

Fredy Esteban Osorio Carmona

**EFEITO DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS NO
TRATAMENTO DA OSTEOARTROSE INDUZIDA EM COELHOS**

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

Área de concentração: Medicina e cirurgia veterinárias.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cleuza Maria de Faria Rezende.

Coorientadores: Prof^ª. Dr^ª. Gilcinéa de Cássia Santana
Prof^ª. Dr^ª. Natália de Melo Ocarino.

Belo Horizonte

Escola de veterinária – UFMG

2015

C287e Carmona, Fredy Esteban Osorio, 1987-
Efeito do concentrado autólogo de plaquetas no tratamento da osteoartrose induzida em coelhos / Fredy Esteban Osorio Carmona. – 2015.
100 p. : il.

Orientadora: Cleuza Maria de Faria Rezende
Coorientadores: Gilcinéa de Cássia Santana, Natália de Melo Ocarino
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Coelho – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Plaquetas (Sangue) – Teses. 3. Articulações – Doenças – Teses. I. Rezende, Cleuza Maria de Faria. II. Santana, Gilcinéa de Cássia. III. Ocarino, Natália de Melo. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

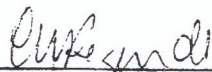
CDD – 636.932 208 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

FREDY ESTEBAN OSÓRIO CARMONA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 24 de Julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Cleuza Maria de Faria Rezende
Presidente - Orientadora



Prof. Rafael Resende Faleiros
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Raul Fernando Silva Molano
Universidad de Caldas- Colômbia

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me brindado a oportunidade de viver tantas experiências maravilhosas até hoje. Por me abençoar com uma família linda e por me dar a bênção de vir e começar uma nova vida no Brasil.

A minha família, principalmente a meus pais, por ter me dado às bases e os valores necessários para ser uma pessoa de bem, por me inculcar o respeito pelos outros, a honestidade e sobre tudo por me ensinar que as coisas que queremos ninguém nos dá e se obtém lutando e batalhando dia a dia com honestidade. Obrigado Pai, Mãe, Paula e Luly.

À Dra. Cleuza, pelo seu grande apoio em todo momento, pelos conselhos, pela infinita paciência, pelo compromisso com a formação de profissionais capacitados e por todo o estímulo para seguir em frente com os projetos pessoais e profissionais. Minha eterna e profunda admiração. Obrigado Professora.

Aos colegas de iniciação científica pela grande ajuda no cuidado e preparo dos coelhos para os procedimentos realizados. Vocês formaram parte importante na realização desta pesquisa.

À FAPEMIG pela bolsa de estudos que fez possível minha estadia no Brasil e o desenvolvimento desta pesquisa.

À Ana Paula e sua família, pela confiança, pelo acolhimento, pelo apoio e ajuda incondicional em todos os momentos. Obrigado por abrir as portas de sua casa para mim. Te amo amor.

Às senhoras de São Tiago, por ter me acolhido como mais um filho. Deus lhes pague seu carinho e recepção.

À professora Gilcinéa de Cássia Santana pela ajuda com as provas de ELISA e sua orientação no projeto.

Ao Dr. Walter Motta Ferreira pela liberação do espaço no Laboratório de Metabolismo e Animal.

