dispersão dos resultados e maior alteração na ultraestrutura plaquetária, observada por microscopia eletrônica de transmissão (Tamimi et al., 2007). Estes resultados refletem maior ativação plaquetária e uma menor reprodutibilidade devido à necessidade de dois processos de pipetagem, o que predispõe à maior erro.

Devido ao crescente interesse no uso dos concentrados plaquetários para o tratamento de doenças musculoesqueléticas em cavalos (Sutter, 2007), Álvarez et al. (2009) avaliaram o risco de contaminação bacteriana durante o processamento pelo método do tubo. Foram avaliadas três condições: com e sem câmara de fluxo laminar em ambiente laboratorial limpo e com bico de Bunsen. Os autores

observaram que não há necessidade de uma câmara de fluxo se o processamento é realizado em ambiente limpo.

2.6 Sistemas comerciais de obtenção do PRP

Atualmente, existem sistemas comerciais para a obtenção do PRP, porém a maioria com alto custo de aquisição. Castelijns et al. (2011) desenvolveram um sistema de filtro para concentrar plaquetas e obtiveram uma concentração de $6,9 \pm 1,9$ vezes o valor inicial de plaquetas e $3,8 \pm 0,8$ vezes o valor inicial de células brancas.

Outra técnica simplificada, utilizando um sistema fechado de tubo, comercialmente disponível é o GPS - Sistema de separação gravitacional das plaquetas (GPS-III). Neste sistema, o sangue é coletado em uma seringa contendo o anticoagulante e transferido para um tubo que contém um separador entre as células vermelhas do sangue e a capa leucocitária (parte rica em glóbulos brancos e plaquetas), do sobrenadante onde se encontra o plasma pobre em plaquetas (PPP). Para a recuperação do PRP basta empurrar o embolo móvel que faz a separação entre PRP e PPP (Marlovits et al., 2004).

É válido ressaltar que esses diferentes sistemas comerciais levam ao PRP com diferentes composições celulares, variando consequentemente a concentração dos FC e citocinas catabólicas. Sundman et al. (2011) utilizaram dois sistemas comerciais, sendo um deles o sistema de dupla seringa da Arthrex®² (Autologous Conditioned Plasma – ACP) e o sistema GPS-III da Biomet®³. Os autores observaram uma concentração plaquetária de 1,99 vezes o valor inicial e diminuição no número de leucócitos para 0,13 vezes para o sistema ACP. Para o sistema GPS-III observaram um aumento de 4,69 vezes o número inicial

de plaquetas e 4,26 vezes o valor inicial de leucócitos no sangue total. Foi observado, ainda, que a concentração de citocinas catabólicas (MMP-9 e IL-1 β) foi significativamente maior no sistema GPS-III. Houve uma correlação positiva entre TGF- β 1 e plaquetas, PDGF-AB e plaquetas, IL-1 β com monócitos e neutrófilos e MMP-9 e neutrófilos. Os autores afirmam que dependendo da condição patológica, será mais benéfica uma maior concentração de plaquetas ou uma menor concentração de leucócitos.

2.7 Técnicas de armazenamento do PRP

Poucos são os estudos sobre estocagem e armazenamento do PRP. Piccione et al. (2010) observaram efeitos significativos na agregação plaquetária, utilizando como agente agregante o ADP, nas concentrações de 1 e 0,5 μ M, relacionados à temperatura de estocagem. Estes autores aliquotaram amostras para avaliação dentro de uma e seis horas após a coleta à temperatura de 22°C, refrigeradas a 8°C, por seis e 24 horas e congeladas à -20°C por 24 e 48 horas. Os autores sugeriram que o estoque de plasma equino, por mais de seis horas à temperatura ambiente e a 8°C teve efeito significativo na agregação. De fato, a alteração das plaquetas é mais acentuada à 8°C que à temperatura ambiente. O estoque por 24 e 48 horas à -20°C também alterou a agregação. As amostras foram coletadas em Citrato de Sódio.

Sabe-se que ocorre o rearranjo do citoesqueleto e da membrana lipídica das plaquetas na fase de transição sob condições de resfriamento de 23°C a 4°C (Reid et al., 1999b). A existência de fases de gel e líquido da membrana, no ponto de transição (15°C – 18°C) de líquido a gel, resulta na perda da integridade da membrana e consequentemente do material celular, com dano celular irreversível que

² Artrex, Munich, Germany.

³ Biomet, Warsaw, Indiana, United States.

reflete na redução da viabilidade e função plaquetária (Reid et al., 1999a).

Tem sido mostrado em estudos com plaquetas de seres humanos que o dano no rearranjo do citoesqueleto pode ser minimizado com a adição de EGTA (ácido etilenoglicol-bis (β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetra acético), um componente que pode atuar como quelato do íon cálcio, evitando a incorporação de cálcio nas células (Sterling e Stracher, 1993). Pesquisadores investigaram a manutenção da integridade da membrana das plaquetas de seres humanos, através da combinação do quelante de cálcio (EGTA) e de um microfilamento estabilizador (citocalasina B). Aparentemente, este composto protege as plaquetas contra lesão de resfriamento ou agentes conhecidos na proteção de membranas, no processo de congelamento.

A função das plaquetas e a ativação antes e após resfriamento ou congelamento, foram avaliadas por aglutinação com ristocetina, agregação com trombina ou ADP, por retração do coágulo induzido por plaquetas (PICR), e expressão de P-Selectina. Após o congelamento ou o resfriamento, as preparações foram centrifugadas e o sobrenadante foi medido por fluoresceína, cuja liberação para o meio refletia a perda da integridade da membrana e função das plaquetas (Reid et al., 1999b). Estes autores avaliaram as amostras resfriadas a 4°C de 1 a 21 dias, com e sem combinação do EGTA e da citocalasina B. Para o congelamento, foi utilizado o Dimetilsulfóxido (DMSO) à 5% ou glicerol a 5mM, adicionado às plaquetas previamente ao congelamento. Para o congelamento as amostras foram a -70°C/minuto, em uma taxa de -1°C/minuto, e em seguida, descongeladas rapidamente a 37°C. A integridade da membrana e função das plaquetas, tal como medido pelos níveis de fluoresceína no sobrenadante, correlacionou-se inversamente. Plaquetas refrigeradas a 4°C com EGTA e citocalasina B mostraram uma perda gradual da integridade da membrana, com a

perda máxima alcançada no dia sete. A perda da integridade da membrana precedeu a perda completa da função, como demonstrado por PICR. Em contraste, as plaquetas congeladas sem esses agentes crioprotetores apresentaram perda completa da integridade da membrana e função, após o dia 1 de armazenamento. Plaquetas congeladas em DMSO resultaram na liberação menor de fluoresceína quando comparadas com a presença ou ausência de outros crioprotetores. Este resultado apoia as observações anteriores de que o DMSO à 5% protege as membranas de plaquetas contra lesões de congelamento.

2.8 Lombalgia no equino

A lombalgia é considerada como a afecção equina mais comum e menos entendida. Segundo Jeffcott (1999), são limitadas as informações acerca da etiologia e patogênese desta condição, seja por dificuldade de acesso às estruturas envolvidas ou pelo conhecimento insuficiente da anatomia e biomecânica da coluna vertebral dos equinos.

Nos equinos a dor lombar é relevante e justifica mais investigações nesta área que ainda é pouco explorada, em função de fatores como a deficiência no conhecimento da anatomia funcional da coluna vertebral toracolombar, da etiopatogenia das enfermidades e a dificuldade de acesso às estruturas envolvidas por meio das técnicas semiológicas usuais para o aparelho locomotor (Jeffcott, 1999; Haussler, 2007). A prevalência de problema na coluna de equinos pode variar de 0,9% a 94%, dependendo do avaliador (Haussler, 2007).

Dentre as alterações dos tecidos moles, as desmites são consideradas as mais importantes e correspondem de 13 a 18 % de todas as injúrias de tecidos moles (Gillis, 1999). Segundo Henson (2009) o ligamento supraespinhoso tem sido o mais frequentemente associado com sinais clínicos de dor na coluna no equino. Lesões

do ligamento supraespinhoso ocorrem geralmente entre T15 e L3 e podem ser associadas com aumento de volume local e dor à palpação (Denoix, 1999). Estas lesões ocorrem geralmente sobre os processos espinhosos, podendo se estender entre dois processos adjacentes, e são facilmente diagnosticadas pela ultrassonografia (Denoix e Dyson, 2003).

As causas de dores na coluna podem ser difíceis de identificar em alguns casos e requerem um completo e sistemático exame clínico, incluindo exames complementares para auxiliarem o diagnóstico (Henson, 2009). Fantini (2010) ressalta a importância da associação entre o exame clínico e as técnicas de diagnóstico por imagem, como a termografia e a ultrassonografia, para o diagnóstico das lesões toracolombares, uma vez que nenhuma das técnicas foi capaz de detectar todas as alterações isoladamente. Em estudo utilizando a termografia e a ultrassonografia no diagnóstico de lesões toracolombares, apenas um animal não apresentou indicativo de lesão em ambos os exames de diagnóstico por imagem (Fantini, 2010).

Os tratamentos convencionais disponíveis na literatura, com o objetivo de diminuir a dor, abrangem uma grande variedade de terapias associadas, porém são controversos e na grande maioria das vezes ineficazes, sendo necessários mais estudos relacionados ao tratamento das lombalgias nos equinos. Na literatura consultada, não foram encontrados relatos sobre o possível efeito terapêutico do PRP nos casos de lombalgia nesta espécie.

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEDA, K.; HOWARD, S.; PICHKA, R. et al. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and annulus fibrosus cells cultured in alginate beads. **Spine**, Philadelphia, v.31, p.959-966, 2006.

ÁLVAREZ, M. E.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J. U. Monitoring bacterial contamination in equine platelet concentrates obtained by the tube method in a clean laboratory environment under three different technical conditions. **Equine Vet J**, v.41, 2009.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb. Haemost.** V.91, p.4-15, 2004.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M. et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. **J Orthop Res**, v.23, p.281-286, 2005.

ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A. T. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends Biotechnol.** v.24, p.227-234, 2006.

ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; ORIVE, G.; ANDIA, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. **Biomaterials.** v.28, p.4551-4560, 2007.

ANITUA, E.; PRADO, R.; SÁNCHEZ, M. et al. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v.22, p.25-32, 2012.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PRADES, M. et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. **Res Vet Sci**, v.81, p.237-245, 2006.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in Five horses. **Vet Rec**, v.162, p.208-211, 2008.

BARBOSA, A.L.T.; CARLO, R. J.; GOMES, H. C. et al. Plasma rico em plaquetas: uma fonte de múltiplos fatores de crescimento para enxertos ósseos. **Arq Bra**

Med Vet e Zoo, Belo Horizonte, v.58, supl.1, p.64-65, 2006.

BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T.; DE GROOT, M. W. et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. **J Orthop Res**, v.28, p.211-217, 2010.

CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Wounds** v.10, p.12-32, 1998.

CARMONA, J. U. Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse. 2006. 91f PhD Thesis. (Doctorado en Medicina y Sanidad Animales) Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

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

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. **Arch Med Vet**, v.41, p.175-179, 2009.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **J Equine Vet Science**, v.31, p.506-510, 2011a.

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C. Questions statistical power of study on release of growth factors from platelet-rich plasma. **Am J Vet Res**, v.72, p.998-999, 2011b.

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous platelet concentrates as na adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermédia dysfunction. **J Eq Vet Scien**, p.1-5, 2012.

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SANDOVAL, J. A. Review of the currently

available systems to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. **Rec Pat Reg Med**, v.2, 2013.

CARTER, C.A.; JOLLY, D. G.; WORDEN, C. E. et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, Mississippi, v.74, p.244-255, 2003.

CASTELIJNS, G.; CRAWFORD, A.; SCHAFFER, J. et al. Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. **Vet Comp Orthop Traumatol**, v.5, p.363-369, 2011.

CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, p.299-303, 2006.

DELONG, J. M.; BEITZEL, K.; MAZZOCCA, A. D.; et al. Update on platelet-rich plasma. **Current Orthopaedic Practice** v.22, 2011.

DENOIX, J. M. Ultrasonographic evaluation of back lesions. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 15, p.27 – 60, 1999.

DENOIX, J.M., DYSON, S.J. Thoracolumbar Spine. In: ROSS, M. W., DYSON, S. J. Diagnosis and Management of Lameness in the Horse. Philadelphia: Saunders, 2003. p.509-521.

DOLENTE, B. A.; WILKINS, P. A.; BOSTON, R. C. Clinicopathologic evidence of disseminated intravascular coagulation in horses with acute colitis. **J Am Vet Med Assoc**, v.220, p.1034-1038, 2002.

DUGRILLON, A.; EICHLER, H.; KERN, S. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in

- bone regeneration. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v.31, p.615-619, 2002.
- EHRENFEST, D. M. D.; CHOUKROUN, J.; DISS, A. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod.** v.101, p.45-50, 2006.
- EHRENFEST, D. M. D.; CHOUKROUN, J. PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC... How to find your way in the jungle of platelet concentrates? **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod.** v.103, p.305-306, 2007.
- EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte – and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology.** v.27, p.158-167, 2009.
- EVANS, R. J. Blood platelets and their role in the genesis and sequelae of intestinal ischaemia. **Equine Vet J.** v.13 (Suppl), p.31-37, 1992.
- EVERTS, P. A. M. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of Extra Corporeal Technology.** Bloomsburg, v.38, p.174-187, 2006.
- FANTINI, P. Avaliação toracolombar em equídeos de tração: estudo clínico, termográfico e ultrassonográfico. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 2010, 125p. (Dissertação, Mestrado em Clínica e Cirurgia).
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.280, p.1358-1366, 2001.
- FRISBIE, D.; SANDLER, E. A.; TROTTER, G.W. et al. Metabolic and mitogenic activities of insulin-like growth factor-1 in interleukin1-conditioned equine cartilage. **Am J Vet Res.** v.61, p.436-441, 2000.
- GÁLVEZ-GASTÉLUM, F. J.; SANDOVAL-RODRÍGUEZ, A. S.; ARMENDÁRIZ-BORUNDA, J. Transforming growth factor-beta as a therapeutic target. **Salud Pública de México.** v.46, p.341-352, 2004.
- GILLIS, C. Spinal ligament pathology. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v. 15, p.97 – 101, 1999.
- GIRALDO, C. E.; LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. E. et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. **BMC Vet Res.** v.29, 2013.
- GONZÁLES-LAGUNAS, J. Plasma rico en plaquetas. **Rev. Esp. Cir. Oral Maxilofac.** v.28, p.89-99, 2006.
- GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: background and process. **Int J Periodont Rest.** v.22, p. 547-557, 2002.
- HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C. et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Eur. J. Biochem.**, v.236, p.1-26, 1996.
- HARTWIG, J.; ITALIANO, I. The birth of the platelet. **J Thromb Haemost** 1, p.1580-1586, 2003.
- HAUSSLER, K. K. Review of the Examination and Treatment of Back and Pelvic Disorders. ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS – AAEP, 53., 2007, Orlando, Fla. Proceedings... Disponível em: <www.ivis.org>.
- HENSON, F. M. D., Ed. **Equine Back Pathology: diagnosis and treatment.** Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. 266p.

- HUANG, S. S.; HUANG, J. S. TGF- β control of cell proliferation. **J Cell Bioch**, v.96, p.447-462, 2005.
- IFRAN, A.; HASIMI, A.; KAPTAN, K. et al. Evaluation of platelet parameters in healthy apheresis donors using the ADVIA 120™. **Transfus Apher Sci**, v.33, p.87-90, 2005.
- JANN, H. W.; STEIN, L. E.; SLATER, D. A. In vitro effects of epidermal growth factor or insulin-like growth factor on tenoblast migration on absorbable suture material. **Veterinary Surgery**, v.28, p.268-278, 2004.
- JEFFCOTT, L. B. Historical perspective and clinical indication. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v. 15, p.1 – 12, 1999.
- KEYVY, S.; JACOBSON, M. Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel. Proc. 27th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, St. Paul, Minnesota, p.262, 2001.
- KINGSTON, J. K.; SAMPSON, S. N.; BEARD, L. A. et al. The effect of supramaximal exercise on equine platelet function. **Equine Vet J**, v.30 (Suppl), p.181-183, 1999.
- KISIDAY, J. D.; WAYNE, McIIWRAITH, RODKEY, W. G. et al. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. **Cartilage**, v.28, p.1-10, 2012.
- KLINGER, M. H. F. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. **Ann Hematol**; v.76, p.103-12, 1996.
- KUNICKA, J. E.; FISCHER, G.; MURPHY, J. et al. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. **Am J Clin Pathol**, v.114, p.283-289, 2000.
- LALKO, C. C.; DEPPE, E.; ULATOWSKI, D. et al. Equine platelet CD62P (P-selectin) expression: a phenotypic and morphologic study. **Vet Immunol Immunopathol**, v.2, p.119-134, 2003.
- LEI, H.; GUI, L.; XIAO, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. **Clin Biochem**, v.42, p.1452-1460, 2009.
- MCCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **J orthop res**, v.27, p.1033-1042, 2009.
- MACEY, M. G.; CARTY, E.; WEBB, L. et al. Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 Haematology System. **Cytometry Commun Clin Cytometry**, v.38, p.250-255, 1999.
- MACEY, M.; AZAM, U.; MCCARTHY, D. et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. **Clin Chem**, v.48, p.891-899, 2002.
- MAIA L. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.
- MANNAIONI, P. F.; BELLO, G. M.; MASINI, E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. **Inflamm Res**, v.46, p.4-18, 1997.
- MARLOVITS, S.; MOUSAVI, M.; GABLER, C. et al. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. **Haemostasis Spine Surg**, p.108-112, 2004.
- MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet rich

- plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, p.638-646, 1998.
- MARX, R. E. Quantification of growth factor levels using simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**, v.58, p.300-301, 2000.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its usage. **J Oral Maxillofac Surg**, v.62, p.489-496, 2004.
- MONTENERO, R. M.; CIFUENTES J, ZARZAR E. Actualización de la Técnica de Obtención y Uso del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). **Revista Dental de Chile**, v.2, p.25-28, 2002.
- MORITZ, A.; WALCHECK, B. K.; WEISS, D. J. Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. **Vet Clin Pathol**, v.32, 6-12, 2003.
- 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**, Feb, v.66, p.325-329, 2005.
- NAGAE, M. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. **Tissue Engineering**, New York, v.13, p.147-158, 2007.
- NIMMI, M. E. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. **Biomaterials**, v.18, p.1201-1225, 1997.
- OLEZA, I. A. La terapia de las lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencias clínicas y bioquímicas que validan su utilización, 2009. 250f PhD Thesis. (Doctorado en Medicina y Sanidad Animales) Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.
- PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.1202-1205, 2007.
- PELAGALLI, A.; LOMBARDI, P.; D'ANGELO, D. et al. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. **J Comp Pathol**, p.126-132, 2002.
- PELAGALLI, A.; BELISARIO, M. A.; TAFURI, S. et al. Adhesive properties from different animal species. **J Comp Pathol**, p.127-131, 2003.
- PEREIRA, J. Estructura, producción, cinética y función de las plaquetas. En: Mezzano, D., Pereira, J. Fisiología de la Sangre. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, p.145-176, 1993.
- PEREIRA, J. La Fisiopatología de la hemostasia: algunos aspectos sobre la vida y muerte de las plaquetas en la circulación, **Boletín Escuela de Medicina U.C.**, Pontificia Universidad Católica de Chile, v.33, p.5-19, 2008.
- PICCIONE, G.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C. et al. Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse, **J Equine Vet Sci**, v.30, p.371-375, 2010.
- PIERCE, G. F.; MUSTOE, T. A.; ALTROCK, B. W. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing, **J Cell Biochem**, v.45, p.319-326, 1991.
- PIGNATELLI, P.; PULCINELLI, F.; CIATTI, F. et al. Effects of storage on in vitro platelet responses: comparison of ACD and Na citrate anticoagulated samples. **J Clin Lab Anal**, v.10, p.134-139, 1996.
- PIETRZAK, W.S.; EPPLEY, B.L. Platelet-rich plasma: biology and new technology. **J Craniofacial Surg**, v.16, n.6, p.1043-1054, 2005.
- REID, T. J.; ESTEBAN, G.; CLEAR, M. et al. Platelet membrane integrity during storage and activation. **Transfusion**, v.39, p.616-624, 1999a.