À equipe anestésica e cirúrgica do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, pela ajuda em todos os procedimentos e a companhia nas horas de lazer.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	4
	LISTA DE FIGURAS	6
	RESUMO	7
	ABSTRACT	8
1.	INTRODUÇÃO	9
2.	LITERATURA CONSULTADA	9
	2.1 Osteoartrose	12
	2.2 Líquido sinovial	15
	2.3 Artroscopia	15
	2.4 Fisiologia das plaquetas	16
	2.5 As plaquetas e seu papel na cicatrização	21
	2.6 Concentrado Autólogo de Plaquetas (CAP)	21
	2.7 Obtenção do CAP	23
3.	OBJETIVOS	25
	3.1 Objetivo geral	25
	3.2 Objetivos específicos	25
4.	MATERIAL E MÉTODO	26
	4.1 Animais	26
	4.2 Anestesia	27
	4.3 Procedimentos artroscópicos	28
	4.4 Obtenção das amostras e produção do CAP	28
	4.5 Avaliação ortopédica	30
	4.6 Avaliação goniométrica	31
	4.7 Avaliação radiográfica	32
	4.8 Avaliação ultrassonográfica	32
	4.9 Coleta e análise do líquido sinovial	32
	4.10 Coleta de sangue e armazenamento amostras de plasma.....	33
	4.11 Quantificação dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF.....	34
	4.12 Análise estatística	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
	5.1 Avaliação ortopédica	36
	5.2 Avaliação goniométrica	42
	5.3 Avaliação radiográfica.....	44
	5.4 Avaliação ultrassonográfica	56
	5.5 Avaliação líquido sinovial	64
	5.6 Avaliação hematológica e do CAP.....	71
	5.7 Concentração do TGF- β 1 e do PDGF no plasma	75
6.	CONCLUSÕES	80
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8.	ANEXOS	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sistema de classificação do apoio e posição do membro, da crepitação, da efusão articular e da sensibilidade dolorosa de coelhos portadores de OA experimental.	30
Tabela 2.	Valores da média e do desvio padrão do apoio e abdução do membro posterior direito de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	36
Tabela 3.	Valores da média e desvio padrão do grau de crepitação articular em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	37
Tabela 4.	Valores da média e desvio padrão da sensibilidade dolorosa da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	39
Tabela 5.	Valores da média e desvio padrão do parâmetro efusão articular de coelhos de ambos os grupos nos momentos M1, M2 e M3.	40
Tabela 6.	Valores da média e desvio padrão dos ângulos de flexão e extensão da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3. Valores da média e do desvio padrão do parâmetro esclerose subcondral nos coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3	42
Tabela 7.	Valores da média e do desvio padrão do parâmetro presença de osteófitos nos coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	47
Tabela 8.	Valores da média e do desvio padrão do parâmetro efusão articular em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3	49
Tabela 9.	Valores da média e do desvio padrão do parâmetro esclerose subcondral nos coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	51
Tabela 10.	Valores da média e do desvio padrão do parâmetro intensidade do processo degenerativo em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	53
Tabela 11.	Valores da média e do desvio padrão da espessura da cartilagem e espaço ocupado pelo líquido sinovial em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	57
Tabela 12.	Valores da média e do desvio padrão da espessura do ligamento patelar em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	61
Tabela 13.	Avaliação macroscópica do líquido sinovial de coelhos	64

	de ambos os grupos no M2.	
Tabela 14.	Avaliação macroscópica do líquido sinovial de coelhos de ambos os grupos no M3.65
Tabela 15.	Volume (ml) de líquido sinovial e níveis de proteína (g/dL) no líquido sinovial da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos acometidos pela OA no M2 e M3.66
Tabela 16.	Valores da contagem celular total no líquido sinovial da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.69
Tabela 17.	Valores da média e desvio padrão das variáveis hematológicas no sangue total e no CAP de coelhos do grupo CAP 21 dias após a ruptura do LCCr (M2).70
Tabela 18.	Valores da média e do desvio padrão das variáveis hematológicas no sangue total e no CAP de coelhos de ambos os grupos aos 21 dias após a ruptura do LCCr (M2).72
Tabela 19.	Valores da média e desvio padrão das variáveis hematológicas no sangue total e no CAP de coelhos do grupo CAP 15 dias após a substituição do LCCr (M3).72
Tabela 20.	Valores da média e do desvio padrão dos níveis de TGF- β 1 no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.76
Tabela 21.	Valores da média e desvio padrão dos níveis de PDGF no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Radiografias mediolateral e ventrodorsal da articulação FTP saudável de coelhos do grupo controle no momento M1.	46
Figura 2.	Radiografias mediolateral e ventrodorsal da articulação FTP saudável de coelhos do grupo CAP no momento M1.	47
Figura 3.	Radiografias mediolateral de coelhos do grupo controle no momento M2.	48
Figura 4.	Radiografias mediolateral e ventrodorsal de coelhos do grupo CAP no momento M2.	50
Figura 5.	Radiografias mediolateral e ventrodorsal de coelhos do grupo controle no momento M3.	52
Figura 6.	Radiografias mediolateral e ventrodorsal de coelhos do grupo CAP no momento M3.	54
Figura 7.	Imagem ultrassonográfica da articulação FTP saudável de coelho antes da secção do LCCr.	56
Figura 8.	Imagem ultrassonográfica da articulação FTP de coelho do grupo controle no M2 e M3.	58
Figura 9.	Imagem ultrassonográfica da articulação FTP de coelho do grupo CAP no M2 e M3.	59
Figura 10.	Imagem ultrassonográfica da espessura do ligamento patelar da articulação FTP de coelho do grupo controle no M2 e M3.	62
Figura 11.	Imagem ultrassonográfica da articulação FTP de coelho do grupo CAP no M2 e no M3.	63
Figura 12.	Concentrado Autólogo de Plaquetas obtido após centrifugação do sangue total dos coelhos do grupo CAP.	73
Figura 13.	Concentração de TGF- β 1 no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	77
Figura 14.	Concentração de PDGF no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.	78