- REID, T. J.; VICENT, F. L.; ESTEBAN, G. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. **Cryobiology**, v.38, p.209-224, 1999b.
- REYES, L. M.; GONZÁLEZ, G. M.; HABIB, F. E. et al. Utilización de plasma rico en plaquetas para regeneración periodontal en un perro. **Rev Odontológica Mexicana**, v.8, p.64-69, 2004.
- RINDERMANN, G.; CISLAKOVA, M.; ARNDT, G. et al. Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. **J Vet Sci**, v.11, p.173-175, 2010.
- ROSIER, R. N.; O'KEEFE, R. J.; HICKS, D. G. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. **Clin Orthop**, v.355 (Suppl), p.294-300, 1998.
- SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; MILLER, B. J. et al. Platelet Rich Plasma (PRP) enhanced anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **J Orthop Res**, Hoboken, v.25, p.230-240, 2007.
- SEGURA, D.; MONREAL, L.; ARMENGOU, L. et al. Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. **J Vet Int Med**, v.5, p.1076-1082, 2007.
- SILVA, A.; SAMPAIO, R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing? **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v.17, p.676-682, 2009.
- SILVA, R. F.; REZENDE, C. M. F.; PAES-LEME, F. O. et al. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. **Arch Med Vet**, v.43, p.95-98, 2011.
- SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A. et al. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.1045-1051, 2007.
- STERLING, H.; STRACHER, A. Platelet membrane actin interaction. **Cell Mol Biol Res**, v.39, p.53-63, 1993.
- SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet rich plasma. **Am J Sports Med**, v.39, p.2135-2140, 2011.
- 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**, Schaumburg, v.65, p.924-930, 2004.
- SUTTER, W. W. Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. **Clin Tech Equine Pract**, v.6, p.198-208, 2007.
- TABLIN, F. Platelet structure and function. **Schalman's Veterinary Hematology**. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2000. p.448-452.
- TAMIMI, F. M.; MONTALVO, S.; TRESGUERRES, I. et al. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma, **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, p.1084-1093, 2007.
- TEXTOR, J. Autologous biological treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. **Vet Clin North America. Equine pract**, v.27, n.2, p.275-298, 2011.
- THEORET, C. L. The pathophysiology of wound repair. **Vet Clin Equine**, v.21, p.1-13, 2005.
- 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, p.1164-1171, 2007.

VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Paquetas para uso em medicina equina. **Pesq Vet Bras**, n.32, 106-110, 2012.

VISSER, L. C.; ARNOCKY, S. P.; CABALLERO, O. et al. Growth Factor-Rich Plasma Increases Tendon Cell Proliferation and Matrix Synthesis on a Synthetic Scaffold: An In Vitro Study. **Tissue Engineering**, Part A, v.16, p. 1021-1029, 2009.

WANG, J. S. Basic fibroblastic growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. **Acta Orthop Scand**, v.269, p.1-33, 1996.

WEISS, D. J.; EVANSON, O. A.; FALIARI, J. J. et al. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in Thoroughbreds undergoing near-maximal treadmill exercise. **Am J Vet Res**, v.59, p.393-396, 1998.

XU, X.; JACKSON, P.; TANNER, S. et al. A self-propagating matrix metalloprotease-9 (MMP-9) dependent cycle of chronic neutrophilic inflammation. **PLoS One**, v.6, 2011.

ZELMANOVIC, D.; HETHERINGTON, E. J. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. **Vet Clin Pathol**, v.27, p.2-9, 1998.

ZIMMERMANN, R.; JAKUBIETZ, R.; JAKUBIETZ, M. et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. **Transfusion**, v.41, p.1217-1224, 2001.

4. CAPÍTULO I

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) UTILIZANDO SIMPLES CENTRIFUGADO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer um novo protocolo para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), utilizando única centrifugação, com recuperação de maior número de plaquetas e menor número possível de leucócito. O protocolo a 133g durante oito minutos, com dois minutos de frenagem foi considerado o ideal e eficaz em concentrar 1,63 vezes o valor inicial de plaquetas e diminuir 5,85 vezes o valor inicial dos leucócitos. Apresentou concentração média de TGF- β 1 de 5,045ng/mL, sendo um novo protocolo disponível para o uso em equinos.

Palavras-chave: equino, Plasma Rico em Plaquetas – PRP, simples centrifugado.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish a new protocol of platelet-rich plasma (PRP) preparation, using one tube centrifugation, yielding a greater concentration of platelets and as less leukocytes as possible. The centrifugation protocol at 133g for 8 minutes with two minutes of braking was considered ideal and efficient to concentrate platelets 1.63 times and to reduce the initial concentration of leukocytes 5.85 times. The TGF- β 1 mean concentration was 5.045ng/mL, being a new protocol available for use in equine.

Keywords: Equine, platelet-rich plasma – PRP, simple tube centrifugation

INTRODUÇÃO

As plaquetas desempenham diversas funções no organismo de mamíferos. O uso de plasma rico em plaquetas e concentrado de plaquetas tem sido proposto como agente essencial para acelerar o processo de cicatrização de feridas e estimular a capacidade regenerativa dos tecidos afetados (Carmona, 2006), podendo ser obtido por simples ou duplo centrifugado. Alguns autores recomendam o uso cauteloso de preparados de plasma rico em plaquetas (PRP) que utilizam dupla centrifugação, devido a uma composição com grande quantidade de leucócitos (Kisiday et al., 2012). Os leucócitos podem apresentar efeitos catabólicos indesejáveis

(Sundman et al., 2011; Kisiday et al., 2012; Vendruscolo et al., 2012)

Atualmente existem vários protocolos descritos na literatura, apresentando diferentes composições. Vendruscolo et al (2012) compararam 10 diferentes protocolos e observaram que menor força de centrifugação resultaram em maior concentração de plaquetas. A falta de padronização da técnica de obtenção pode levar a resultados clínicos insatisfatórios.

O objetivo deste estudo foi estabelecer um novo protocolo para obtenção do plasma rico em plaquetas, utilizando o método manual do tubo em única centrifugação e com a recuperação do menor número possível de leucócitos. Além disso,

objetivou-se a dosagem do TGF- β no PRP obtido, para caracterização do protocolo proposto, em equinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em estudo piloto, para se chegar ao protocolo estipulado foram testadas amostras centrifugadas nas velocidades de 75g, 133g, 252g e 470g, entre cinco e 10 minutos. A padronização de um novo protocolo para obtenção do PRP foi realizada na Universitat Autònoma de Barcelona – Espanha, após aprovação pelo *Institutional Committee de Cuidados y Uso de Animales*.

Foram utilizados seis equinos clinicamente saudáveis no momento da coleta de sangue, sendo cinco fêmeas e um macho, com idades entre seis e quatorze anos, de diferentes raças.

O sangue foi obtido através de coleta asséptica na veia jugular, por meio do sistema de tubos a vácuo, com agulha tipo borboleta 23G⁴. Uma amostra foi coletada em um tubo de 1,0mL com EDTA, para realização de hemograma e outra em tubo de 8,5mL contendo ACD⁵ (Citrato de trissódio – 22g/L; ácido cítrico – 8g/L e dextrose – 24,5g/L) e homogenizado por inversão lenta do tubo. O processamento foi realizado imediatamente após a coleta, sob única centrifugação, na velocidade de 133g durante oito minutos. O PRP foi aspirado com o auxílio de agulha espinhal⁶ 18G, 1,5mL aproximadamente 4mm acima da capa leucocitária, a fim de recuperar o menor número possível de leucócitos e uma quantidade significativa de plaquetas.

⁴ Becton Dickinson Company®, Madrid, Espanha.

⁵ Becton Dickinson Company®, Madrid, Espanha.

⁶ Becton Dickinson Company®, Madrid, Espanha.

Uma vez obtido o PRP, uma amostra de 0,5mL foi separada para análise em citômetro de fluxo⁷, para contagem e avaliação de alguns parâmetros plaquetários, no *Servei de Hematologia de la Escuela de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona*. Separou-se 1,0mL para determinação dos níveis de TGF- β 1 por meio de kits de ELISA, previamente validado para a espécie equina (Argüelles et al., 2006), no *Servei de Cultius Cel lulars, Producció d'Anticossos i Citometria (SCAC)*, no *Instituto de Biotecnologia y Biomedicina da Universitat Autònoma de Barcelona*. Esta amostra foi centrifugada a 1500g durante 10 minutos para sedimentação das plaquetas e liberação dos fatores de crescimento e o sobrenadante recuperado.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao PROC UNIVARIATE para verificação da linearidade (SAS, 1997). As variáveis com distribuição não paramétrica foram transformadas ($\log X + 1$) e novamente submetidas ao teste.

As variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo teste T de student e as não paramétricas pelo teste de Wilcoxon. A significância estatística foi de 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo foi eficiente para concentrar plaquetas em 1,65 vezes o valor inicial no sangue total. Tamimi et al. (2007) observaram ser possível um incremento de plaquetas menor que duas vezes o valor inicial quando se utiliza protocolo de única centrifugação. Quando se considera a quantidade de 1,5mL de anticoagulante presente no tubo de ACD, este valor torna-

⁷ ADVIA 120® Hematology System, Siemens.

se considerável, correspondendo à 17% da capacidade final do tubo de 8,5mL. Isto poderia justificar uma correção do valor, uma vez que o valor final de plaquetas por μL de sangue está subestimado. Logo, corrigindo esta suposta diluição, que a quantidade de plaquetas/ μL de sangue foi de 1,93 vezes o valor inicial. Vendruscolo et al. (2012) avaliaram protocolos presentes na literatura a fim de estabelecer um que resultasse na maior concentração de plaquetas em relação ao sangue total e obtiveram taxas de concentração plaquetária variando de 1,3 a 2,36 vezes.

A quantidade de plaquetas ideal para ser utilizada em uma lesão não está bem definida, e alguns autores sugerem que grandes quantidades de plaquetas podem produzir um ambiente proinflamatório, diminuindo assim a biossíntese do tecido (Kisiday et al., 2012). Os valores obtidos neste trabalho foram aproximados dos valores encontrados por Kisiday et al. (2012) para o protocolo de única centrifugação, utilizado para comparar efeitos anabólicos e catabólicos do PRP.

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre o volume (MPV) e a massa (MPM), e a amplitude de distribuição da massa (PMDW), estes parâmetros estão relacionados com a alteração na forma das plaquetas, podendo representar a manutenção de características plaquetárias. Os resultados indicam que não houve variações significativas no volume e na massa, modificações estas que ocorrem quando as plaquetas sofrem ativação e emitem pseudópodes. Não há um padrão definido ou valores de referências na literatura em relação aos parâmetros plaquetários para se classificar um PRP de qualidade ou não, porém, os parâmetros que correspondem à forma e estado das plaquetas são sugestivos.

O menor componente médio plaquetário (MPC) e na amplitude de distribuição do componente plaquetário (PCDW) nas

amostras coletadas em ACD indicam perda na densidade das plaquetas, fato esperado devido ao processamento do PRP e sensibilidade das plaquetas em alterar sua forma.

As amostras para avaliação em sangue total foram coletadas em EDTA por este ser o anticoagulante de escolha para a realização de hemograma, mantendo de melhor maneira a morfologia e integridade celular. Em relação aos agregados plaquetários, pode-se observar um valor quase duas vezes superior para as amostras em EDTA, talvez por este anticoagulante induzir maior agregação plaquetária quando comparado ao anticoagulante contendo Ácido Cítrico - Citrato de Sódio - Dextrose (ACD) (Macey et al., 2002; Silva et al., 2013). Desta maneira, mais plaquetas estão livres nas amostras coletadas em ACD. Vendruscolo et al. (2012) observaram que protocolos com força de centrifugação relativa alta não obtém altas concentrações plaquetárias, por provavelmente ativar ou lesar as plaquetas durante o processamento, levando assim à formação de *pellets* no fundo do tubo.

A concentração de leucócitos obtida no PRP sob única centrifugação foi menor que aquela encontrada por Argüelles et al. (2006) ao encontrarem concentração média de $8,4 \times 10^3$ WBC/ μL , utilizando dupla centrifugação (fração sugerida para uso) e $4,1 \times 10^3$ WBC/ μL e $3,1 \times 10^3$ WBC/ μL para as frações obtidas em única centrifugação. Ainda que controversa a função dos leucócitos nos concentrados plaquetários, estudos vêm demonstrando correlação positiva entre leucócitos e expressão gênica de catabolismo, e negativa para a expressão gênica da matriz extracelular, em tendões e ligamentos (Sundman et al., 2011). Os leucócitos ainda contêm citocinas ativas, capazes de exacerbar a resposta inflamatória e degradar a matriz do tecido (Kisiday et al., 2012). Em outro estudo com cultivos de explantes de tendões do músculo flexor digital superficial, foi

observado que o PRP foi superior a aspirados de medula óssea, apresentando melhor efeito anabólico, melhor relação de colágeno tipo I em relação ao colágeno tipo III e menor expressão de metaloproteinases, como consequência provável do menor número de leucócitos no preparado, além da

ação dos fatores de crescimento (McCarrel e Fortier, 2009).

Os valores das variáveis hematológicas estão demonstrados na Tab.1.

Tabela 1: Valores médios \pm desvio padrão das variáveis hematológicas em amostras de sangue total (EDTA) e no PRP (ACD), de equinos hípidos.

VARIÁVEL	Sangue total (EDTA)	PRP (133g/8min)
PLT (fc x 10 ³ /μL)	182,67 \pm 25,92 ^b	301,50 \pm 23,82 ^a
MPV (fL)	9,80 \pm 0,85	11,9 \pm 0,51
MPC (g/dL)	20,63 \pm 0,39 ^a	18,33 \pm 0,50 ^b
PCDW (g/dL)	8,83 \pm 0,20 ^a	7,72 \pm 0,18 ^b
MPM (pg)	1,91 \pm 0,04	1,87 \pm 0,05
PMDW (pg)	0,63 \pm 0,01	0,60 \pm 0,02
LPLT (cell x 10 ³ /μL)	19,83 \pm 2,2 ^b	35,33 \pm 4,90 ^a
CLUMPS	524,67 \pm 122,10 ^a	287,0 \pm 174,21 ^b
RBC (cell x 10 ⁶ /μL)	7,59 \pm 0,67 ^a	0,05 \pm 0 ^b
WBC (cell x 10 ³ /μL)	8,78 \pm 0,84 ^a	1,5 \pm 0,15 ^b
NEU (cell x 10 ³ /μL)	5,95 \pm 0,81 ^a	0,29 \pm 0,08 ^b

PLT, plaqueta, MPV, volume plaquetários médio, MPC, componente plaquetário médio; PCDW, amplitude de distribuição do componente plaquetário; MPM massa plaquetária média; PMDW, amplitude de distribuição da massa plaquetária; LPLT, macroplaquetas; CLUMP, agregados plaquetários; RBC, glóbulos vermelhos; WBC, glóbulos brancos; NEU, neutrófilo; Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes P<0,05.

Para a dosagem do TGF- β 1 foi necessária ativação prévia da amostra com Cloreto de Cálcio 10% para a obtenção da leitura. O PRP obtido apresentou média de TGF- β 1 de 5.044,67pg/mL (5,045 ng/mL). Os valores obtidos foram maiores que os obtidos por Vendruscolo et al. (2012) que encontraram um valor médio de 548,93pg/mL. Provavelmente pelo fato destes autores não ativarem o PRP para a análise.

CONCLUSÃO

O protocolo utilizando única centrifugação, à 133g durante 8 minutos, foi considerado o ideal dentre os protocolos avaliados, concentrando as plaquetas em 1,63 vezes o valor inicial e baixando a contagem de leucócitos em 5,85 vezes o valor inicial. Apresentou níveis de TGF- β 1 de 5,045ng/mL, que podem ser considerados aceitáveis para se alcançar efeitos

biológicos na aplicação clínica do PRP, sendo um novo protocolo disponível para o uso na medicina equina.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a CAPES, do Governo Brasileiro pela concessão de bolsa para estudo no exterior e ao Instituto de Terapia Regenerativa de Tecidos da *Universitat Autònoma de Barcelona*, Espanha.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J. et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for

concentrating equine platelets. **Res Vet Sci**, v.10, p.237-245, 2006.

CARMONA, J. U. Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse. 2006. 91f PhD Thesis. (Doctorado em Medicina y Sanidad Animales) Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

KISIDAY, J. D.; McIIWRAITH, C. W.; RODKEY, W. G. et al. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. **Cartilage**, v.28, p.1-10, 2012.

MACEY, M.; AZAM, U.; MCCARTHY, D. et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system, **Clin Chem**, v.48, p.891-899, 2002.

MCCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on

tendon and ligament gene expression. **J Orthop Res**, v.27, p.1033-1042, 2009.

SILVA, R. F.; SANTANA, G. C.; LEME, F. O. P. et al. Release of transforming growth factor beta 1 and platelet derived growth factor type AB from canine platelet gels obtained by the tube method and activated with calcium salts. **Arch Med Vet**, v.45, p.159-65, 2013.

SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet rich plasma. **Am J Sports Med**, v.39, p.2135-2140, 2011.

TAMIMI, F. M.; MONTALVO, S.; TRESGUERRES, I. et al. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma, **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, p.1084-1093, 2007.

VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Paquetas para uso em medicina equina. **Pesq Vet Bras**, n.32, 106-110, 2012.

5. CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA FECHADO DE TUBOS PARA A OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM EQUINOS.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar os parâmetros plaquetários e determinar a concentração de TGF- β 1, no Plasma Rico em Plaquetas (PRP) de equinos, obtidos de um sistema fechado de tubos da Proteal®, utilizando única centrifugação. Em um delineamento fatorial 2x2, foram comparadas duas velocidades de centrifugação (133g e 360g), durante oito minutos, e dois anticoagulantes (Citrato de Sódio e Ácido Cítrico-Citrato Trissódico - Dextrose). O protocolo a 133g, independente do anticoagulante utilizado, foi o melhor para concentrar plaquetas, resultando em concentração de 1,59 vezes o valor inicial e diminuição da concentração inicial de leucócitos em 1,95 vezes, em relação aos valores no sangue total. Não houve diferença entre concentração de TGF- β 1 entre os protocolos. O sistema avaliado foi eficaz para concentrar plaquetas e recuperar poucos leucócitos, e apresentou níveis aceitáveis de TGF- β 1, utilizando única centrifugação a baixas velocidades.

Palavras-chave: plasma rico em plaquetas, equinos, fatores de crescimento, fator de crescimento transformante.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the platelet parameters and TGF- β 1 concentration in equine platelet-rich plasma (PRP) prepared in a closed tube system from Proteal®, through one tube centrifugation. Two centrifugation forces were compared (133g and 360g) for eight minutes, and with two anticoagulants (Sodium citrate and Citric Acid – Trisodium Citrate – Dextrose) in a 2x2 factorial design. The 133g protocol was the best to concentrate platelets, regardless the anticoagulant used. It concentrated the initial value of platelets 1.59 times, and reduced the concentration of leukocytes 1.95 times, as compared to the values in the whole blood. There was no difference in the TGF- β 1 concentration among the protocols. The system evaluated was efficient to concentrate platelets and to yield as less leukocytes as possible. The TGF- β 1 concentration was acceptable with this protocol, using only one centrifugation at low centrifugation forces.

Keywords: platelet-rich plasma, equine, growth factors, transforming growth factor.

INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas e vem sendo proposto como agente acelerador do processo de cicatrização, com estimulação

da capacidade regenerativa dos tecidos (Anitua et al., 2004; Bosch et al., 2010). Oferece forma de fácil aquisição e baixo custo de diversos componentes como fibrina, fibrinogênio, leucócitos, células mesenquimais e fatores de crescimento

(FC) presentes nos grânulos- α das plaquetas. Os FC são as moléculas de interesse, já que suas propriedades operam na modulação da inflamação e na reparação dos tecidos, produzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição de matriz extracelular (Anitua et al., 2004; Argüelles et al., 2006; Everts, 2006; Oleza, 2009). Os FC presentes no PRP incluem: fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (Weibrich et al., 2002).

A falta de padronização na preparação, como o tempo, a velocidade de centrifugação e o anticoagulante ideal, leva a obtenção de compostos de cor, volume e composição variável de plaquetas, leucócitos, FC e outros tipos de células, o que pode refletir em resultados insatisfatórios (Ehrenfest et al., 2007; Ehrenfest et al., 2009; Lei et al., 2009; Silva et al., 2011).

O efeito regenerativo do PRP depende dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e, portanto, a viabilidade das plaquetas é fundamental. Se as plaquetas forem ativadas durante o processo de obtenção, os fatores de crescimento serão liberados no plasma e descartados durante a preparação, diminuindo a eficácia do PRP (Lei et al., 2009). Desta forma, quanto menor a ativação plaquetária, mais fatores de crescimento estarão retidos nas plaquetas, sendo este um ponto importante para conferir qualidade ao PRP.

A escolha do anticoagulante ideal está relacionada à inibição ou diminuição de ativação espontânea das plaquetas (Pignatelli et al., 1996; Macey et al., 2002). Em estudo com PRP em seres humanos (Lei et al., 2009), os autores concluíram que a qualidade do PRP é estreitamente relacionada com o tipo de anticoagulante

utilizado. Neste mesmo estudo, avaliaram a microestrutura das plaquetas, de sangue coletado em Heparina, Citrato de sódio, Ácido citrato de sódio e dextrose (ACD) e Citrato-teofilina-adenosina-dipiridamol (CTAD), e observaram que o ACD foi melhor que a Heparina e o Citrato de sódio, na manutenção da integridade das estruturas da plaqueta, prevenindo a ativação espontânea.

Nenhuma correlação entre o número de plaquetas e o efeito regenerativo do PRP foi demonstrada, mas diversos autores atribuem o sucesso da terapia ao uso de plaquetas viáveis que não foram ativadas durante o processo de obtenção do PRP (Marx, 2004; Carmona e Lopez, 2011; Silva et al., 2011). A quantidade ideal de plaquetas a ser administrada no local da lesão ainda não está definida, podendo variar conforme o tipo e o número dos receptores disponíveis para os fatores de crescimento. A hipersaturação destes receptores pode induzir uma resposta na proliferação celular com *feedback* negativo. Entretanto, existem poucos estudos comparativos em relação à concentração plaquetária e efeito do PRP na proliferação celular (DeLong et al., 2011; Kisiday et al., 2012), especialmente na Medicina Veterinária.

Em um estudo que avaliou efeitos anabólico e catabólico, em PRP de diferentes composições, os autores sugeriram que altas concentrações de plaquetas obtidas por protocolos de dupla centrifugação causam efeito inflamatório, resultando na diminuição da biossíntese (Kisiday et al., 2012). Baseados nestes dados, os autores sugerem que PRP obtido de protocolos com única centrifugação é mais apropriado, sobretudo para o uso intra-articular, uma vez que este método concentra menos leucócitos.

A função dos leucócitos em concentrados de plaquetas permanece controversa, uma vez que estas células contêm e produzem

citocinas, principalmente catabólicas ou inflamatórias e podem influenciar o resultado clínico da aplicação do PRP (Sundman et al., 2011). Além das citocinas ativas biologicamente (Sundman et al., 2011), os leucócitos produzem metaloproteinases de matriz (MMP) e Interleucina-1 β (Clutterbuck et al., 2010), podendo impedir a recuperação do tecido, aumentar a inflamação local e, por conseguinte, se tornar um componente não desejado no tratamento com PRP (Zimmermann et al., 2003; Castillo et al., 2011). Castillo et al. (2011) sugerem que a presença de leucócitos pode proporcionar uma maior capacidade imunomoduladora, podendo auxiliar na prevenção ou controle de infecção. É possível que os leucócitos aumentem as concentrações de FC através da estimulação da liberação destes pelas plaquetas. De acordo com Zimmermann et al. (2001), a concentração de WBC no PRP, pode ser responsável de um terço à metade da variação da concentração de FC. A infiltração de neutrófilos provoca a liberação de radicais de oxigênio livre durante a inflamação e tem sido demonstrado que desempenham um papel central em lesões dos tecidos isquêmicos.

A grande variação no tamanho das plaquetas, em comparação com outras células sanguíneas, mudança rápida de forma e tendência a aglutinar-se *in vitro*, torna menos confiável sua contagem em contadores tradicionais que usam impedância ou espalhamento de luz. O analisador hematológico automatizado ADVIA 120⁸, utiliza simultaneamente como parâmetro, o volume e a densidade das plaquetas, em uma avaliação célula-a-célula, utilizando dois ângulos de dispersão de luz laser. É considerado mais confiável para a contagem plaquetária, permitindo melhor discriminação entre as plaquetas de todos os tamanhos e outras células ou partículas (Kunicka et al., 2000). Além de

permitir uma contagem de plaquetas mais precisa do que analisadores de hematologia automatizados, o ADVIA 120⁸ oferece vários parâmetros, como o componente plaquetário médio (MPC), massa média de plaquetas (MPM), volume médio de plaquetas (MPV), plaquetócrito (PCT), amplitude de distribuição de plaquetas (PDW), amplitude de distribuição da massa de plaquetas (PMDW), macroplaquetas e agregados.

A determinação do MPC foi recentemente proposta como parâmetro de triagem válido para avaliação da ativação plaquetária. Este parâmetro representa o índice de refração médio e é rapidamente e facilmente medido por citometria de fluxo. Uma relação linear inversa foi demonstrada entre a densidade de plaquetas e o grau de ativação, uma vez que a densidade é reduzida quando as plaquetas degranulam, podendo indicar ativação (Ifrañ et al., 2005). O MPC foi avaliado em cães (Moritz et al., 2003; Moritz et al., 2005) e gatos (Zelmanovic e Hetherington, 1998) e mostrou valores inversamente proporcionais à expressão de P-selectina. A combinação de P-selectina e MPC foram eficazes na detecção da ativação de plaquetas em cães (Moritz et al., 2005).

Em um estudo para investigar as propriedades morfológicas e fenotípicas da ativação de plaquetas em equinos, centrada na expressão de CD62 (P-selectina) e mediada pela interação plaquetas-leucócitos, observou-se que 20-25% das plaquetas em repouso tinham a expressão constitutiva de P-selectina. Atribui-se isto a estímulos prévios por leucócitos, o que dificulta a avaliação da ativação por este marcador em equinos (Lalko et al., 2003). O contrário ocorre em seres humanos, onde a P-Selectina é expressa apenas sob estimulação, servindo como um marcador confiável da ativação plaquetária (Furie et al., 2001). Segura et al. (2007), na avaliação de potros e cavalos adultos com coagulação intravascular disseminada (condição que

⁸ Bayer Corporation

ativa as plaquetas), observaram que o MPC pode ser utilizado como uma rápida e fácil forma de detectar plaquetas ativadas em animais doentes. No entanto, mais estudos são necessários.

O objetivo da presente investigação foi validar um novo sistema comercial fechado de tubos, para obtenção do PRP em equinos, usando simples centrifugação, comparando duas velocidades de centrifugação e dois anticoagulantes, e determinar as concentrações de TGF- β 1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo *Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universitat Autònoma de Barcelona*, Espanha.

Animais

Para este estudo foram utilizados seis cavalos, clinicamente saudáveis no momento da coleta de sangue, cinco fêmeas e um macho, com idades entre seis e 14 anos, de diferentes raças.

Método do sistema fechado de tubos⁹

A coleta de sangue para a realização do hemograma foi obtida puncionando assepticamente a veia jugular, utilizando o sistema a vácuo¹⁰ em um tubo com 1,0mL de EDTA¹¹. Para a obtenção do PRP, 9,0mL de sangue foram coletados em quatro seringas contendo 1mL do anticoagulante, sendo duas com ACD (citrato trissódico - 22g / l, ácido cítrico (8 g / L) e dextrose (24,5 g / L)¹² e duas com Citrato de Sódio 8%¹³ e então homogeneizado por inversão lenta das

seringas. Em seguida, procedeu-se a transferência do sangue com o anticoagulante da seringa para o tubo multifuncional da Proteal® que contém uma agulha com filtro para a saída do ar (Fig. 1A e 1B). Trata-se de um material composto por um multipolímero acrílico com suas paredes internas tratadas para não possuírem carga estática, garantindo assim a livre suspensão das plaquetas e sua não aderência à parede do tubo. Os dois tubos com sangue (um contendo ACD e o outro contendo CS), foram centrifugados a 133g durante 8 minutos e os outros dois tubos foram centrifugados a 360g durante 8 minutos. A centrifuga faz uma lenta desaceleração em 2 minutos de freio para evitar que as células voltem a se mesclar. De cada tubo foram extraídos 5,0mL de PRP por acoplamento de uma seringa *luer-lock*. Abaixando a parte externa da seringa o êmbolo sobe recuperando o PRP (Fig. 1C). O êmbolo do tubo multifuncional possui uma forma côncava (Fig. 1D), objetivando recuperar o menor número possível de leucócitos ao tocar a capa leucocitária.

O tempo de processamento para a obtenção do PRP pelo sistema fechado de tubos foi de aproximadamente 20 minutos. Após a obtenção do PRP, 0,5mL foi aliquoteado para análise do mesmo no citômetro de fluxo para contagem e parâmetros plaquetários, realizado no *Servei de Hematologia da Facultat de Medicina Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona*. Outra alíquota de 1,0mL foi separada para avaliar a ativação das plaquetas por citometria de fluxo e determinação de TGF- β por ELISA, no *Servei de Cultius Celulars, Producció d'Anticossos y Citometria (SCAC)* no Instituto de Biotecnologia e Biomedicina, da *Universitat Autònoma de Barcelona*.

⁹ Proteal®, Barcelona, Espanha

¹⁰ Venofix®, Melsungen, Alemanha

¹¹ Aquisel®, Barcelona, Espanha

¹² Venosafe, Leuven, Bélgica

¹³ Becton Dickinson Company®, Madrid,

Espanha

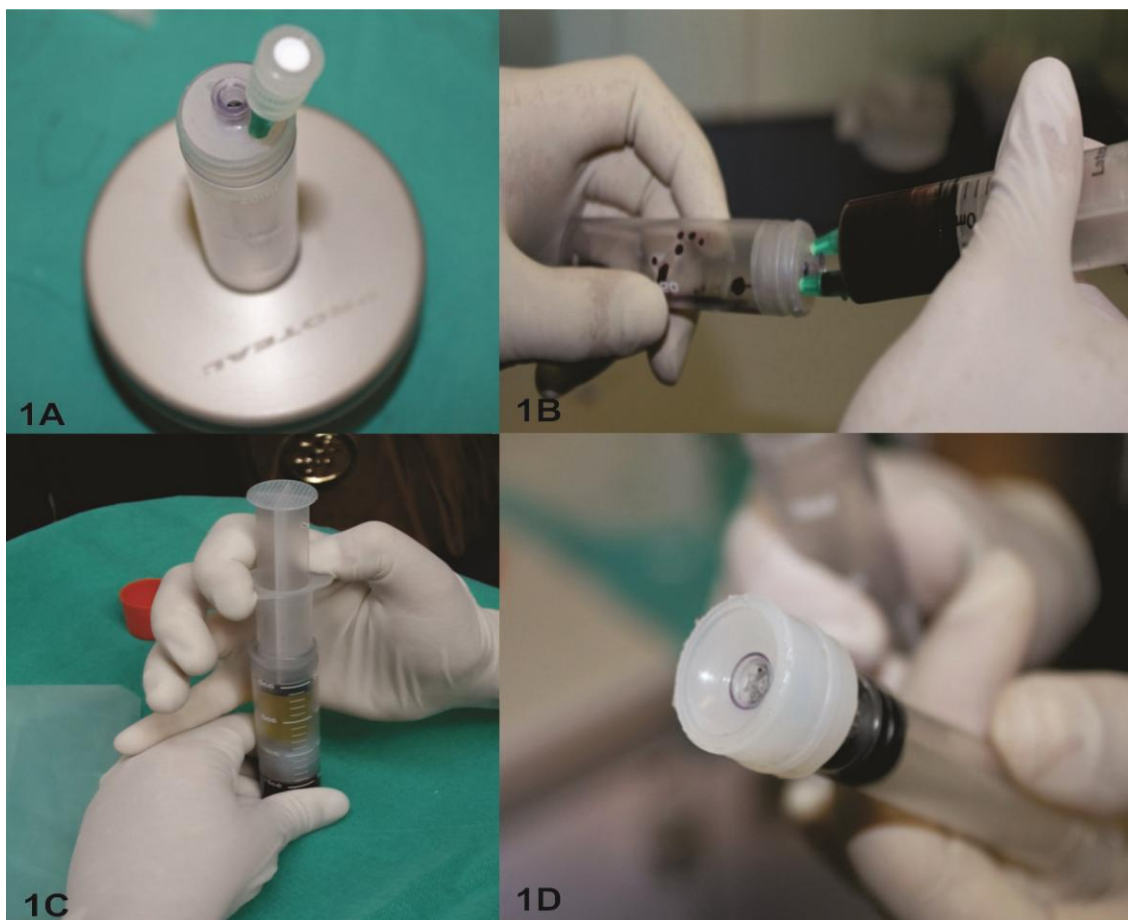


Figura 1: Sistema comercial fechado de tubos da Proteal®. Observa-se a agulha com filtro para a saída de ar (1A); transferência do sangue da seringa para o tubo multifuncional do sistema fechado de tubos (1B); obtenção do PRP pressionando a parte externa da seringa para baixo (1C); êmbolo do tubo multifuncional de formato côncavo (1D).

Parâmetros plaquetários

Foi realizado hemograma completo de cada amostra utilizando o analisador ADVIA 120®¹⁴. Trata-se de um citômetro de fluxo que usa laser duplo, tornando os resultados mais confiáveis e precisos. Foram obtidos os parâmetros tais como contagem total de plaquetas (PLT), eritrócitos, leucócitos e plaquetas agregadas (CLUMPS), plaquetócrito (PCT), volume médio de plaquetas (MPV), componente médio de plaquetas (MPC) e sua amplitude de distribuição (PDW), massa média de

plaquetas (MPM) e amplitude de distribuição (PMDW).

Determinação da concentração de TGF-β1 por Elisa

A quantificação de TGF-β no PRP foi realizada por ELISA tipo sanduíche, com ativação do PRP com gluconato de cálcio 10%, centrifugado a 1500g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e imediatamente congelado para posterior utilização no ELISA.

Foram utilizados anticorpos comerciais (DuoSet ref. DY240¹⁵). Como anticorpo de captura foi utilizado um anticorpo de rato

¹⁴Bayer Lab., Nova Iorque, United States.

¹⁵ R & D Systems, United States.

específico para TGF- β 1 humano, e como anticorpo de detecção, foi utilizado anticorpo de galinha específico de TGF- β 1 humano que se encontra biotinilado. O *kit* ELISA utilizado já havia sido padronizado para uso em equinos (Argüelles et al., 2006). O TGF - β 1 foi ativado para liberar o pró-peptídeo amino-terminal (peptídeos associados à latência) e a proteína de ligação a que está ligada por dissulfureto com o formador TGF - células secretoras inativas complexas. Esta ativação foi realizada pela adição de 100uL de tampão de ativação (2,5 N em ácido acético (Ref. 010520¹⁶), 10M de uréia (Ref. L - 5128¹⁷), no mesmo volume de plasma, homogeneizado e incubado à temperatura ambiente durante 10 min. O pH da amostra foi neutralizado com 100uL de tampão de neutralização (NaOH 2,7M (Ref. 141687,1211¹⁸)/HEPES 1M (ref. H3375¹⁹). Para o ensaio, foram obtidas diferentes diluições das amostras ativadas com tampão de diluição (1,4% de albumina de soro bovino, ref. 10735078001²⁰), 0,05 % de Tween 20 (Ref. 170-6531²¹) em PBS.

Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados por um *software* comercial (SPSS Inc., Illinois, EUA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As comparações estatísticas foram analisadas por análise de variância (ANOVA), e as comparações foram realizadas por meio do teste de Tukey para determinar as diferenças entre as variáveis com distribuição normal e as variáveis com distribuição normal após transformação logarítmica post-hoc ($x + 1$). Para as variáveis que não apresentavam distribuição normal, foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis e comparações post-

hoc entre dois grupos, utilizando o teste de Wilcoxon. A significância estatística foi aceita para valores de $p < 0,05$. As amostras em EDTA foram retiradas das análises estatísticas para se comparar os protocolos.

RESULTADOS

Análises do PRP

Independentemente do anticoagulante utilizado, foi observada maior recuperação de plaquetas utilizando a velocidade de centrifugação de 133g por 8 minutos. Observou-se aumento de 1,59 vezes de plaquetas em comparação com o valor inicial no sangue total.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os protocolos para os parâmetros do MPV, MPC e aglomerados, mas estes diferiram ($p < 0,05$) do sangue total. No entanto, foi observada correlação negativa alta (80%) para estes dois parâmetros.

Na concentração de leucócitos, foi observada diminuição com o aumento da velocidade de centrifugação. As contagens de células no sangue total e o PRP estão apresentados na Tab.1.

Análises do TGF- β 1

Para a análise do TGF- β 1 não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) entre os protocolos avaliados. As contagens de TGF- β 1 estão apresentadas na Tab.2.

DISCUSSÃO

A relevância do método descrito consiste na eficácia do sistema fechado de tubos em concentrar plaquetas, a baixa velocidade e com uma única centrifugação, obtendo-se um PRP pobre em leucócitos, utilizando técnica simplificada e segura.

PRP contendo aumento de menos de duas vezes os níveis de plaquetas em comparação com o sangue total pode ser obtidos através de um protocolo de centrifugação simples e pode ser recuperado todo o plasma sobrenadante (Tamimi et al., 2007). No

¹⁶ Probus, Barcelona, Espanha.

¹⁷ Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanha.

¹⁸ Panreac, Barcelona, Espanha.

¹⁹ Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanha.

²⁰ Roche, Barcelona Espanha.

²¹ Bio-Rad, Barcelona Espanha.

sistema avaliado, foi possível recuperar aproximadamente 1,6 vezes a quantidade de plaquetas do sangue total, usando rotação de 133g por 8 minutos.

Nos protocolos em que são usadas duas centrifugações, é possível concentrar mais plaquetas (Nagata, 2010), porém ainda não está estipulada a quantidade ideal de plaquetas a serem utilizadas em uma lesão. Outro sistema comercial de obtenção de PRP, utilizando filtros ao invés de centrifugação concentrou as plaquetas, 6,9 vezes o valor comparado ao sangue total (Castelijns et al., 2011), porém, vale ressaltar que com o aumento da quantidade de plaquetas, também há aumento da

quantidade de leucócitos (Zimmermann et al., 2001) e estas células podem levar a resultados insatisfatórios na terapia com PRP. Kisiday et al. (2012) avaliaram os efeitos anabólicos e catabólicos do PRP obtido com a centrifugação simples e dupla, em explantes de cartilagem de menisco e sugeriram cautela para uso do PRP obtido com dupla centrifugação para uso em articulação, uma vez que foram observadas concentrações de aproximadamente 400 vezes mais células brancas. O sistema comercial avaliado diminuiu significativamente a contagem de células brancas do sangue, podendo ser considerada a sua utilização em articulações.

Tabela 1: Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas em amostras de sangue total e PRP.

VARIÁVEIS	Sangue total em EDTA (n=6)		Centrifugação à 133g / 8 minutos				Centrifugação à 360g / 8 minutos			
			CS (n=6)		ACD (n=6)		CS (n=6)			
	X	EP	X	EP	X	EP	X	EP	X	EP
PLT (fc x 10 ³ /μL)	165,50	26,75	245,00 ^a	18,48	262,50 ^a	18,31	131,67 ^b	19,98	155,83 ^b	22,42
MPV (fL)	8,10	0,38	12,27	0,77	11,47	0,40	11,55	0,73	11,62	0,55
MPC (g/dL)	23,53	1,42	18,05	0,96	18,15	0,51	17,62	0,99	17,47	0,70
PCDW (g/dL)	8,45	0,51	7,87	0,25	7,58	0,11	7,75	0,24	7,40	0,20
MPM (pg)	1,86	0,04	1,81 ^a	0,03	1,80 ^a	0,04	1,66 ^b	0,02	1,69 ^b	0,02
PMDW (pg)	0,63	0,02	0,57 ^a	0,01	0,56 ^a	0,02	0,51 ^b	0,01	0,51 ^b	0,01
LARGE (cell x 10 ³ /μL)	11,50	3,16	30,00 ^a	6,04	27,33 ^{ab}	5,16	12,33 ^b	2,22	14,17 ^b	2,02
CLUMPS	1327,17	661,72	38,0	5,91	41,67	3,46	115,33	80,28	41,0	9,42
RBC frag (cell x 10 ⁶ /μL)	0,03	0,003	0,03 ^a	0,003	0,04 ^a	0,002	0,02 ^b	0,003	0,02 ^b	0,003
WBC (cell x 10 ³ /μL)	7,77	0,90	0,09 ^a	0,04	0,07 ^a	0,04	0,01 ^b	0,002	0,02 ^b	0,003
NEUT (cell x 10 ³ /μL)	5,30	0,92	0,02 ^a	0,003	0,02 ^a	0,01	0,002 ^b	0,002	0,01 ^{ab}	0,003

PLT, plaquetas; MPV, volume médio de plaquetas; MPC, concentração média de plaquetas; PCDW, amplitude da distribuição da concentração média das plaquetas; MPM, massa média de plaquetas; PMDW, amplitude da distribuição da massa das plaquetas; LARGE, macroplaquetas; RBCFRAG, fragmentos de eritrócitos; CLUMPS, agregados; WBC, leucócitos; RBC, eritrócitos; NEUT, neutrófilos; EDTA, ácido etilendiamino tetra-acético; ACD, Ácido Cítrico-Citrato Trissódico-Dextrose; CS, Citrato de Sódio; g, gauss. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem (P<0,05).

Tabela 2: Valores médios e erro padrão de TGF-β1 em amostras de PRP.

VARIÁVEIS	Centrifugação à 133g / 8 minutos				Centrifugação à 360g / 8 minutos			
	CS (n=6)		ACD (n=6)		CS (n=6)		ACD (n=6)	
	X	EP	X	EP	X	EP	X	EP
PLT (fc x 103/μL)	245,00a	45,27	262,50a	44,84	131,67b	48,88	155,83b	54,91
TGF-β1 (ng/mL)	3942,92	719,47	3911,46	739,32	2864,17	303,72	2372,40	609,43
PT (mg/mL)	370,41	105,33	477,87	47,80	394,0	56,86	319,21	97,52
TGF-β1 (ng/mL) da PT	9,71	1,81	14,01	1,92	13,77	1,31	10,93	2,30

PLT, plaquetas; TGF-β1, fator de crescimento transformante-β1; PT, proteína total. ACD, Ácido Cítrico-Citrato Trissódico-Dextrose; CS, Citrato de Sódio; g, gauss. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem (P<0,05).

A qualidade do PRP está relacionada com a manutenção da integridade das plaquetas, o que previne a ativação espontânea e liberação dos FC no sobrenadante (Marx, 2004; Lei et al., 2009). As plaquetas podem ser ativadas por pipetagem excessiva, velocidade de centrifugação e utilização de instrumentos de metal (Schmitz et al., 1998). A utilização de única centrifugação, permite menor manipulação, menor erro humano no pipeteo e conseqüentemente menor ativação plaquetária. Parâmetros como o MPV, o MPC, a MPM e a PCDW estão associados à degranulação plaquetária, podendo refletir a qualidade do PRP (Moritz et al., 2005). Neste estudo, foi observado menor MPM nas amostras a 360g quando comparadas a 133g, sendo a velocidade de centrifugação um fator importante na manutenção da integridade.

O número de agregados não diferiu ($P>0,05$) entre os protocolos de obtenção do PRP e um número alto de agregados no sangue total obtido em EDTA, possivelmente por este anticoagulante não ser o ideal na manutenção da integridade das plaquetas.