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) sobre a osteoartrose (OA) induzida em coelhos, por meio de exames clínicos, radiográficos, ultrassonográficos, laboratoriais e artroscópicos, e determinar a concentração dos fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e transformador β (TGF- β) no plasma de coelhos tratados com CAP e com Ringer Lactato. Foram empregados 14 coelhos da raça Nova Zelândia com massa corporal média de 3,0 kg submetidos à ruptura do ligamento cruzado cranial (LCCr) e posterior substituição por auto-enxerto de fásia lata, guiados por videoartroscopia. Os animais foram distribuídos em dois grupos de sete e receberam injeções intra-articulares de CAP ou de Ringer Lactato. Na avaliação ortopédica os coelhos tratados com CAP mostraram resultados (escores) significativamente superiores ($p < 0,05$) ao grupo controle quanto à sensibilidade dolorosa, presença de efusão articular e apoio do membro no momento M3. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos ângulos de flexão e extensão do membro posterior direito (MPD) entre os grupos no momento M3, com melhores resultados nos animais do grupo CAP. Não houve diferença entre os grupos nas avaliações radiográficas e ultrassonográficas nos tempos avaliados. Foi observado entre os grupos, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na avaliação do líquido sinovial somente em relação ao volume e a proteína no M3. Verificou-se na contagem celular, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o CAP e o sangue total nos momentos M2 e M3. O volume plaquetário médio (MPV) entretanto, foi semelhante. A concentração do PDGF foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) nos coelhos tratados com CAP no M3 em relação ao grupo controle, mas não houve diferença estatística na concentração do TGF- β 1 entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados. Os resultados obtidos permitem concluir que o método empregado para concentrar plaquetas inativas de coelhos foi efetivo e que o CAP tem efeito favorável em articulações acometidas pela osteoartrose (OA). A dosagem dos fatores de crescimento PDGF e TGF- β 1, pode ser usada como marcadores biológicos para avaliar o processo degenerativo.

ABSTRACT

The objectives of this study was to evaluate the effect of the autologous platelet concentrate (APC) on osteoarthritis (OA) induced in rabbits, through clinical, radiographic, ultrasonographic, laboratorial and arthroscopic evaluations, and to determinate the platelet derived growth factor (PDGF) and of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) concentrations in plasma of rabbits treated with APC or Ringer Lactato. Were used 14 New Zealand rabbits with average body weight of 3,0 kg submitted to cranial cruciate ligament (LCCr) resection and substitution with fascia lata auto-graft guided by arthroscopy. The rabbits were distributed in two groups of seven animals each and received intra-articular injections of APC or Ringer Lactato. In the orthopedic evaluation the APC group showed significantly better results ($p < 0,05$) than the control group rabbits in relation to the pain sensitivity, presence of articular effusion and member support and position in moment M3. It was observed significant statistically differences ($p < 0,05$) in the flexion and extension angles in the right hindlimb between groups in the M3. It was not observed significant differences between the groups in the radiographic and ultrasonographic evaluation. It was observed between the groups significant statistically difference ($p < 0,05$) in the synovial fluid evaluation just in relation to volume and protein parameters in the moment M3. It was verificated in the cellular counts, significant statistically difference ($p < 0,05$) between the APC and the total blood in the moments M2 and M3. The medium plaquetary volume (MPV), however, was simillar. The PDGF concentration was statistically higer ($p < 0,05$) in ACP group in the M3 in relation to the control group, but there was not statistically significant difference in the TGF- β 1 concentration between groups on any of the avaliated moments. The obtained result allow to conclude that the employed method to concentrate inactive platelets of rabbits was effective and that ACP have a favorable effect in joints affected by osteoarthritis (OA). The dosage of growth factors PDGF e TGF- β 1, can be used as a biological marker to evaluate the degenerative process.

1. INTRODUÇÃO

A doença articular degenerativa é uma afecção progressiva, dolorosa e incapacitante, cujos tratamentos disponíveis não são satisfatórios. O diagnóstico precoce e o acompanhamento da evolução da doença e do tratamento ainda são desafios.

Com a introdução relativamente recente das terapias celulares em diferentes situações clínicas, surge uma possível alternativa de controle mais eficaz da doença. Dentre as modalidades de terapia celular, destaca-se a injeção de plasma rico em plaquetas, que segundo Civinini et al (2011), despertou o interesse da comunidade científica por ser seguro, de fácil preparo e aplicação e de custo relativamente baixo. Os resultados clínicos sugerem que este procedimento pode ser útil no tratamento da OA, mas faltam estudos controlados que comprovem seu efeito e ainda não se sabe se o CAP propicia melhora temporária dos sintomas ou se esta terapia realmente tem papel importante no controle da doença articular degenerativa.