Dugrillon et al. (2002) relataram que o número de plaquetas nem sempre é proporcional à quantidade de FC, corroborando com resultados, que não apresentaram diferença ($P>0,05$) na quantidade do FC avaliado, mesmo nos protocolos que diferiram em relação à concentração de plaquetas. Vale ressaltar que apesar de não haver diferença significativa entre os protocolos, à velocidade mais baixa de centrifugação os valores de TGF- β 1 são mais altos, possivelmente porque as plaquetas em velocidade mais baixa se ativam menos. A quantidade de TGF- β 1 neste estudo, foi maior do que a obtida por Vendruscolo et al. (2012) talvez porque estes autores não ativaram o PRP para a análise. No entanto, os valores obtidos por Argüelles et al. (2006) que não ativaram previamente as amostras, foram maiores, tanto no PRP

obtido com simples quanto no de dupla centrifugação.

CONCLUSÕES

O sistema comercial avaliado para a obtenção do PRP em equinos, utilizando simples centrifugação foi eficaz. O protocolo a 133g durante oito minutos foi melhor para concentrar plaquetas e conferir melhor qualidade ao PRP, pois apresentou maior MPM e PMDW, não havendo diferença entre os anticoagulantes utilizados.

Os níveis de TGF- β 1 obtido pelo sistema fechado de tubos, podem ser considerados aceitáveis para se alcançar efeitos biológicos na aplicação clínica do PRP.

CONFLITO DE INTERESSE

A autora declara que não houve conflito de interesse.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a CAPES, do Governo Brasileiro pela concessão de bolsa para estudo no exterior e ao Instituto de Terapia Regenerativa de Tecidos da *Universitat Autònoma de Barcelona*, Espanha.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb Haemost**, v.91, p.4-15, 2004.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J. et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. **Res Vet Sci**, Oct, v.81, p.237-245, 2006.

- BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T.; DE GROOT, M. W. et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. **J Orthop Res**, Feb, v.28, p.211-217, 2010.
- CARMONA, J. U.; LOPEZ, C. Questions statistical power of study on release of growth factors from platelet-rich plasma. **Am J Vet Res**, Aug, v.72, p.998-999, 2011.
- CASTELIJNS, G.; CRAWFORD, A.; SCHAFFER, J. et al. Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. **Vet Comp Orthop Traumatol**, v.5, p.363-369, 2011.
- CASTILLO, T. N.; POULIOT, M. A.; KIM, H. J. et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. **Am J Sports Med**, v.39, p.266-271, 2011.
- CLUTTERBUCK, A. L.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D. et al. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **Vet J**, v.183, p.27-38, 2010.
- DELONG, J.M.; BEITZEL, K.; MAZZOCCA, A. D. et al. Update on platelet-rich plasma. **Current Orthop Practice**, v.22, p.514-523, 2011.
- DUGRILLON, A.; EICHLER, H.; KERN, S. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v.31, p.615-619, 2002.
- EHRENFEST, D. M. D.; CHOUKROUN, J. PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC... How to find your way in the jungle of platelet concentrates? **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod**, v.103, p.305-306, 2007.
- EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte – and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v.27, p.158-167, 2009.
- EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **J ExtraCorporeal Technol**, v.38, p.174-187, 2006.
- FURIE, B.; FURIE, B. C.; FLAUMENHAFT, R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signaling and cell adhesion. **Thromb Haemost**, v.86, p.214-221, 2001.
- IFRAN, A.; HASIMI, A.; KAPTAN, K. et al. Evaluation of platelet parameters in healthy apheresis donors using the ADVIA 120TM. **Transfus Apher Sci**, v.33, p.87-90, 2005.
- KISIDAY, J. D.; WAYNE, McIIWRAITH, RODKEY, W. G. et al. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. **Cartilage**, v.28, p.1-10, 2012.
- KUNICKA, J.E.; FISCHER, G.; MURPHY, J. et al. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. **Am J Clin Pathol**, v.114, p.283-289, 2000.
- LALKO, C. C.; DEPPE, E.; ULATOWSKI, D. et al. Equine platelet CD62P (P-selectin) expression: a phenotypic and morphologic study. **Vet Immunol Immunopathol**, v.2, p.119-134, 2003.
- LEI, H.; GUI, L.; XIAO, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. **Clin Biochem**, v.42, p.1452-1460, 2009.
- MACEY, M.; AZAM, U.; MCCARTHY, D. et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120

- hematology system. **Clin Chem**, v.48, p.891-899, 2002.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its usage. **J Oral Maxillofac Surg**, v.62, p.489-496, 2004.
- MORITZ, A.; WALCHECK, B. K.; WEISS, D. J. Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. **Vet Clin Pathol**, v.32, 6-12, 2003.
- 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.**, Feb, v.66, p.325-329, 2005.
- NAGATA, M. J. H.; MESSORA, M. R.; FURLANETO, F. A. C. et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. **European J Dentistry**, v.4, p.395-402, 2010.
- OLEZA, I. A. La terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencias clínicas y bioquímicas que validan su utilización. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Veterinària. 2009, 250p., PhD (Thesis de Doutorado en Medicina y Cirugía Animals).
- PIGNATELLI, P.; PULCINELLI, F.; CIATTI, F. et al. Effects of storage on in vitro platelet responses: comparison of ACD and Na citrate anticoagulated samples. **J Clin Lab Anal**, v.10, p.134-139, 1996.
- SEGURA, D.; MONREAL, L.; ARMENGOU, L. et al. Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. **J Vet Int Med**, v.21, p.1076-1082, 2007.
- SCHMITZ, G.; ROTHE, G.; RUF, A. et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function. **Thromb Haemost**, v.79, p.885-896, 1998.
- SILVA, R.; REZENDE, C.; PAES-LEME, F. et al. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. **Arch Med Vet**, v.43, p.95-98, 2011.
- SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet rich plasma. **Am J Sports Med**, v.39, p.2135-2140, 2011.
- TAMIMI, F. M.; MONTALVO, S.; TRESGUERRES, I. et al. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma, **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, p.1084-1093, 2007.
- VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em medicina equina. **Pesq Vet Bras**, n.32, 106-110, 2012.
- WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. G.; HAFNER, G. et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. **J Cranio-Maxillofacial Surg**, v.30, p.97-102, 2003.
- ZELMANOVIC, D.; HETHERINGTON, E. J. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. **Vet Clin Pathol**, v.27, p.2-9, 1998.
- ZIMMERMANN, R.; JAKUBIETZ, R.; JAKUBIETZ, M. et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. **Transfusion**, v.41, p.1217-1224, 2001.
- ZIMMERMANN, R.; ARNOLD, D.; STRASSER, E. et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. **Vox Sang**, v.85, p.283-289, 2003.

6. CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO SIMPLES CENTRIFUGADO PARA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM JUMENTOS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi padronizar um método manual de obtenção de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em jumentos, reduzindo de maneira significativa a recuperação de leucócitos, utilizando simples centrifugado. O sangue total foi extraído de seis jumentos da raça catalana, utilizando ACD como anticoagulante e processado mediante única centrifugação a 133g, comparando dois tempos de centrifugação (10 e 15 minutos). As amostras de PRP foram avaliadas por citometria de fluxo e o fator de crescimento TGF- β 1 foi avaliado pelo método ELISA. O protocolo a 10 minutos foi melhor, devido à maior liberação do TGF- β 1, permitiu concentrar as plaquetas em 2,06 vezes e baixar os leucócitos em aproximadamente 15 vezes o valor inicial. O valor obtido para o TGF- β 1 foi de 6.044,79ng/mL, apresentando níveis aceitáveis e potencial terapêutico para futuras aplicações na espécie.

Palavras-chave: jumento, Plasma Rico em Plaquetas (PRP), ACD, TGF- β

ABSTRACT

The aim of this study was to standardize a manual method of preparation of platelet-rich plasma (PRP) in donkeys using a simple tube centrifugation in order to reduce significantly the yield of leukocytes. The whole blood was drawn from six Catalonian donkeys using acid citrate dextrose (ACD) as anticoagulant, and processed through a single centrifugation at 133g for two different centrifugation times (10 and 15 minutes). The PRP samples were evaluated by flow cytometry and the TGF- β 1 concentration was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The 10-minutes protocol was considered better, since it resulted in a greater release of TGF- β 1, a 2.06 times increase in the platelets concentration and a 15 times reduction in the leukocytes concentration as compared to the initial values. In this protocol, the final concentration of TGF- β 1 was 6044.79ng/mL, which has an acceptable therapeutic potential for future uses in this specie.

Keywords: Donkey, Platelet-rich Plasma (PRP), ACD, TGF- β 1

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos os jumentos ocuparam um papel importante como animais de trabalho, sendo uma ferramenta indispensável para as tarefas do campo (Jordana e Folch, 1996). O jumento catalão

é uma das raças em maior risco de extinção no mundo (Gutiérrez et al., 2005). O desenvolvimento econômico da Catalunia favoreceu o conhecimento do “burro catalão” em outros países, onde posteriormente colaborariam com a formação e melhoramento de outras raças asininas, como o jumento do Kentucky nos

Estados Unidos, sendo apreciado principalmente por suas características fenotípicas e seu temperamento (Jordana e Folch, 1996). Entretanto, a industrialização e tecnificação do campo provocou uma queda drástica do censo asinino nos anos 80 (Hall e Ruane, 1993). Por isso, se fez necessário em 1994 a formação do “Programa de Conservación y Mantenimiento de los recursos genéticos animales” na raça “Guarà Català”, promovido e financiado pela prefeitura da Catalunia em colaboração com a Faculdade de Veterinária de Barcelona (Jordana et al., 1998; López, 1998). A preservação da espécie é considerada um patrimônio genético do país (Jordana e Folch, 1996).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado autólogo de plaquetas que vem sendo proposto como um agente essencial para aumentar a capacidade regenerativa dos tecidos lesados (Anitua et al., 2012), sobretudo em fases subagudas. O PRP é obtido de maneira fácil e econômica a partir do sangue total coletado em anticoagulante e, então, centrifugado para se obter maior concentração de plaquetas (Anitua et al., 2004; Argüelles et al., 2006; Everts, 2006; Oleza 2009). Na Medicina e na Veterinária, o PRP é utilizado em diferentes áreas da clínica e cirurgia. Na medicina equina existem relatos do uso do PRP para o tratamento de enfermidades articulares degenerativas (Carmona et al., 2007; Carmona et al., 2009), em forma de gel para o tratamento de lesões de pele (Carter et al., 2003), tendinites (Argüelles et al., 2008; Maia 2008), lesões de ligamentos (Rindermann et al., 2010), assim como lesões na articulação do ombro e em laminite (Carmona et al., 2012).

Os fatores de crescimento estão presentes nos grânulos alfa (α) das plaquetas e são as moléculas de interesse na obtenção de PRP, uma vez que operam na modulação da inflamação e na reparação dos tecidos, apresentam propriedades quimiotáticas, mitogênicas, proliferativas, de

diferenciação celular (Sunitha, 2008), neovascularização e deposição de matriz extracelular (Anitua et al., 2004; Argüelles et al., 2006; Everts 2006; Oleza 2009). Estão presentes principalmente sete fatores de crescimento, dentre eles: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1), TGF- β 2, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-I) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (Anitua et al., 2005; Weibrich et al., 2005). O TGF- β é considerado como potente regulador da inflamação (Argüelles et al., 2006; Ehrenfest et al., 2006; Yoshinaga et al., 2008; Carmona et al., 2009) e como agente analgésico, já que inibe a expressão de fatores nucleares e bloqueia a ação de metabolitos proinflamatórios (Argüelles et al., 2006; Carmona et al., 2008). O TGF- β 1 é o agente mais potente entre todas as citocinas (Ehrenfest et al., 2006), e é como sentinela para documentar o aumento da concentração dos outros fatores de crescimento (Visser et al., 2009).

A desvantagem do PRP é a falta de padronização no preparo, e como consequência, a obtenção de PRP de cor, volume e concentração variável de plaquetas, leucócitos, fatores de crescimento e outros tipos celulares, o que pode refletir em resultados clínicos insatisfatórios (Ehrenfest et al., 2007; Ehrenfest et al., 2009; Lei et al., 2009; Silva y Sampaio, 2009). Por outro lado, é importante considerar que as características do sangue são determinadas para cada espécie e, portanto, os protocolos de obtenção e processamento do PRP tem de ser espécie-específicos com a finalidade de diminuir a variabilidade nos resultados e aumentar as possibilidades de êxito desta técnica.

Existem poucos estudos que documentem a elaboração e a composição do PRP e por isso torna-se difícil realizar estudos

comparativos e extrapolar a eficácia clínica. Até o momento, não foi encontrado na literatura nenhum protocolo de PRP em jumentos.

O objetivo deste estudo foi padronizar um método manual de obtenção do PRP em jumentos, concentrando plaquetas e diminuindo de maneira significativa o número de leucócitos, comparando dois tempos de centrifugação, para que possa posteriormente ser utilizado como uma terapia para tratar algumas enfermidades nesta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo *Comité de Ética y Experimentación Animal* da *Universitat Autònoma de Barcelona*, na Espanha.

Animais

Para este estudo foram utilizados seis jumentos da raça catalana (cinco fêmeas e um macho, de idades entre seis e 14 anos), clinicamente hígdos no momento da coleta de sangue.

Método para obtenção do PRP

Procedeu-se à extração de sangue puncionando asépticamente a veia jugular, utilizando o sistema do tipo Vacutainer (Venosafe²²), com agulha 23G. Uma amostra de sangue foi depositada em um tubo de 1mL com EDTA para realização de hemograma, e para a obtenção do PRP, o sangue foi depositado em dois tubos com capacidade para 8,5mL, contendo 1,5mL de solução anticoagulante de ACD²³ (Citrato de trissódio – 22,0g/L; ácido cítrico (8,0g/L) e dextrose (24,5g/L). Após coleta,

o sangue foi homogenizado movendo-se o tubo por inversão de forma lenta.

O protocolo utilizado em equinos foi testado em jumentos (dados não publicados), porém, não foi possível obter uma boa separação do sangue, provavelmente devido à diferença na velocidade de hemossedimentação entre as espécies. Portanto, o PRP foi preparado pelo método de tubo, utilizando simples centrifugado, sendo um tubo à velocidade de centrifugação de 133g, durante 10 minutos e o segundo tubo à 133g, durante 15 minutos. De cada tubo, se extraíram 2,0mL da fração do plasma, utilizando uma câmara de fluxo laminar com agulha espinhal²⁴ 18G. A ponta da agulha foi introduzida até aproximadamente 4mm acima da capa leucocitária com a finalidade de recuperar e concentrar as plaquetas, obtendo o menor número de leucócitos possível.

Uma vez obtido o PRP, separou-se uma amostra de 1,0mL para contagem e avaliação de parâmetros das plaquetas, mediante citometria de fluxo no *Servicio de Hematología* da *Escuela de Veterinaria* da *Universitat Autònoma de Barcelona*. A amostra restante de PRP foi centrifugada a 1000g para sedimentar as plaquetas e o sobrenadante foi então congelado imediatamente a -20°C, para posterior utilização em ensaios ELISA para a determinação de TGF-β1 no *Servei de Cultius Cel lulars, Producció d'Anticossos i Citometria (SCAC)* do *Instituto de Biotecnologia y Biomedicina* da *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Contagem e parâmetros das plaquetas

O hemograma de cada amostra foi realizado utilizando o analisador ADVIA 120®²⁵, um citômetro de fluxo que utiliza dois feixes de

²² Venosafe, Leuven, Belgium.

²³ Becton Dickinson, Jersey, United States.

²⁴ Becton Dickinson, Madrid, Espanhan.

²⁵ Bayer Lab, New York, United States.

lazer, permitindo contrastar o mesmo valor, com a finalidade de prover resultados mais precisos e confiáveis. Foram obtidos parâmetros eritrocitários, leucocitários e plaquetários, como contagem total de plaquetas (PLT), plaquetócrito (PCT), volume plaquetário médio (MPV), componente plaquetário médio (MPC) e sua amplitude de distribuição das plaquetas (PDW), massa média das plaquetas (MPM) e sua amplitude de distribuição (PMDW), plaquetas grandes e agregados (CLUMPS).

Determinação da concentração dos fatores de crescimento por ELISA

A quantificação dos fatores de crescimento TGF- β 1, PDGF, FGF, IGF e VEGF foi realizada mediante ELISA. Utilizaram-se os anticorpos comerciais (DuoSet ref. DY240²⁶). Para a determinação do TGF- β 1 foi utilizado anticorpo de captura de rato específico do TGF- β 1 humano, e como anticorpo de detecção, um anticorpo de galinha específico do TGF- β 1 humano que se encontra biotinilado. Também foram utilizados padrões de TGF- β 1 recombinante humano para montagem da curva padrão. Em estudos prévios pelo nosso grupo de pesquisa foi comprovado o uso deste *kit* em cavalos (Argüelles et al., 2006), mas ainda não havia sido comprovado o seu uso em jumentos.

Para a quantificação dos fatores de crescimento mediante ELISA, foi necessária a ativação prévia das amostras para que ocorresse a liberação dos pró-peptídeos amino-terminais (latency-associated peptides) e da proteína de união com as pontes dissulfuro, formando o complexo de TGF- β 1 inativo secretado pelas células. Esta ativação foi realizada *in vitro*, acrescentando 100 μ l de tampão de ativação (ácido acético 2.5N (Ref. 010.520²⁷) e uréia 10M (Ref. U-5128²⁸), no

mesmo volume de plasma. Após homogeneização, foi incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos. O pH da amostra foi neutralizado com 100 μ l de tampão de neutralização (NaOH 2.7M (Ref. 141687.1211²⁹) / HEPES 1M (ref. H3375³⁰). Para o ensaio, foram obtidas diferentes diluições das amostras ativadas com o tampão de diluição (albumina sérica bovina 1,4%, Ref. 10735078001³¹), Tween 20 0,05% (Ref. 170-6531³²), em PBS.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com um *software* comercial (SPSS Inc., Illinois, EEUU). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. As comparações estatísticas foram analisadas mediante análise de variância (ANOVA) e as comparações *post-hoc* foram realizadas mediante prova de Tukey para determinar as diferenças entre as distintas médias que apresentaram distribuição normal, assim como das variáveis que apresentaram distribuição normal depois da transformação log (x+1). As variáveis que não apresentavam distribuição normal, após a transformação, foram analisadas mediante teste t de *student* e as comparações *post-hoc* mediante a prova de Wilcoxon. A significância estatística aceita foi de 95% (P <0,05).

RESULTADOS

Análise hematológica e determinação dos fatores de crescimento.

A contagem celular do sangue total e do PRP apresentou diferenças (P<0,05) em relação aos valores de PLT, MPV, MPC, PCDW, CLUMPS, WBC, RBC, NEU,

²⁶ R & D Systems, United States.

²⁷ Probus, Barcelona, Spain.

²⁸ Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain.

²⁹ Panreac, Barcelona, Spain.

³⁰ Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanha.

³¹ Roche, Barcelona, Spain.

³² Bio-Rad, Barcelona, Spain.

porém não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) entre os protocolos para a obtenção do PRP para estes parâmetros. A

concentração de TGF- β 1 foi superior no protocolo que utilizou menor tempo de centrifugação (Tab. 1).

Tabela 1: Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas nas amostras de sangue total (EDTA) e PRP (ACD) obtido por única centrifugação, em tubos convencionais.

Variável	Sangue total EDTA	PRP 133 g/ 10 minutos	PRP 133 g/ 15 minutos
PLT	196,66 + 51,42 ^b	406,5 + 27,29 ^a	479,50 + 75,05 ^a
MPV	8,38 + 0,44 ^b	11,25 + 0,27 ^{ab}	15,05 + 2,6 ^a
MPC	22,35 + 1,32 ^a	17,53 + 0,21 ^b	13,55 + 2,15 ^b
PCDW	7,58 + 0,22 ^a	7,16 + 0,1 ^b	5,20 + 1,14 ^b
PLTGRAN	8,161 + 3,29 ^a	35,16 + 5,35 ^a	154,50 + 85,64 ^a
RBCFRAG	0,02 + 0,006 ^a	0,04 + 0,003 ^{ab}	0,10 + 0,03 ^a
CLUMPS	1196,83 + 390,15 ^a	83,66 + 11,35 ^b	89,00 + 38,28 ^b
WBC	10,86 + 0,80 ^a	0,74 + 0,16 ^b	0,52 + 0,32 ^b
RBC	6,56 + 0,25 ^a	0,05 + 0,004 ^b	0,16 + 0,07 ^b
NEU	5,12 + 0,40 ^a	0,15 + 0,005 ^b	0,16 + 0,12 ^b
TGF BETA1 (pg/mL)	-	6044,79 + 417,91 ^a	5206,88 + 289,20 ^b
PROT (pg/mL)	-	876,03 + 112,65 ^a	661,47 + 66,27 ^b
TGF:PROT	-	14,68 + 1,64 ^a	12,79 + 1,25 ^b

PLT, plaquetas; MPV, volume médio de plaquetas; MPC, concentração média de plaquetas; PCDW, amplitude da distribuição da concentração média das plaquetas; PLTGRAN, plaquetas grandes; RBCFRAG, fragmentos de eritrócitos; CLUMPS, agregados; WBC, leucócitos; RBC, eritrócitos; NEU, neutrófilos; TGF BETA1, fator de crescimento transformante beta 1; PT, proteína total. Diferentes letras na mesma linha, diferem ($P<0,05$).

Os demais fatores de crescimento avaliados (PDGF, FGF, IGF, e VEGF) não apresentaram leitura na curva padrão.

DISCUSSÃO

Não foi encontrado na literatura nenhum protocolo referente à técnica da obtenção do PRP na espécie asinina, sendo este o primeiro estudo avaliando o PRP, incluindo a liberação do fator de crescimento TGF- β 1 pelas plaquetas em jumentos.

Os parâmetros hematológicos no sangue total se apresentaram conforme os parâmetros previamente descritos para a raça catalana (Martín, 2006). O ADVIA 120 ® além de permitir a contagem mais precisa das plaquetas que os analisadores hematológicos convencionais

automatizados, fornece parâmetros que podem ser relacionados ao estado de ativação das plaquetas. O MPV representa o tamanho, o MPC representa a densidade e o PCDW indica a variação na densidade, refletindo a presença das plaquetas no estado ativado e não ativado.

Não houve diferença ($P<0,05$) entre os tempos 10 e 15 minutos para a contagem plaquetária. O método utilizando velocidade de centrifugação a 133g durante 10 minutos foi capaz de concentrar as plaquetas em 2,06 e baixar em 15 vezes os leucócitos, enquanto o protocolo a 15 minutos foi capaz de concentrar as plaquetas em 2,44 vezes o valor inicial e baixar os leucócitos 20 em vezes o valor comparado ao sangue total. Segundo a classificação utilizada por Ehrenfest et al. (2011), os concentrados de plaquetas que contém 1,3 a 3 vezes o valor inicial de

plaquetas e valores similares ou mais baixos para os leucócitos são denominados puro plasma rico em plaquetas (P-PRP), podendo, este PRP obtido, ser considerado um P-PRP. Os valores médios obtidos na concentração de plaquetas de jumentos foram maiores que os reportados em equinos pelo método do tubo utilizando dupla centrifugação (Argüelles et al., 2006; Vendruscolo et al., 2012).

O PRP ideal deveria conter uma maior concentração de plaquetas viáveis e não ativadas, características expressas pela combinação do menor número de agregados, menor MPV, menor PCDW e maior MPC. Diante destas características, a centrifugação por 10 minutos seria mais efetiva em jumentos. Entretanto, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tempos de 10 e 15 minutos. Possivelmente, a variação individual, caracterizada pelo erro padrão da média e o coeficiente de variação, aponte para a necessidade de um maior número de animais, em estudos futuros. Porém, na análise crítica dos resultados referentes aos parâmetros plaquetários, o protocolo a 10 minutos foi melhor por apresentar menor MPV, maior MPC e PCDW, menor número de agregados e macroplaquetas, parâmetros estes associados à degranulação plaquetária, podendo refletir a qualidade do PRP.

Sabe-se que a porção do plasma mais rico em plaquetas está nos primeiros 2mm acima da capa leucocitária (Anitua et al., 2004; Weibrich et al., 2005), porém optou-se por aspirar o plasma 4mm acima da capa leucocitária com a finalidade de se recuperar o menor número possível de leucócitos, devido ao efeito destas células em aumentar as moléculas de sinalização catabólica (Sundman et al., 2011).

O número mais alto de agregados (*clumps*) no sangue total pode ser devido ao EDTA, uma vez que este anticoagulante é capaz de produzir dano estrutural e funcional nas

plaquetas (Macey et al., 2002; Silva et al., 2013).

Os demais fatores de crescimento avaliados (PDGF, FGF, IGF, e VEGF) não apresentaram leitura, possivelmente pela baixa homologia com o *kit* ELISA utilizado, por se tratar de *kits* para avaliação em humanos.

A diferença significativa ($P < 0,05$) observada na concentração do TGF- β 1, superior no protocolo a 10 minutos, mesmo contendo menos plaquetas nestas amostras, pode ser devido ao fato de estas, estarem viáveis e não ativadas em maior concentração no PRP a 10 minutos quando comparadas a 15 minutos. Ainda são necessários mais estudos sobre o aspecto da ativação plaquetária, uma vez que se busca o maior número de plaquetas viáveis e inativas (Marx, 2004; Carmona et al., 2011; Silva et al., 2011).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a metodologia empregada para a obtenção do PRP em jumentos, sob única centrifugação à 133g foi melhor a 10 minutos, sendo a técnica adequada para concentrar plaquetas e diminuir de maneira significativa os leucócitos, apresentando níveis de TGF- β 1 aceitáveis e potencial terapêutico para futuras aplicações na espécie.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a CAPES, do Governo Brasileiro pela concessão de bolsa para estudo no exterior e ao Instituto de Terapia Regenerativa de Tecidos da *Universitat Autònoma de Barcelona*, Espanha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb. Haemost.**, v.91, p.4-15, 2004.
- ANITUA, E.; ANDÍ, I.; SANCHEZ, M. 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, p.281-286, 2005.
- ANITUA, E.; PRADO, R.; SÁNCHEZ, M. et al. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. **Operative Techniques in Orthop**, v.22, p.25-32, 2012.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Vet Rec**, v.162, p.208-211, 2008.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J. et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. **Res Vet Sci**, v.10, p.237-245, 2006.
- CARMONA, J.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. Autologous platelet concentrates as an adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction. **J Equine Vet Sci**, v.41, p.1-5, 2012.
- CARMONA, J.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. **Arch Med Vet**, v.41, p.175-179, 2009.
- CARMONA, J.; ARGÜELLES, D.; PRADES, M. Niveles de factor de crecimiento transformante beta-3 y óxido nítrico en cuatro concentrados autólogos de plaquetas y plasma derivados de sangre equina. **Arch Med Vet**, v.40, p.155-160, 2008.
- CARMONA, J.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F. et al. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study. **J Equine Vet Sci**, v.27, p.167-170, 2007.
- CARTER, C.A.; JOLLY, D. G.; WORDEN, C. E. et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, Mississippi, v.74, p.244-255, 2003.
- EHRENFEST, D. M. D.; CHOUKROUN, J.; DISS, A. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution, **Oral surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod**, v.101, p.45-50, 2006.
- EHRENFEST, D. M. D.; CHOUKROUN, J. PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC... How to find your way in the jungle of platelet concentrates? **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod**, v.103, p.305-306, 2007.
- EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte – and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnol**, v.27, p.158-167, 2009.
- EHRENFEST, D. M. D.; BIELECKI, T.; MISHRA, A. et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. **Curr Pharm Biotechnol**, v.13, p.1131-1137, 2011.
- EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **J Extra Corporeal Technol**, v.38, p.174-187, 2006.
- GUTIÉRREZ, J. P.; MARMI, J.; GOYACHE, F. et al. Pedigree information

- reveals moderate to high levels of inbreeding and a weak population structure in the endangered Catalanian donkey breed. **J Anim Breed Genet**, v.122, p.378-386, 2005.
- HALL, S. J. G; RUANE, J. Livestock breeds and their conservation: a global overview. **Conservation Biol**, n.4, p.815-825, 1993.
- JORDANA, J.; FOLCH, P. The endangered catalonian donkey breed: The main ancestor of the American ass or mammoth. **J Equine Vet Sci**, v.10, p.436-441, 1996.
- JORDANA, J.; FOLCH, P.; CUENCA, R. Clinical biochemical parameters of endangered Catalanian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. **Res Vet Sci**, v.64, p.7-10, 1998.
- LEI, H.; GUI, L.; XIAO, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. **Clin Biochem**, v.42, p.1452-1460, 2009.
- LÓPEZ, P. F. Programa de conservació i manteniment de recursos genètics animals en la raça asinine catalane. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998, 170p. (Doctorat de Producció Animal).
- MACEY, M.; AZAM, U.; McCARTHY, D. et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system, **Clin Chem**, v.48, p.891-899, 2002.
- MAIA, L. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica. Universidade Federal de Viçosa. 2008. 78p. Dissertação, (Mestrado em Medicina Veterinária).
- MARTÍN, E. G. Caracterización morfológica, hematológica y bioquímica clínica en cinco razas asnales españolas para programas de conservación. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. 2006. 261p PhD Thesis. (Doctorado en Producción Animal)
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its usage. **J Oral Maxillofac Surg**, v.62, p.489-496, 2004.
- RINDERMANN, G.; CISLAKOVA, M.; ARNDT, G. Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. **J Vet Sci**, v.11, p.173-175, 2010.
- SILVA, A.; SAMPAIO, R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing? **Knee Surg, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v.17, p.676-682, 2009.
- SILVA, R.F.; SANTANA, G.C.; LEME, F. O. P. et al. Release of transforming growth factor beta 1 and platelet derived growth factor type AB from canine platelet gels obtained by the tube method and activated with calcium salts. **Arch Med Vet**, v.45, p.159-165, 2013.
- SILVA, R. F.; REZENDE, C. M. F.; PAES-LEME, F. O. et al. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. **Arch Med Vet**, v.43, p.95-98, 2011.
- SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet rich plasma. **Am J Sports Med**, v.39, p.:2135-2140, 2011.
- SUNITHA, R. V. Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. **Indian J Dental Res**, v.19, 2008.
- VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em medicina equina. **Pesq Vet Bras**, n.32, 106-110, 2012.

VISSER LC, ARNOCZKY SP, CABALLERO O, et al. Growth Factor-Rich Plasma Increases Tendon Cell Proliferation and Matrix Synthesis on a Synthetic Scaffold: An In Vitro Study. **Tissue Engineering** Part A, v.16, p.1021-1029, 2009.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.; HITZLER, W. E. et al. 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.29, p.118-123, 2005.

YOSHINAGA, K.; OBATA, H.; JURUKOVSKI, V. et al. Perturbation of transforming growth factor (TGF)- β 1 association with latent TGF-binding protein yields inflammation and tumors. **PNAS**, v.105, 2008.

7. CAPÍTULO IV

CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS

RESUMO

Avaliou-se o congelamento do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) de equinos, a -196°C em nitrogênio líquido, utilizando-se como crioprotetor o DMSO em duas concentrações (3% e 6%), utilizando-se como ponto final a avaliação morfologia e da agregometria plaquetária. Foram utilizadas 12 amostras de PRP em duas repetições. Previamente ao congelamento, as amostras foram submetidas a um resfriamento lento ($-0,07^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) até a temperatura final de $4-5^{\circ}\text{C}$. O PRP equino diluído em diluidor DMSO a 3%, resfriado lentamente a $4-5^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, congelado a -196°C em nitrogênio líquido apresentou percentual de ativação plaquetária de 43%, quando avaliada pela microscopia óptica, e aproximadamente, 35% do valor inicial de agregação plaquetária.

Palavras-chave: equino, Plasma Rico em Plaquetas (PRP), criopreservação, DMSO

ABSTRACT

The equine platelet-rich plasma (PRP) frozen at -196°C in liquid nitrogen using DMSO as a cryoprotectant in two different concentrations (3% and 6%) was evaluated, using the platelet morphology and aggregometry as the final parameters. Twelve PRP samples were used in two repetitions. The samples were submitted to slow cooling prior to frozen ($-0.07^{\circ}\text{C}/\text{minute}$) until they reached the temperature of $4-5^{\circ}\text{C}$. The equine PRP diluted in 3% DMSO, cooled slowly at $4-5^{\circ}\text{C}$ and subsequently frozen at -196°C in liquid nitrogen showed 43% of platelet activation, evaluated through optic microscopy, keeping approximately 35% of the initial platelet aggregation.

Keywords: Equine, platelet-rich plasma (PRP), cryopreservation, DMSO

INTRODUÇÃO

O armazenamento do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), incluindo a manutenção da viabilidade plaquetária e, assim, do seu efeito terapêutico tem sido uma alternativa para a ampliação desta terapia regenerativa. Há que se enfatizar que o tratamento envolve várias aplicações, tendo ainda como barreira, a necessidade do preparo da amostra a cada aplicação. Assim, a utilização do PRP criopreservado poderia ser uma grande alternativa, por eliminar a

necessidade de transporte do animal até os centros de referência, visando a realização da terapia.

A perda da viabilidade e função plaquetárias resultam de períodos prolongados de resfriamento (Connor et al., 1996) ou congelamento (Handin e Valeri, 1972). As plaquetas armazenadas sob tais condições diminuem a capacidade de agregação, em resposta ao estresse hipotônico, à retração do coágulo e à sua sobrevivência (Handin e Valeri, 1972; Connor et al., 1996; Reid et al., 1998). As PLT

passam da forma discoide para a esférica e emitem pseudópodes. Reid et al. (1999a) demonstraram que danos na membrana plaquetária, durante a estocagem, estão diretamente relacionados à perda de função.

Durante o resfriamento, as membranas passam do estado líquido para o estado de gel, resultando em menor capacidade de reorganização e, conseqüentemente ocorre perda da integridade (Reid et al., 1999a). Outra possibilidade considera que a porção polar dos fosfolipídios de membrana estão hidratados e, durante o congelamento, ocorre a desidratação e aumentando da densidade celular. Durante o processo de rehidratação (no descongelamento), essas membranas se tornam transitoriamente permeáveis, permitindo a liberação das substâncias contidas no seu interior e neste momento ocorre a lise osmótica das plaquetas (Crowe et al., 1998).

A criopreservação de concentrados plaquetários vem sendo estudada, utilizando-se como crioprotetor o Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% ou 6%, após a que tem sido armazenados à -80°C ou -150°C (Handin e Valeri, 1972; Valeri et al. 1974). O DMSO tem sido considerado o melhor crioprotetor de plaquetas de seres humanos (Lee e Blajchman, 2007). A adição do DMSO a 5% manteve a integridade da membrana no transcórre do congelamento (Reid et al., 1999b). Crowley et al. (1974) avaliaram a forma e estrutura de plaquetas após o congelamento, submetidas ao DMSO a 6% e observaram que um percentual de 60% das plaquetas mantiveram sua forma discóide característica, à microscopia eletrônica. Segundo Daly et al. (1979) o concentrado de plaquetas pode ser armazenado por mais de três anos, na presença do DMSO a 5% como crioprotetor e congelamento em vapor de nitrogênio líquido (-150°C), sem perda da função hemostática.

Recentemente, em estudo de criopreservação do PRP de equinos, não

foram observadas diferenças quanto ao número total, volume e ativação das plaquetas, avaliadas em microscopia óptica, entre amostras frescas e congeladas a -80°C, utilizando-se o DMSO a 6%, durante 14 dias (Kwirant, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar o congelamento do PRP de equinos, submetidas a duas concentrações de DMSO (3% ou 6%), em nitrogênio líquido a -196°C, tendo como ponto final a avaliação da morfologia e da agregometria plaquetária.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Clínica de Equídeos do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o protocolo nº294/2013.

Foram utilizados doze equinos sem raça definida, clinicamente saudáveis, sendo sete fêmeas e cinco machos, em faixa etária de dois a 16 anos, utilizando-se duas repetições por animal.

A coleta de sangue foi realizada por venopunção da jugular, utilizando tubos à vácuo contendo EDTA, para realização de hemograma, e em tubos contendo Citrato Sódico (CS) como anticoagulante, com capacidade de 4,5mL. O sangue em CS foi homogeneizado por inversão e posteriormente centrifugado a 133g durante oito minutos, acompanhados por dois minutos de frenagem. À seguir, aspirou-se 1,0mL da fração do PRP, 4mm acima da capa leucocitária, com auxílio de uma seringa de 10mL e catéter 14G, e transferido para microtubos previamente autoclavados.

Uma alíquota foi armazenada sem DMSO para avaliação no tempo zero (à temperatura ambiente). Nas demais

alíquotas, acrescentou-se concentrações de 3% (30µL) ou 6% (60µL) de DMSO. As amostras a serem avaliadas após seis horas de estocagem foram submetidas a um resfriamento lento até 4-5°C, a uma taxa de resfriamento de -0,07°C/minuto, em um contêiner desenvolvido para o transporte de sêmen equino (Palhares, 1997). Decorrido o tempo de seis horas, as amostras foram retiradas do contêiner e submetidas ao pré-congelamento ao vapor do nitrogênio durante 20 minutos, a 4cm acima do nitrogênio, sendo a seguir submersas no nitrogênio líquido à -196°C. Para análise das amostras congeladas, estas foram descongeladas, utilizou-se um descongelamento em água à 37°C, durante 90 segundos. As amostras de PRP foram avaliadas quanto à composição celular, morfometria e agregometria.

A contagem e o volume das plaquetas, a contagem de hemácias e de leucócitos foi avaliada em contador hematológico³³. As plaquetas foram, também, contadas em câmara de Neubauer. Para tanto, as amostras foram diluídas a 1:200 no líquido de Hess-Ecker e homogeneizadas durante 20 minutos. Após o preenchimento da câmara de Neubauer, com auxílio de tubo capilar para micro hematócrito, esta foi mantida em repouso, em placa de Petri com algodão umedecido durante 30 a 40 minutos. A contagem de plaquetas foi realizada nos 50 campos centrais da placa, sendo o valor obtido multiplicado por 1000.

De cada amostra do PRP foram produzidos dois esfregaços, corados pela técnica de Romanowski³⁴, para posterior avaliação morfométrica das plaquetas. O percentual de ativação plaquetária foi avaliado por microscopia óptica, adaptado da classificação proposta por Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990) para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão. Assim, plaquetas foram classificadas em

três estados morfológicos: 0- plaquetas normais (plaquetas alongadas); 1- estado de ativação brando ou incerto (plaquetas arredondadas); 2- plaquetas ativadas (plaquetas emitindo pseudópodes).

A avaliação da função plaquetária foi realizada por meio da agregometria, na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais - Hemominas. A agregação de plaquetas foi avaliada por um método turbidimétrico utilizando-se o agregômetro³⁵. Para este propósito, as amostras de PRP foram acondicionadas em cubetas de plástico siliconizadas, contendo um magneto para a homogeneização. Como agente agregante utilizou-se Adenosina Difosfato (ADP36), na concentração final de 1000µM, na proporção de 50µL de ADP para 450µL da amostra. Como parâmetro de agregação foi utilizado a agregação máxima durante o período de 600 segundos, após o início da ativação plaquetária com o agente agregante. O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi utilizado como o branco do sistema, sendo obtido após centrifugação do PRP à 1500g durante 15 minutos.

Os dados foram submetidos a um esquema fatorial 2 x 3, compreendendo duas concentrações de DMSO (3% ou 6%) e três momentos de avaliação, no transcórre do processo de congelamento, compreendendo o PRP a fresco, após o resfriado e após o descongelamento), utilizando-se doze animais e duas repetições por animal. As variáveis foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo teste SNK. Em persistindo a distribuição não paramétrica, após a transformação ($\log x + 1$ ou $\arcseno \sqrt{x}$), as médias foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis. As análises foram

³³ Diatron, Abacus Jr.

³⁴ Panótico, Laborclin, Pinhais, Brasil.

³⁵ PACKS-4 - Platelet Aggregation Chromogenic Kinetic System.

³⁶ Chrono-Log Corporation, Bio Top Medical, Havertown.

realizadas pelo programa *Statiscal Analyses System*, considerando-se a significância de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

A concentração plaquetária média foi de $154,96 \pm 6,57 \times 10^3 \text{PLT}/\mu\text{L}$, havendo diferenças ($P < 0,05$) entre os valores de plaquetas oriundos do PRP resfriado a 3% ou a 6%. Quando avaliado no contador automatizado, as amostras de PRP fresco ($174,04 \pm 6,76 \times 10^3 \text{PLT}/\mu\text{L}$) e congelado, tanto a 3% quanto a 6% de DMSO apresentaram maior concentração de plaquetas ($P < 0,05$) comparadas ao valor do PRP resfriado a 3% ou a 6%.

Valores superiores foram encontrados em todas as amostras, independentemente do tratamento, para as contagens plaquetárias ($P < 0,05$) avaliadas em câmara de Neubauer. A maior concentração de plaquetas foi observada nas amostras a fresco, em relação as resfriadas com 3% de DMSO e às amostras congeladas (Tab.1), independente do percentual de DMSO que por sua vez não diferiram ($P > 0,05$) entre si. Além disso,

a contagem plaquetária do PRP congelado, submetido a 6% de DMSO, diferiu ($P < 0,05$) dos outros quatro tratamentos avaliados.

A avaliação morfológica em microscopia óptica permitiu a mensuração do percentual de ativação plaquetária. Observa-se, na Tab.2, um menor percentual médio de ativação plaquetária nas amostras a fresco ($P < 0,05$), em relação às amostras tratadas com DMSO, excetuando-se a observada no tratamento PRP com 3% de DMSO e resfriada, com resultado similar. Adicionalmente, quando se considerou as plaquetas em estado de ativação incerta (plaquetas em estado de ativação reversível), observou-se um maior percentual, nas amostras resfriadas a 3%, cujos resultados diferiram ($P < 0,05$) dos observados no PRP fresco e nas amostras congeladas, independentemente do percentual de DMSO. Vale salientar, ainda, a similaridade ($P > 0,05$) entre os PRP resfriados, embora aquele resfriado com 6% de DMSO não tenha diferido ($P > 0,05$) de nenhuma das amostras avaliadas.

Tabela 1: Contagem manual de plaquetas no Plasma Rico em Plaquetas (PRP), em câmara de Neubauer (média \pm erro padrão).

	PRP Resfriado			PRP Congelado	
	PRP Fresco	3% de DMSO	6% de DMSO	3% de DMSO	6% de DMSO
Plaquetas	$272,0^a \pm$	$215,71^b \pm$	$138,38^c \pm$	$219,45^b \pm$	$192,29^b \pm$
($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11,69	11,10	10,55	16,28	13,75

Médias seguidas por letras diferentes, na linha, diferem ($p < 0,05$).

Tabela 2: Morfologia plaquetária no Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco, acrescidos de DMSO 3% ou 6%, resfriado lentamente e congelado a -196°C , (média \pm erro padrão).

Plaqueta	PRP Fresco	PRP Resfriado (%)		PRP Congelado (%)	
		3% de DMSO	6% de DMSO	3% de DMSO	6% de DMSO
Inativada	$23,83+1,58\text{Ba}$	$0,54+0,32\text{Cb}$	$0,5+0,24\text{Cb}$	$0,14+0,1\text{Cb}$	0Bb
Incerta	$56,0+2,14\text{Ab}$	$66,88+4,47\text{Aa}$	$60,63+3,27\text{Aab}$	$56,36+4,12\text{Ab}$	$46,0+5,97\text{Ab}$
Ativada	$20,17+2,8\text{Bc}$	$32,58+4,54\text{Bbc}$	$38,88+3,32\text{Bab}$	$43,5+4,17\text{Ba}$	$54,0+5,97\text{Aa}$

Plaqueta inativada, apresenta forma alongada ou discóide; Plaqueta incerta, plaqueta em estado incerto de ativação, apresenta forma arredondada; ativada, apresenta emissão de pseudópodes. Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si ($P < 0,05$).

A função plaquetária, avaliada pela capacidade de agregação máxima alcançada dentro de um período de 600 segundos, foi superior ($P < 0,05$) nas amostras a fresco, em relação a todas as amostras avaliadas, que

não diferiram entre si ($P > 0,05$), excetuando-se o PRP resfriado com 3% de DMSO cujos valores foram superiores ($P < 0,05$) aos demais tratamentos (Tab.3).

Tabela 3: Percentual máximo de agregação plaquetária, realizada na presença de ADP como agente agregante (média \pm erro padrão).

	PRP Fresco	PRP Resfriado		PRP Congelado	
		3% de DMSO	6% de DMSO	3% de DMSO	6% de DMSO
Média	71,89 \pm 3,47 ^a	40,63 \pm 4,0 ^b	25,24 \pm 3,6 ^c	23,73 \pm 2,49 ^c	22,98 \pm 2,57 ^c
Mediana	77,5	36,60	22,95	24,10	20,45
Mínimo	27,7	11,80	0	7,70	3,20
Máximo	92,7	90,90	73,60	60,50	47,70
CV	23,61	48,29	69,84	50,30	54,72

Médias seguidas por letras diferentes, diferem ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon).

Na Tab.4 estão apresentados os percentuais de redução da agregação máxima, considerando-se o PRP fresco como valor inicial (100%). Não foram observadas

diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos para esta variável, embora todos tenham diferido ($P < 0,05$) dos valores do PRP fresco.

Tabela 4: Percentual de redução da agregação plaquetária máxima inicial, considerando o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco como valor inicial, realizada na presença do ADP 10% como agente agregante.

	Fresco	Resfriado 3%	Resfriado 6%	Congelado 3%	Congelado 6%
Média	100,0 ^a	56,50 ^b	34,04 ^b	35,10 ^b	33,77 ^b
Erro Padrão	0	4,57	5,08	4,48	4,38
Mediana	100,0	53,18	32,25	31,97	28,79
Mínimo	100,0	22,71	0	8,31	3,58
Máximo	100,0	99,32	125,60	103,24	97,15
CV	0	39,64	73,16	61,24	63,49

Médias seguidas por letras diferentes diferem ($p < 0,05$ - Teste de Wilcoxon)

DISCUSSÃO

Na ausência da citometria de fluxo verificou-se, no presente estudo, que a contagem plaquetária em câmara de Neubauer apresentou-se como um método confiável de grande relação custo benefício. Vale enfatizar, neste momento, o elevado custo do citometro de fluxo e a necessidade de constante padronização, que junto limitam o seu uso rotineiro e aplicação

comercial em procedimentos de baixo valor agregado. A técnica manual também foi escolhida por Vendruscolo et al. (2012), quando da avaliação de diferentes protocolos de obtenção do PRP descritos na literatura.

As plaquetas são contadas individualmente, quando da contagem manual. Por outro lado, os equipamentos automáticos podem identificar agregados de plaquetas como uma única plaqueta, podendo subestimar os

valores encontrados (Marx, 2000). Além disso, vale salientar a maior contagem plaquetária observada em câmara de Neubauer, nas amostras congeladas, em relação às amostras resfriadas com 6% de DMSO. As amostras de PRP congeladas apresentaram maior concentração de plaquetas ($P < 0,05$) quando comparadas às amostras resfriadas, na contagem pela técnica de impedância e maior contagem de plaquetas ativadas observadas na microscopia óptica. Entretanto, os achados não coincidem entre as técnicas de contagem manual das plaquetas. Este fato pode ser atribuído às limitações da contagem pelo método automatizado, já que o equipamento realiza a contagem através de um único parâmetro que é o volume celular (Harrison et al., 2000), diferentemente da citometria de fluxo (Kunicka et al., 2000). Possivelmente, estas plaquetas ativadas foram contadas pelo método automático de impedância, por apresentarem maior volume. Segundo Böck et al. (1995), a criopreservação gera um aumento no volume plaquetário médio. Porém, tanto a diminuição quanto o aumento do volume plaquetário médio são sinais indicativos de lesão plaquetária. Primeiramente ocorre diminuição, devido à fragmentação ou formação de micro partículas e posteriormente ocorre aumento, decorrente do aumento do volume celular.

Fragments de eritrócitos, micrócitos e complexos imunológicos podem ser erroneamente contados como plaquetas, excedendo o seu número real em casos de trombocitopenia. Segundo Nagata et al. (2010), os contadores automáticos levam a resultados não fidedignos, principalmente em casos de trombocitopenia. Em contrapartida, algumas macroplaquetas e plaquetas gigantes são discriminadas como eritrócitos devido ao aumento do volume (Harrison et al., 2000; Briggs et al., 2007).

A contagem manual de plaquetas apresentou algumas dificuldades, sendo a maior associada às amostras utilizando

DMSO a 6%. A diferença de osmolalidade e consequente perda de água para o meio podem ter respondido por uma redução do volume, responsável, possivelmente, pelo maior dano causado à membrana das plaquetas, uma vez que foram observadas mais danificadas e menores, o que dificultou a contagem plaquetária. As amostras resfriadas utilizando DMSO a 6% apresentaram menor contagem ($P < 0,05$) plaquetária que as demais amostras. Além de requerer um protocolo demorado e pouco prático, esta contagem exigiu um longo treinamento na fase pré-experimental e por sua subjetividade, apresentou elevado coeficiente de variação (CV: 21 - 37%), sobretudo nas amostras utilizando DMSO a 6%. Entretanto, essas características não tornam o procedimento manual insatisfatório, gerando apenas algumas discordâncias que podem ser resolvidas na presença de profissionais experientes, quando da realização dos exames (Borges e Siqueira, 2009).

Há pouca informação a respeito da concentração ideal de plaquetas em valores absolutos no PRP. Segundo Marx et al. (1998), o PRP ideal deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas que o observado fisiologicamente. A concentração absoluta de plaquetas é extrapolada, feralmente, de trabalhos realizados em seres humanos, desconsiderando-se as variações interespecies no que se refere à fisiologia e características das plaquetas. No protocolo utilizado para a obtenção do PRP, no presente estudo, utilizou-se uma única centrifugação do sangue à 133g, durante 8 minutos, quando obteve-se 1,75 vezes o valor inicial de plaquetas no sangue total, considerando-se a técnica manual de contagem. Estes resultados corroboram com os de Tamimi et al. (2007) que relataram um menor incremento de plaquetas, inferior a duas vezes o valor inicial, em protocolos de única centrifugação. Vendruscolo et al. (2012) compararam dez diferentes protocolos descritos na literatura e também

não alcançaram os valores indicados por Marx et al. (1998). Fontenot et al. (2012) estimaram que concentrações plaquetárias superiores a 250.000 PLT/ μ l, no PRP, seriam clinicamente relevantes. No presente estudo, observou-se um valor similar à sua estimativa, considerando-se a contagem manual em câmara de Neubauer (272.000 PLT/ μ L), corroborando ainda com Feldman et al. (2000) que relatam uma concentração de plaquetas no PRP de equinos, variando entre 100.000 à 350.000 PLT/ μ L.

A avaliação morfológica das plaquetas requer um treinamento do avaliador, visando a identificação de mudanças no formato das plaquetas observadas, uma vez serem estruturas extremamente pequenas. A classificação das PLT utilizada, adaptada de Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990), foi realizada considerando-se os seus eixos X e Y, e considerou-se como inativadas, as que se apresentavam discóides ou fusiformes com importante diferença entre os tamanhos dos eixos; ativação incerta, quando havia aproximação entre os tamanhos dos eixos X e Y e mudança do formato para esférico; e ativadas, quando foram observadas emissões de pseudópodes (Fig.1). A exposição das plaquetas a baixas temperaturas causa alteração da morfologia discóide para esférica e aparecimento de pseudópodes. As alterações estruturais que ocorrem no citoesqueleto são principalmente causadas pela formação de microvesículas, mediada pela calpalina, uma protease dependente de cálcio que degrada proteínas da membrana plasmática como a actina, que corresponde a 15-20% do total das proteínas da membrana (Wiedmer et al., 1990). A classificação utilizada permitiu inferir qual o percentual de plaquetas iniciou suas modificações em direção à ativação, e aquelas cuja ativação é irreversível. Plaquetas em estado incerto de ativação possuem uma alteração reversível,

sendo assim, o percentual de plaquetas com ativação incerta é somado àquele de inativadas, pois essas ainda são capazes de liberar o conteúdo dos seus grânulos (Wurzinger e Schmid-Schönbein, 1990). Nas amostras resfriadas, tanto a 3% como a 6% de DMSO, as PLTs em estado incerto de ativação apresentaram diferença ($P < 0,05$) quando comparadas aos demais grupos, apresentando um percentual superior a 60% de PLTs, aptas a liberarem os fatores de crescimento de seus grânulos. Porém, não há na literatura uma definição do percentual de ativação ideal para o PRP a ser aplicado. Por outro lado, as amostras congeladas, utilizando o DMSO a 6% não apresentaram nenhuma plaqueta em estado inativado, possivelmente pela destruição das plaquetas pela diferença de osmolalidade e ruptura da membrana no momento do descongelamento.

Optou-se pelo uso do Citrato de Sódio como anticoagulante neste estudo, pois durante o estudo piloto de agregometria, não se obteve agregação com o ACD. Também foram testados sem sucesso os agentes agregantes ATP, Adrenalina e Ristocetina. Os valores obtidos na agregação plaquetária foram maiores que aqueles encontrados por Piccione et al. (2010). Este fato pode ser devido à menor concentração final de ADP que estes autores utilizaram (0,5 e 1 μ M). Os valores percentuais obtidos por estes autores para a agregação máxima foram: com 1 hora (39,17 + 9,32) e 6 horas (56,02 + 7,96) à temperatura ambiente, com 6 horas (47,76 + 6,56) e 24 horas (48,6 + 8,35) resfriada a 8°C, utilizando ADP na concentração final de 1,0 μ M. A concentração final do ADP de 100 μ M já havia sido utilizada por Bourdreaux et al. (1988) com sucesso.

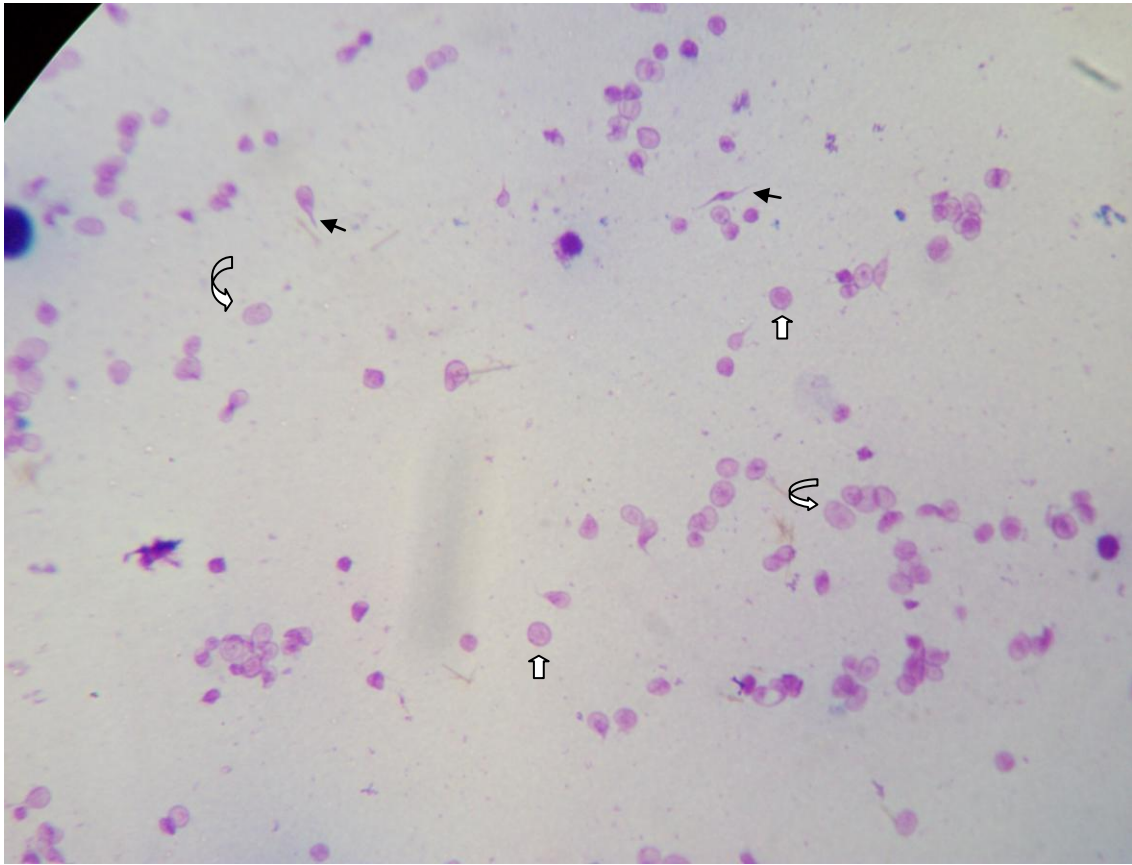


Figura1: Esfregaço de PRP, corado em Panótico e avaliado em microscopia óptica, em aumento de 1000X. Observa-se plaqueta inativada, plaqueta alongada ou discóide (setas brancas curva); em estado incerto de ativação, plaqueta arredondada (setas brancas); ativada, observa-se presença de pseudópodes (setas pretas). (Adaptado de Wurzinger e Schmid-Shönbein (1990), para a microscopia óptica).

Optou-se pelo uso do Citrato de Sódio como anticoagulante neste estudo, pois durante o estudo piloto de agregometria, não se obteve agregação com o ACD. Também foram testados sem sucesso os agentes agregantes ATP, Adrenalina e Ristocetina. Os valores obtidos na agregação plaquetária foram maiores que aqueles encontrados por Piccione et al. (2010). Este fato pode ser devido à menor concentração final de ADP que estes autores utilizaram (0,5 e 1 μ M). Os valores percentuais obtidos por estes autores para a agregação máxima foram: com 1 hora (39,17 + 9,32) e 6 horas (56,02 + 7,96) à temperatura ambiente, com 6 horas (47,76

+ 6,56) e 24 horas (48,6 + 8,35) resfriada a 8°C, utilizando ADP na concentração final de 1,0 μ M. A concentração final do ADP de 100 μ M já havia sido utilizada por Bourdreaux et al. (1988) com sucesso.

O protocolo proposto para o congelamento, utilizando-se previamente o resfriamento lento a taxa de -0,07°C/minuto, com o propósito de minimizar a desorganização da camada fosfolipídica, durante o choque pelo frio, permitiu a manutenção na porcentagem da diminuição da agregação máxima, entre os tratamentos. A diminuição no percentual de agregação plaquetária foi de aproximadamente 40%, não diferindo entre os tratamentos (P<0,05).

CONCLUSÃO

A criopreservação do PRP equino utilizando DMSO a 3%, resfriado lento a 4-5°C e posteriormente congelado a -196°C em nitrogênio líquido apresentou percentual de ativação plaquetária de 43%, avaliada pela microscopia óptica, e manteve aproximadamente 35% de agregação plaquetária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRIGGS, C.; HARRISON, P.; MAC, H. Continuing development with the automated platelet count. **Int J Lab Hem**, v.29, p.77-91, 2007.
- BÖCK, M.; SCHLEUNING, M.; HEIM, M. U. et al. Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function. **Transfusion**, v.35, n.11, p.921-924, 1995.
- BORGES, L.F.; SIQUEIRA, L.O. Validação da tecnologia 5 diff do analisador hematológico Symex SX-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.31, p.247-251, 2009.
- BOURDREAUX, M. K.; MANN, C. W.; PUROHIT, R. Platelet function testing in the Pony. **Lab An Sci**, v.38, p.448-51, 1988.
- CONNOR, J.; CURRIE, L. M.; ALLAN, H. et al. Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4°C and treated with second-messenger effectors. **Transfusion**, v.36, p.691-698, 1996.
- CROWE, J.H. CROWE, L. M.; OLIVER, A. E et al. The role of vitrification in anhydrosis. **Annual Rev Physiol**, v.60, p.73-103, 1998.
- CROWLEY, J. P.; RENE, A.; VALERI, R. Changes in platelet shape and structure after freeze preservation. **Blood**, v.44, oct, 1974.
- DALY, P. A.; SCHIFFER, C. A.; AISNER, J. et al. Successful transfusion of platelets cryopreserved for more than 3 years. **Blood**, v.54, p.1023-1027, 1979.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott williams & Wilkins, 2000. 1344p
- FONTENOT, R.L.; SINK, C.A.; WERE, S.R. et al. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. **Can Vet J**, v.53, p.1266-1272, 2012.
- HANDIN, R. I.; VALERI, C. R. Improved viability of previously frozen platelets. **Blood**, v.40, p.509, 1972.
- HARRISON, P.; HORTON, A.; GRANT, D. et al. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. **Br J Haematol**, v.108, p.228-235, 2000.
- KUNICKA, J. E.; FISCHER, G.; MURPHY, J. et al. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. **Am J Clin Pathol**, v.114, p.283-289, 2000.
- KWIRANT, L. A. A. Criopreservação do plasma rico em plaquetas (PRP) de equinos. Universidade Federal de Santa Maria. Escola de Veterinária, 2013, 57p. (Dissertação, Mestrado Clínica Médica).
- LEE, D. H.; BLAJCHMAN, M. A. Platelet substitutes and novel methods of platelet preservation. In: Michelson, A. D. Platelets, San Diego: Elsevier; 2007, p.1297-1309.
- MELARAGNO, A. J.; CARCIERO, R.; FEINGOLD, H. et al. Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80 degrees C. Effects of 2 years of frozen storage at -80 degrees C and transportation in dry ice. **Vox Sanguinis**, v.49, p.245-258, 1985.

- MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, p.638-646, 1998.
- MARX, R. E. Quantification of growth factor levels using simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**, v.58, p.300-301, 2000.
- NAGATA, M. J. H.; MESSORA, M. R.; FURLANETO, F. A. C. et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: na experimental Study in rabbits. **European J Dentistry**, v.4, p.395-402, 2010.
- PALHARES, M. S. Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I. Características termodinâmicas e funcionais; II. Desempenho reprodutivo das éguas inseminadas, Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 1997, 246p. (Tese, Doutorado em Reprodução).
- PICCIONE, G.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C. et al. Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse, **J Equine Vet Sci**, v.30, n.7, p.371-375, 2010.
- REID, T. J.; SNIDER, R.; HARTMAN, K. et al. A method for the quantitative assessment of platelet contractility and clot strength in fresh and stored platelets. **Vox Sang**, v.75, p.270-277, 1998.
- REID, T. J.; ESTEBAN, G.; CLEAR, M. et al. Platelet membrane integrity during storage and activation. **Transfusion**, v.39, p.616-624, 1999a.
- REID, T. J.; VICENT, F. L.; ESTEBAN, G. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. **Cryobiology**, v.38, p.209-224, 1999b.
- TAMIMI, F. M.; MONTALVO, S.; TRESGUERRES, I. et al. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma, **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, p.1084-1093, 2007.
- VALERI, C. R.; FEINGOLD, H.; MARCHIONNI, L. D. A simple method for freezing human platelets using 6% Dimethylsulfoxide and storage at -80°C. **Blood**, v.43, 1974.
- VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Paquetas para uso em medicina equina. **Pesq Vet Bras**, n.32, 106-110, 2012.
- WIEDMER, T.; SHATTIL, S. J.; CUNNINGHAM, M. et al. Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. **Biochemistry**, v.29, p.623-632, 1990.
- WURZINGER, L.J.; SCHMID-SCHÖNBEIN, H. The role of fluid dynamics in triggering and amplifying haemostatic reactions in thrombogenesis. **Blood Flow Large Art.**, v.15, p.215-226, 1990.

8. CAPÍTULO V

UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO TRATAMENTO DA DESMITE DO LIGAMENTO SUPRAESPINHOSO, EM EQUINOS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito terapêutico do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) na desmíte do ligamento supraespinhoso em equinos. Os animais foram divididos em três grupos (Grupo com lesão pré-existente, grupo com lesão induzida e tratado com PRP e grupo controle). O PRP utilizado foi preparado utilizando simples centrifugado a 133g durante oito minutos, com dois minutos de frenagem e aspirado 4mm acima da capa leucocitária. Foram realizadas duas aplicações, de PRP ou solução fisiológica, de acordo com o grupo, intervalada de 14 dias e os animais avaliados por inspeção, palpação, termografia e ultrassonografia. A terapia com PRP não apresentou efeitos adversos e acelerou em 5,85 vezes o tempo de resolução das lesões, diminuindo a área da lesão induzida, avaliada pela ultrassonografia, sendo uma nova terapia indicada no tratamento das desmitas de ligamento supraespinhoso em equinos.

Palavras-chave: equino, lombalgia, Plasma Rico em Plaquetas, ligamento supraespinhoso.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the therapeutic effect of Platelet-rich Plasma (PRP) in equine supraspinous ligament desmitis. The animals were divided into three groups (Pre-existing lesions, induced lesions treated with PRP and control group). The PRP was prepared through simple tube centrifugation at 133g for eight minutes, with two minutes of braking, and suctioned 4mm above the buffy coat. PRP or saline were applied twice, according to the group, with a 14-days interval. The animals were evaluated through visual inspection, palpation, thermography and ultrasonography. The PRP therapy didn't present adverse effects and speeded up the healing time 5.85 times, reducing the induced lesion area according to the ultrasonographic exam, being a new therapy indicated to equine supraspinous ligament desmitis treatment.

Keywords: Equine, back pain, platelet-rich plasma, supraspinous ligament.

INTRODUÇÃO

As afecções musculoesqueléticas são frequentes em equinos, sendo uma das causas mais importantes do baixo rendimento ou afastamento dos animais de suas atividades, com perdas econômicas consideráveis. As injúrias toracolombares são importantes no diagnóstico diferencial

de lesões do sistema locomotor em equinos, representando 4,35% da casuística das afecções locomotoras em equinos (Alves et al., 2004; Henson, 2009; Fantini, 2010). Fantini (2010) encontrou 38,30% (339/885) de alterações no ligamento supraespinhoso, ao avaliar por ultrassonografia as lesões toracolombares em equídeos.

Com o objetivo de minimizar a dor lombar, existem algumas discordâncias entre os protocolos de tratamentos convencionais disponíveis a serem seguidos e uma grande variedade de terapias associadas. O tratamento sistêmico de lombalgias com antiinflamatórios não esteroidais (AINES) é geralmente ineficaz (Marks, 1999, Denoix et al., 2005). Segundo Denoix et al. (2005), o tratamento específico para dor lombosacral é realizado por meio de infiltração de corticóide guiada por ultrassom. Fonseca et al. (2006), em um estudo com 24 equinos com lombalgia, trataram os animais com diagnóstico de desmíte dos ligamentos inter e supraespinhoso, com infiltrações de esteróides e neurolíticos; os casos de miosites foram tratados com relaxantes musculares e AINES; os animais com osteoartrite foram tratados com infiltração de esteróides no músculo *Multífidus* e os casos de anquilose dos processos espinhosos foram tratados por terapia com ondas de choque (*Shock wave*). Marks (1999) defende que injúrias ligamentares agudas devem receber tratamento com gelo, descanso e AINES, enquanto injúrias crônicas devem ser tratadas com ultrassom terapêutico, antiinflamatório tópico e fisioterapia com alongamentos. Apenas em casos severos ou não responsivos a outros tratamentos deve ser realizada a infiltração nos processos interespinhosos.

As lesões toracolombares em equídeos, independentemente da estrutura lesionada, são mais frequentes na região compreendida entre as vértebras torácicas, T14 e T18, devido à maior compressão desta área sobre o dorso dos equinos (Fantini, 2010). Além disso, os tratamentos convencionais, para as lesões do ligamento supraespinhoso, são pouco eficazes (Marks, 1999, Denoix et al., 2005).

A ineficácia destas terapias reparativas pode ser melhor compreendida pela fisiopatologia da reparação dos tendões, onde o tecido neoformado para a reparação

possui propriedades funcionais inferiores ao tecido saudável original, por ser tecido cicatricial fibrocondrogênico (Clegg et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito terapêutico do plasma rico em plaquetas (PRP) na desmíte do ligamento supraespinhoso, a fim de propor uma nova terapia regenerativa.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Clínica de Equídeos do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o protocolo 033/11.

Foram utilizados 12 equinos, sem raça definida, sendo sete fêmeas e cinco machos, de idades variando entre dois e 15 anos. Os animais foram divididos em três grupos: G1- animais apresentando lesões pré-existentes (causa desconhecida) no ligamento supraespinhoso e tratados com duas doses de PRP autólogo, perilesional, com intervalo de quatorze dias entre aplicações (n=4); G2- animais submetidos à lesão induzida e posteriormente tratados com duas doses de PRP autólogo, perilesional, com intervalo de 14 dias entre aplicações (n=4); G3- animais submetidos à lesão induzida e posteriormente tratados com duas doses de solução fisiológica 0,9%, perilesional, com intervalo de 14 dias entre aplicações (n=4).

Para a indução da lesão, nos grupos G2 e G3 utilizou-se agulha para punção de medula óssea 11G (Euromed³⁷) (Fig.1A). Para a realização do procedimento de indução o animal foi contido em tronco e sedado com Cloridato de Detomidina (0,02mg/kg via I.V.). As lesões foram

³⁷ Euromed, MDL Srl, Itália.

induzidas entre a 16^a e a 18^a vértebra torácica, no espaço entre dois processos espinhosos. Após tricotomia e antissepsia, foi realizado um botão anestésico com Cloridato de Lidocaína (Xylestesin® 2%³⁸) e a agulha introduzida em movimentos circulares, alcançando-se 1,5cm de profundidade.

A coleta de sangue foi realizada por venopunção da jugular em tubos à vácuo contendo Citrato Sódico (CS), com capacidade de 4,5mL, para a obtenção do PRP. O sangue foi homogeneizado por inversão lenta do tubo e posteriormente centrifugado a 133g durante oito minutos e dois minutos de frenagem. Foi aspirado 1,5mL da fração do PRP, 4mm acima da capa leucocitária, com auxílio de uma seringa de 10mL e catéter 14G.

O exame físico da região toracolombar foi composto de inspeção, palpação, termografia infravermelha e ultrassonografia como descrito por Fantini (2010).

O exame termográfico foi realizado com uma termocâmera (Flir Systems®³⁹) modelo i-40, com ajuste automático para temperatura. As imagens termográficas foram obtidas a partir da vista dorsal de toda extensão da coluna vertebral (Fig1B). Os parâmetros normais do perfil termográfico em repouso foram baseados em normas estabelecidas por Purohit e McCoy (1980), Turner (1986) e Von Schweinitz (1999). O exame termográfico foi realizado conforme Turner (1986), Von Schweinitz (1999), Turner (2001) e Fantini (2010).

Após o mapeamento da região toracolombar por meio do exame termográfico, realizou-se a ultrassonografia, utilizando-se o aparelho Aloka SSD-500® e

transdutor linear de 7,5 MzH. O exame ultrassonográfico, foi realizado após uma preparação da área com tricotomia, limpeza dos pelos com água morna e gel hidrossolúvel para melhor contato com o transdutor. As lesões do ligamento supraespinhoso foram caracterizadas de acordo com a área total da lesão e a ecogenicidade ultrassonográfica. A área total da lesão foi mensurada (cm²) a partir das imagens ultrassonográficas obtidas no local de indução da lesão. A ecogenicidade foi graduada em 0 - padrão normal (isoeecóico); 1- redução em 25% da ecogenicidade; 2 - redução em 50%; 3 - redução em 75% e 4 - redução em 100% do padrão isoeecóico (totalmente anecóico), de acordo com o preconizado por Reef (1997) (Fig.2)

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas no plano longitudinal, e as imagens obtidas foram registradas a partir de uma placa de captura de vídeo (Masterplus⁴⁰), para posterior comparação nos diferentes momentos avaliados: tempo zero (antes da indução da lesão), 1°, 3°, 7°, 14° dia (após a primeira aplicação do PRP ou solução fisiológica), 21°, 28° dia (após a segunda aplicação do PRP ou solução fisiológica), 35° e 42° dia, totalizando 28 dias de avaliação após o início do tratamento. Nos animais do G1 como foram tratadas lesões pré-existent, o tratamento foi realizado nos dias zero e 14°, e foram acompanhados até o 28° dia do experimento.

³⁸ Xylestesin, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Brasil.

³⁹ ThermaCAM TM Quick Report, Flir Systems, Wilsonville, Oregon.

⁴⁰ Master Vision Sistemas e Serviços LTDA, Sarzedo MG.

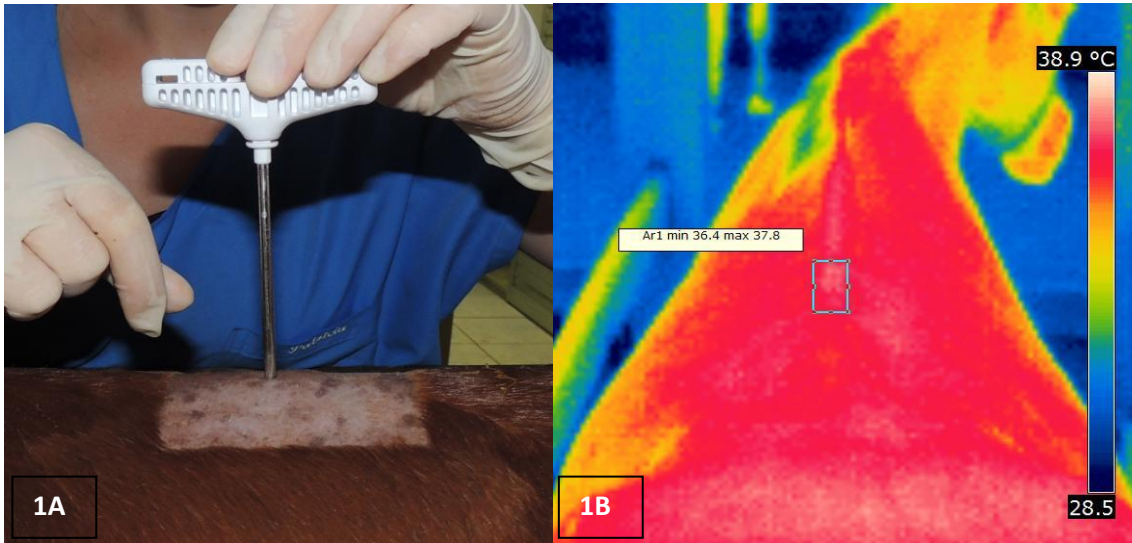


Figura 1: Indução da lesão no ligamento supraespinhoso na região torácica, utilizando agulha para punção de medula óssea 11G (1A); termograma pela vista dorsal da coluna, apresentando temperatura superficial mínima e máxima na área selecionada (1B).

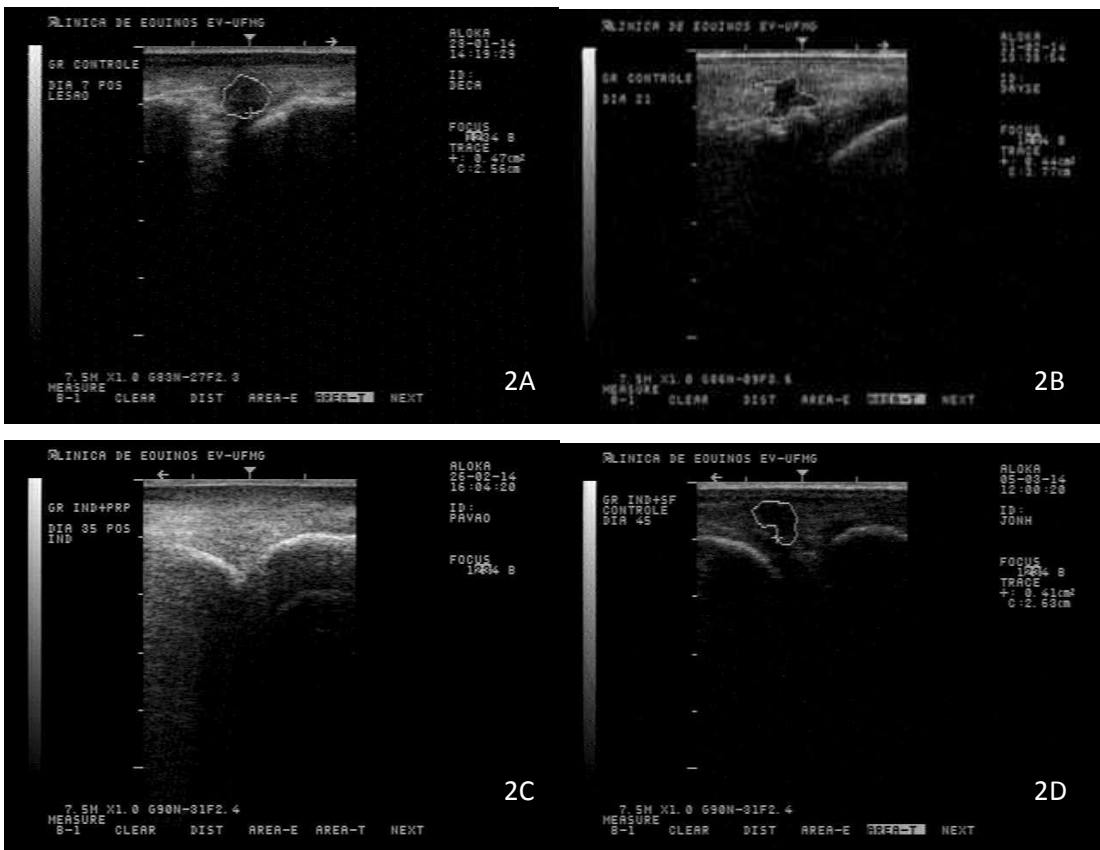


Figura 2: Imagem ultrassonográfica do ligamento supraespinhoso. Observa-se: lesão hipocóica sobre o ligamento supraespinhoso, sete dias após a indução, no grupo controle (2A); lesão hipocóica no ligamento supraespinhoso, 21 dias após a indução lesão, no grupo controle (2B); ausência de lesão após 35 dias de indução, e com 20 dias após 1ª aplicação do PRP (2C); lesão hipocóica no ligamento supraespinhoso, 45 dias após indução da lesão e 30 dias após 2ª aplicação da solução fisiológica, no grupo controle (2D).

A coleta de sangue para a obtenção do PRP autólogo foi realizada por venopunção após antissepsia da jugular, em um tubo a vácuo, contendo Citrato de Sódio (CS) como anticoagulante. O sangue foi processado, centrifugado à 133G durante oito minutos e com dois minutos de frenagem, conforme protocolo previamente validado que concentra em aproximadamente 1,75 vezes o valor de plaquetas presentes no sangue total. A fração 4mm acima da capa leucocitária foi aspirada com auxílio de uma seringa de 10mL e catéter 14G, e o PRP obtido foi administrado de forma asséptica, por injeções perilesionais de 2,0mL. No grupo controle foi aplicado, também de forma asséptica, 2,0mL de solução fisiológica perilesional.

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em parcela subdividida (três grupos na parcela e cinco tempos de avaliação na subparcela). A análise de variância foi utilizada, considerando-se a ocorrência dos erros (a) e (b), referentes, respectivamente às parcelas e subparcelas. As variáveis foram submetidas à transformação logarítmica a fim de normalizar as respostas e alcançar o princípio da homocedasticidade de variâncias. As médias com distribuição normal foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls (SNK) e para o escore ultrassonográfico, com características não paramétricas, foi

utilizado o teste de Kuskall-Wallis. O tempo para a recuperação da lesão foi calculado pelo teste de Kaplan-Meier. As análises foram realizadas utilizando-se os pacotes estatísticos SAS (2003) e Medcalc (2013), considerando-se 95% (P<0,05) de significância.

RESULTADOS

Nas avaliações clínicas realizadas (dia zero - antes da indução da lesão e com 24 horas, 3º, 7º e 14º dia, após a indução da lesão), apenas dois animais apresentaram dor discreta à palpação no dia seguinte à indução e um animal apresentou edema subcutâneo. Nenhum animal apresentou alteração na deambulação durante todo o período experimental.

Considerou-se para análise e comparação entre os grupos, o dia zero do grupo com lesão pré-existente com o 14º dia dos grupos induzidos, pois se refere ao dia da 1ª aplicação do PRP.

Os resultados obtidos na avaliação termográfica demonstraram diferença superior a 1°C em todos os grupos avaliados, durante todo o período experimental, exceto no 28º dia do grupo em que a lesão foi induzida e o tratamento realizado com solução salina 0,9%. Foi observado aumento gradual da diferença de temperatura superficial da área, no grupo com lesão pré-existente (Tab.1).

Tabela 1: Diferença de temperatura (máxima – mínima) da coluna, obtida pela termografia na área que compreende a lesão no ligamento supraespinhoso (média ± erro padrão).

Dia	Grupo lesão pré-existente(°C)	Grupo Indução + PRP (°C)	Grupo Indução + SF (°C)
Dia 0		0,95 ± 0,09	0,95 ± 0,06
Dia 14	1,45 ± 0,06 ^{Ca}	1,88 ± 0,3 ^{Aa}	1,53 ± 0,17 ^{ABa}
Dia 21	2,48 ± 0,34 ^{Ba}	1,98 ± 0,5 ^{Ab}	1,05 ± 0,13 ^{ABa}
Dia 28	-	1,56 ± 0,26 ^{Aa}	0,95 ± 0,15 ^{Ba}
Dia 35	2,05 ± 0,26 ^{BCa}	1,4 ± 0,29 ^{Ab}	1,13 ± 0,09 ^{Bb}
Dia 42	3,3 ± 0,21 ^{Aa}	2,2 ± 0,2 ^{Ac}	1,2 ± 0,12 ^{Ab}

PRP, Plasma Rico em Plaquetas; SF, Solução Fisiológica. Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem (p<0,05). Dia 0: após indução da lesão; Dia 14: antes da primeira dose; Dia 21: sete dias após aplicação dose; Dia 28: 14 dias após a primeira aplicação da primeira dose e aplicação da segunda dose; Dia 35: sete dias após aplicação da segunda dose; Dia 42: 14 dias após aplicação da segunda dose.

No terceiro dia após a indução, foi possível a visualização inicial da lesão e da perda de ecogenicidade, avaliada pela ultrassonografia. Ao final do período de avaliação proposto, três animais ainda apresentavam ecogenicidade grau um, embora não fosse possível a delimitação da lesão ao exame ultrassonográfico.

O tamanho da lesão, antes do início do tratamento, nos grupos em que foi induzida e no grupo com lesão pré-existente, não diferiu ($P>0,05$). Após sete dias do início do tratamento (dia 21), a área total da lesão foi menor ($P<0,05$) nos animais tratados com PRP, independentemente da lesão ter

sido induzida ou não, quando comparada à média dos animais tratados com solução fisiológica 0,9% ($P<0,05$). No grupo tratado com PRP, após a indução da lesão, apesar da diminuição numérica da área, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os tempos, possivelmente pelo reduzido número de animais, uma vez que sete dias após a primeira aplicação (Dia 21) em apenas dois animais a lesão persistiu. O mesmo comportamento não foi verificado no grupo que recebeu solução fisiológica, sendo observado aumento significativo da lesão após a 1ª aplicação (Dia 21) (Tab. 2).

Tabela 2: Área total da lesão (cm^2), obtida pela ultrassonografia do ligamento supraespinhoso (média \pm erro padrão).

Dia	Grupo lesão natural (cm^2)	Grupo Indução + PRP (cm^2)	Grupo Indução + SF (cm^2)
Dia 14	$0,40 \pm 0,05^{\text{Aa}}$ (n=4)	$0,30 \pm 0,06^{\text{Aa}}$ (n=4)	$0,38 \pm 0,06^{\text{Ba}}$ (n=4)
Dia 21	$0,19 \pm 0,03^{\text{Bb}}$ (n=4)	$0,16 \pm 0,05^{\text{Ab}}$ (n=2)	$0,61 \pm 0,13^{\text{Aa}}$ (n=4)
Dia 28	$0,22 \pm 0,03^{\text{ABa}}$ (n=3)	$0,13 \pm 0,04^{\text{Aa}}$ (n=2)	$0,34 \pm 0,03^{\text{Ba}}$ (n=4)
Dia 35	$0,15 \pm 0,01^{\text{Ba}}$ (n=3)	$0,07$ (n=1) ^{Aa}	$0,33 \pm 0,04^{\text{Ba}}$ (n=4)
Dia 42	$0,33 \pm 0,15^{\text{ABa}}$ (n=3)	-	$0,35 \pm 0,05^{\text{Ba}}$ (n=4)

PRP, Plasma Rico em Plaquetas; SF, Solução Fisiológica. Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem ($p<0,05$). Dia 0: após indução da lesão; Dia 14: antes da primeira dose; Dia 21: sete dias após aplicação dose; Dia 28: 14 dias após a primeira aplicação da primeira dose e aplicação da segunda dose; Dia 35: sete dias após aplicação da segunda dose; Dia 42: 14 dias após aplicação da segunda dose.

Na avaliação do tempo de cicatrização, observou-se que a lesão induzida e tratada com o PRP acelerou em 5,85 vezes a probabilidade de cura ($\text{IC}=0,58$ a $58,83$), enquanto, quando a lesão é pré-existente, o PRP acelerou em 0,17 vezes a probabilidade de cura ($\text{IC}= 0,01700$ a $1,7198$).

Todos os animais do grupo com lesão induzida e tratada com PRP apresentaram resolução total da lesão no período experimental. Dois animais não apresentaram lesão, mensurável à ultrassonografia, com 14 dias após a primeira aplicação do PRP. No grupo com lesão pré-existente e tratado com PRP um animal apresentou resolução total da lesão

no 14º dia após a 2ª aplicação do PRP (Fig.3).

Após o término do período experimental, aos 52 dias após a 1ª aplicação de PRP ou solução fisiológica, foi realizada avaliação ultrassonográfica dos animais que ainda apresentaram lesão no último dia do experimento. Foi observado que mais um animal do grupo com lesão pré-existente cicatrizou completamente e nos dois animais que ainda apresentavam lesão, a área total da lesão diminuiu ($0,06 \pm 0,03\text{cm}^2$). Enquanto, no grupo controle nenhum animal cicatrizou a lesão e a área total da lesão permaneceu semelhante à avaliação anterior ($0,35 \pm 0,05\text{cm}^2$).

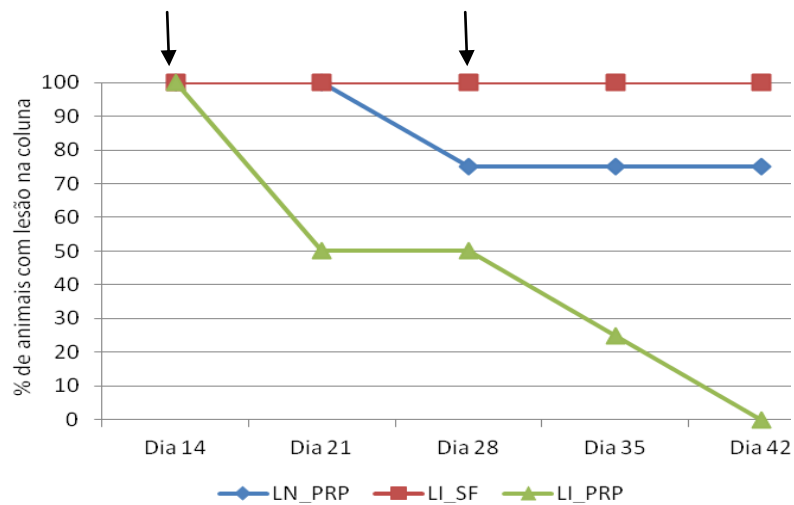


Figura 3: Porcentagem de animais com da lesão da coluna, de acordo com o dia após o início do tratamento. Setas: dia da aplicação do PRP ou solução salina 0,9%. LN_PR: lesão pré-existente e tratamento com PRP; LI_SF: lesão induzida e tratada com solução salina 0,9% (controle); LI_PRP lesão induzida e tratada com PRP. Dia 14: antes da primeira dose; Dia 21: sete dias após aplicação dose; Dia 28: 14 dias após a primeira aplicação da primeira dose e aplicação da segunda dose; Dia 35: sete dias após aplicação da segunda dose; Dia 42: 14 dias após aplicação da segunda dose.

A redução na área de lesão em função do tempo foi observada no grupo com lesão induzida e tratado com PRP de forma mais homogênea. Os animais com lesão pré-existente apresentaram uma redução da área

da lesão, sete dias após a aplicação do PRP, independentemente de ter sido a primeira ou segunda dose, seguida por aumento da área da lesão. (Fig.4).

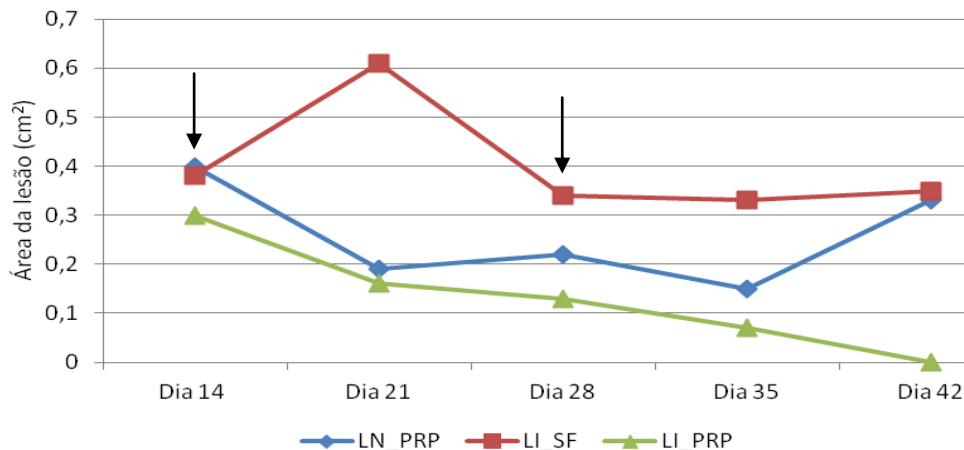


Figura 4: Área da lesão da coluna, em equinos, de acordo com o dia após o início do tratamento. Setas: dia da aplicação do PRP ou solução salina 0,9%. LN_PR: lesão pré-existente e tratamento com PRP; LI_SF: lesão induzida e tratada com solução salina 0,9% (controle); LI_PRP lesão induzida e tratada com Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Dia 14: antes da primeira dose; Dia 21: sete dias após aplicação dose; Dia 28: 14 dias após a primeira aplicação da primeira dose e aplicação da segunda dose; Dia 35: sete dias após aplicação da segunda dose; Dia 42: 14 dias após aplicação da segunda dose.

DISCUSSÃO

O uso do PRP vem se expandindo cada vez mais, sendo utilizado principalmente nas lesões musculoesqueléticas, desde casos de tendinopatias (Maia et al., 2009; Carmona et al., 2009; Oleza, 2009), desmopatia do ligamento suspensório (Argüelles et al., 2008; Waselau et al., 2008), desmopatia do ligamento acessório do tendão flexor profundo e ligamento suspensório (Oleza, 2009), osteoartrite (Carmona et al., 2007), fraturas e lesões musculares (Carmona e López, 2011) e laminite (Carmona et al., 2012). Porém, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que utilizasse o PRP em lesões de ligamento supraespinhoso, em equinos.

Como forma de indução experimental de desmíte do ligamento supraespinhoso, a técnica foi considerada adequada, por não ter apresentado risco aos animais e ter padronizado o tamanho das lesões. Além disso, não foi necessária a utilização de anti-inflamatórios, para o controle da dor após o procedimento de indução da lesão, uma vez que apenas três animais apresentaram discreto desconforto à palpação da região sobre o ligamento supraespinhoso e nenhum animal alterou sua locomoção à inspeção.

Acredita-se que 90% dos fatores de crescimento presentes nas plaquetas sejam liberados até 10 minutos após sua ativação, por isso, a ativação deve ocorrer imediatamente antes da aplicação, ou após o PRP ter sido aplicado, sendo essa última mais desejável, uma vez que o colágeno promove liberação mais lenta dos fatores de crescimento, considerada mais próxima da fisiológica (Wroblewski et al., 2010; Harmon et al., 2014). O tempo entre a preparação do PRP e a aplicação, foi de aproximadamente 30 minutos. Marx (2001) recomenda o uso imediato do PRP após o seu preparo, sendo de oito horas o tempo máximo para a sua utilização.

Foi observada uma resistência tecidual moderada, no momento da aplicação, tanto do PRP quanto da solução fisiológica no ligamento supraespinhoso. Certamente, a diferença em sua estrutura altamente elástica na porção torácico cranial e progressivamente mais fibrosa em direção à região torácica caudal e lombar (Denoix, 1999), tenha sido o fator preponderante.

As condições térmicas nos tecidos são influenciadas por flutuações na quantidade e taxa de suprimento sanguíneo, as quais permitem a observação da atividade térmica na região de interesse (Purohit e McCoy., 1980; Schaefer et al., 2004). Perda de função, edema, calor, dor e rubor são os principais sinais clínicos nos estágios precoces da inflamação. A superfície da pele irá refletir o aumento da temperatura pela alteração circulatória e metabolismo do tecido perilesional. Apesar das injúrias agudas usualmente serem acompanhadas por sinais de inflamação, nas lesões crônicas, pela deposição de tecido fibroso, os sinais inflamatórios são de menor intensidade. A dor se manifesta de acordo com a severidade da lesão e limiar do paciente (Henson, 2009; Fantini, 2010). Durante a realização da aplicação do tratamento, os animais se apresentaram passivos, não demonstrando sinais de dor, sendo necessária apenas a utilização de tronco de contenção. Não foi observado efeito adverso após o uso da terapia com o PRP. Em relação ao aumento da temperatura local, observado nos grupos tratados com PRP, principalmente nos animais com lesão pré-existente, possivelmente a reagudização do processo, visando a fase inflamatória da cicatrização associada aos fatores de crescimento presentes no PRP, como o TGF- β , tenha sido o fator desencadeante do aumento local da temperatura, observado na termografia por infravermelho.

Variações da ecogenicidade normal e no padrão das fibras podem ocorrer na ausência de dor na coluna, demonstrando

uma baixa relação das alterações no padrão de normalidade ultrassonográfica com a dor (Henson et al., 2007). A perda da ecogenicidade (padrão hipoecóico a anecóico), em lesões tendíneas agudas, corresponde à presença de hemorragia, fibrinólise ou tecido de granulação inicial (Marr et al., 1993). Entretanto, a correlação de achados ultrassonográficos associados a variação de tonalidade da ecogenicidade, com alterações histológicas, foi questionada por Crass et al. (2002). Estes autores encontraram imagens ultrassonográficas que permaneceram alteradas ainda que o exame anatomopatológico demonstrasse realinhamento fibrilar adequado e completa cicatrização. No presente estudo, três animais sem lesão definida, no último dia de avaliação, apresentaram alteração na ecogenicidade sem que houvesse uma correspondência com a presença de uma lesão definida.

A associação dos exames de diagnóstico por imagem de termografia e ultrassonografia, é considerada eficiente para o diagnóstico de lesões na região toracolombar (Fonseca, 2005; Fonseca et al., 2006; Fantini, 2010). Pela necessidade da realização de tricotomia da área para indução da lesão e posterior infiltração, optou-se pela comparação da diferença de temperatura na área que compreende a lesão, uma vez que alguns fatores interferem no exame, como áreas de tricotomia ou tosa (Turner, 2007). Diferença de temperatura de 1°C, detectada pela termografia indica uma alteração que só poderá ser clinicamente observada após duas semanas (Purohit e McCoy, 1980; Palmer, 1981; Turner, 2001).

Maia et al. (2009) avaliaram o efeito do PRP em lesões induzidas por colagenase no tendão flexor digital superficial de equinos. Estes autores relatam que a visualização inicial da lesão mediante a perda de ecogenicidade iniciou-se a partir do 7º dia após indução, com melhor delimitação da lesão no 12º dia. No presente estudo, optou-

se pelo tratamento a partir do 14º dia após a indução da lesão, pois em estudo piloto prévio, a lesão induzida com o auxílio da agulha de punção de medula óssea estabilizou-se após duas semanas.

O presente trabalho foi o primeiro a avaliar o uso do PRP para o tratamento da desmíte do supraespinhoso, afecção esta relativamente comum dentre as causas de lombalgias, e apresentou uma taxa de aproximadamente seis vezes maior a probabilidade de cicatrização, quando comparado ao grupo controle que não utilizou PRP. Observou-se melhora de 100% dos animais com lesão induzida e tratados com PRP, em comparação à 0% dos animais tratados com solução salina a 0,9%. Oleza (2009) avaliou o efeito de concentrados plaquetários autólogos em 72 casos de tendinopatia do tendão flexor digital superficial, 10 do tendão flexor profundo e 16 casos de lesões no ligamento suspensório, e observou uma melhora clínica de 80% para o grupo tratado em relação a uma melhora de 45% no grupo controle (n=9), na tendinopatia do flexor digital superficial.

A oscilação na resolução da área total observada no grupo com lesão pré-existente, por se tratar de uma lesão crônica, indica a possível necessidade de um maior número de aplicações. Oleza (2009) considera de três a quatro aplicações com intervalo de 10 a 15 dias entre aplicações um esquema posológico adequado, podendo ser aplicado a qualquer momento da evolução das lesões. Alguns biomarcadores anabólicos declinam 15 dias após a aplicação intrarticular ou intrasinovial de concentrados plaquetários, em equinos. Segundo Carmona e Prades (2009), a maioria das enfermidades musculoesqueléticas nos equinos é crônica por natureza, e os episódios agudos são exacerbações momentâneas destas enfermidades. Independente do tempo de lesão, os concentrados plaquetários constituem um excelente tratamento

analgésico e antiinflamatório para lesões em fase aguda de tendões, ligamentos e articulações e apenas existem limitações teóricas que sugerem sua aplicação unicamente na fase proliferativa da cicatrização (Schnabel et al., 2007).

CONCLUSÕES

A técnica de indução de desmíte do ligamento supraespinhoso, com agulha para punção medular, mostrou-se eficaz e permitiu validar essa técnica para a indução de desmites neste ligamento em equinos. A terapia com PRP é eficiente no tratamento das desmites de supraespinhoso em equinos, acelerando a redução da área da lesão induzida, mensurada pela ultrassonografia. Devido a aceleração em 5,85 vezes no tempo de resolução das lesões recomenda-se o PRP no tratamento das desmites de supraespinhoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. L. G.; FONSECA, B. P. A.; THOMASSIAN, A. et al. Estudo retrospectivo de dor lombar em equinos. **Bras. J. Vet. Res. An. Sci. Suppl.**, v. 41, p.268 – 269, 2004.
- ARGÜELLES, D., CARMONA, J.U., CLIMENT, F. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Vet. Rec.** v.162, p.208-11, 2008.
- CARMONA, J. U.; ARGÜELLES, D.; PRADES, M. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **J Equine Vet Sci, Fort Collins**, v.27, p.167-170, 2007.
- CARMONA, J. U.; PRADES, M. Platelet concentrates to treat musculoskeletal disease in horses. VDM Verlag Dr. Müller Aktiengesellschaft & Co. KG, Saarbrücken, Germany, 2009.
- CARMONA, J. U.; PRADES, M.; ARGÜELLES, D. Autologous platelet concentrates as a treatment for soft tissue musculoskeletal lesions in horses. **Arch Med Vet**, v.41, p.77-82, 2009.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **J Equine Vet Science**, v.31, p.506-510, 2011.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous platelet concentrates as an adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermédia dysfunction. **J Eq Vet Sci**, p.1-5, 2012.
- CLEGG, P. D., STRASSBURG, S., SMITH, R. K. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. **Int J Experimental Pathol**, v.88, p.227-235, 2007.
- CRASS J.R., GENOVESE R.L., RENDER J.A. et al. Magnetic resonance, ultrasound and histopathologic correlation of acute and healing equine tendon injuries. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v.33, p.206-16, 2002.
- DENOIX, J. M.; AUDIGIE, F.; COUDRY, V. Review of Diagnosis and Treatment of Lumbosacral Pain in Sport and Race Horses. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners – AAEP, 51., 2005, Seattle, Wa. Proceedings...
- DENOIX, J. D. Ultrasonographic evaluation of back lesions. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 15, p.27-60, 1999.
- FANTINI, P. Avaliação toracolombar em equídeos de tração: estudo clínico, termográfico e ultrassonográfico. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 2010, 125p. (Dissertação, Mestrado em Clínica e Cirurgia).

- FONSECA, B. P. A. Termografia e ultrassonografia no diagnostico de lesões toracolombares em equinos atletas da raça quarto de milha. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, 2005, 71p. (Dissertação, Mestrado em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária).
- FONSECA, B.P.A.; ALVES, A.L.G.; NICOLETTY, J.L.M. et al. Thermography and ultrasonography in back pain diagnosis of equine athletes. **J Equine Vet Sci**, v.26, p.507-516, 2006.
- HARMON, K.; HANSON, R.; BOWEN, J. et al. Guidelines for the use of platelet rich plasma: Presented by The International Cellular Medical Society. Disponível em: <http://dcareusa.com/UserFiles/228File40774.pdf>. Acessado em 04/02/2014.
- HENSON, F. M. D.; LAMAS, L.; KNEZEVIC, S.; JEFFCOTT, L. B. Ultrasonographic evaluation of the supraspinous ligament in a series of ridden and unridden horses with unrelated back pathology. **BMC Vet Res**, v.3, p.1-7, 2007.
- HENSON, F. M. D., Ed. Equine Back Pathology: diagnosis and treatment. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. 266p.
- MAIA, L.; SOUZA, M. V.; ALVES, G. E. S. et al. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinitis in equines: ultrasonographic evaluation. **Pesq Vet Bra**, v.29, p.241-45, 2009.
- MARKS, D. Medical management of back pain. **Vet Clin North Am: Equine Pract**, v.15, p.179-194, 1999.
- MARR, C. M.; MCMILLAN, I.; BOYD, J. S. et al. Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon. **Equine Vet. J.** v.25, p.23-29, 1993.
- OLEZA, I. A. La terapia de las lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencias clínicas y bioquímicas que validan su utilización. Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària, Spain. 2009. 250f PhD Thesis. (Doctorado en Medicina y Sanidad Animales).
- PUROHIT, R .C.; McCOY, M. D. Thermography in the diagnosis of inflammatory processes in the horse. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p.1167-1174, 1980.
- REEF, V. B. Equine diagnostic ultrasound. Philadelphia: Saunders, 1998. 560p.
- TURNER, T. A. Thermography: a review in equine medicine. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.8, p.855-861, 1986.
- TURNER, T. A. Diagnostic thermography. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.17, p.95-113, 2001.
- TURNER, T. A. Use of thermography in equine lameness evaluation. In: North American Veterinary Conference – NAVC, 2007 – Orlando, Fla Proceedings...
- SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; MILLER, B. J. et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **J Orthop Res**, v.25, p. 230-240, 2007.
- VON SCHWEINITZ, D. G. Thermographic diagnostics in equine back pain, **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.15, p.161-177, 1999.
- WASELAU, M.; SUTTER, W. W.; GENOVESE, R.L. et al.. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. **J Am Vet Med Assoc**, v.232, p.1515-1520, 2008.
- WROBLEWSKI, B. S.; MEJIA, H. A.; WRIGHT, V. J. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. **Oper Tech Orthop**, v.20, p.98-105, 2010.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe grande interesse pelos resultados das pesquisas científicas que se encontram em transição da medicina reparativa para a medicina regenerativa. Muitas interrogações e anseios por algumas respostas permanecem presentes após adentrar no mundo das terapias regenerativas.

O aperfeiçoamento de algumas técnicas e ou equipamentos para a avaliação das plaquetas, devido à sua grande variabilidade, se faz necessário, diminuindo a variação entre exames e o tempo de treinamento do técnico.

Aplicações clínicas são necessárias para validar os efeitos biológicos dos PRPs que foram padronizados, principalmente em relação à criopreservação e ao uso em jumentos.

A avaliação do PRP sob simples centrifugação em jumentos pode ser o primeiro passo para o desenvolvimento de

estudos relativos à novas terapias regenerativas nesta espécie.

Avaliação da criopreservação de PRP obtidos em ACD como anticoagulantes pode diminuir as lesões de armazenamento que ocorrem nas plaquetas, uma vez que este anticoagulante apresenta sua ação quelando o Cálcio, fundamental para a ativação plaquetária. Outras formas de congelamento, principalmente em referência ao crioprotetor, tempo de descongelamento e forma de armazenamento deveriam ser privilegiadas nos estudos de criopreservação.

A comparação *in vivo* entre PRP de composição diferentes, como por exemplo, rico x pobre em leucócitos poderia revelar o efeito real dos leucócitos quando aplicados em uma lesão.

A utilização do PRP em outras causas de lombalgias, como desmiste do ligamento interespinhoso, síndrome dos processos espinhosos e osteoartrites dos processos articulares, apresenta potencial promissor.

ANEXO I



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 294 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Tratamento de úlcera superficial em cavalos com plasma rico em plaquetas autólogo e heterólogo”, que tem como responsável Maristela Silveira Palhares, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 19/11/2013. Este certificado expira-se em 19/11/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 294 / 2013, related to the Project entitled “Use of autologous and heterologous platelet-rich plasma in the treatment of corneal superficial ulcers in horses”, under the supervision of Maristela Silveira Palhares, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 19/11/2013. This certificate expires in 19/11/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 19/11/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

RECIBO

033/11

(O Nº do Protocolo é reservado ao CETEA) → PROTOCOLO Nº

(Preencha os itens abaixo, de acordo com a Identificação do Projeto)

Título do Projeto: Erro! Vínculo não válido. *Aplicação do efeito terapêutico do plasma*
no em plaquetas e da fibronectina em plaquetas em lesões teciduais
de epitelios: estudo "in vitro" e "in vivo"
 Responsável Principal: *Dr. Maistela Palhaus*
 http://lattes.cnpq.br/ *Erro! Vínculo não válido. Lattes, cnpq.br/1084289467-7846904*
 E-mail: *Erro! Vínculo não válido. palhaus@vt.ufmg.br ; maistela.palhaus@gmail.com*
 Telefone: (31) 3409 2229 - FAX: (31) 3409 - 2230

Recebido em: *16/03/11*
 (Rubrica do funcionário) *FRANCIS*