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar por meio de exames clínicos, radiográficos, ultrassonográficos, artroscópicos e laboratoriais o efeito do CAP no controle da OA induzida em coelhos.

2. LITERATURA CONSULTADA

As doenças ortopédicas, especialmente as articulares, representam uma grande porcentagem de casos na rotina dos hospitais veterinários e podem acometer animais de qualquer idade ou sexo (Tatarunas, 2004). Essas afecções, decorrentes principalmente de lesões traumáticas, podem afetar os ossos e ligamentos, comprometendo assim, a estabilidade articular, a integridade da articulação e a amplitude do movimento articular (Conceição et al., 2012; Govoni, 2011).

A ruptura do ligamento cruzado cranial (LCCr) seja completa ou parcial promove alterações na biomecânica da articulação e é uma das causas mais freqüentes de claudicação em pequenos animais (Pelisson et al., 2010; Louboutin et al., 2009; Johnson e Johnson, 1993), devido à instabilidade articular, cuja seqüela inevitável é a osteoartrose (OA) (Doom et al., 2008; Canapp Jr, 2007; Tashman et al., 2004). Depois da ruptura do LCCr ocorrem alterações na locomoção do animal que levam a mudanças cinemáticas durante o suporte de peso e a marcha para diminuir a instabilidade articular (Korvick e Pijanowski, 1994).

Existem diferentes métodos empregados para avaliar e diagnosticar a ruptura do LCCr (Guermazi et al., 2013). A ultrassonografia (Schnappauf et al., 2001), a radiografia (Oliveira et al., 2009) e a artroscopia são os exames classicamente empregados para o diagnóstico da ruptura do LCCr, porém a artroscopia apresenta mais vantagens devido à qualidade da informação obtida em comparação com os demais exames disponíveis (Rezende et al., 2006).

Os achados radiográficos têm sido amplamente descritos (Melo et al., 2003; Bennett et al., 1988) e permitem evidenciar os osteófitos após três semanas após a ruptura do LCCr, embora

muitas vezes os sinais radiográficos não coincidem com o estado clínico dos pacientes (Innes et al., 2004). A ultrassonografia também tem sido empregada para avaliar e diagnosticar alterações na articulação fêmoro-tíbio-patelar (FTP) em eqüinos (Cisneros, 2008; Denoix, 1996; Flynn e Whitcomb, 2002) e em cães (Gnudi e Bertoni, 2001; Muzzi et al., 2001).

O tratamento desta alteração ainda é motivo de pesquisas (Mateus, 2010). São relatadas na literatura diferentes modalidades terapêuticas, como protocolos conservativos e tratamentos cirúrgicos que incluem técnicas extra e intra-capsulares e o uso de diferentes tipos de enxertos. O tratamento tem como objetivos o restabelecimento da estabilidade articular e o retardo da progressão da OA. (Muzzi et al., 2009; Huang et al., 2008).

A OA resulta de uma complexa interação entre fatores bioquímicos e biomecânicos. As alterações associadas com o processo degenerativo envolvem todos os tecidos articulares, incluindo cápsula articular, osso subcondral, ligamentos e músculos, resultando em dano e destruição da cartilagem articular (Rayward et al., 2004; Innes et al., 2000; Johnston, 1997) e diminuição da amplitude do movimento articular (Baraúna Jr et al., 2007).

Embora a fisiopatologia da OA ainda não esteja esclarecida, é sabido que as mudanças estruturais incluem degradação progressiva da cartilagem articular, formação de osteófitos, esclerose do osso subcondral e inflamação sinovial. Essas mudanças podem se entender melhor quando a relação entre os fatores biomecânicos e os bioquímicos são completamente entendidos (Lavigne et al., 2005).

As citocinas e os fatores de crescimento exercem um papel fundamental na indução e progressão da OA. As citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (FNT- α) aumentam a síntese das enzimas de degradação da matriz extracelular (MEC) e diminuem a síntese de proteínas da MEC (Doom et al., 2008; Carmona et al., 2007; Cheon et al., 2002).

Na articulação normal, o equilíbrio entre as atividades anabólicas e catabólicas se mantém, entretanto quando se perde este equilíbrio, as citocinas pró-inflamatórias, normalmente liberadas pelos condrócitos e sinoviócitos, contribuem para a degradação da cartilagem e a perda de matriz cartilaginosa (Vidotto et al., 2013; Doom et al., 2008; Irie et al., 2003; Cameron et al., 1997), ocasionando diminuição do espaço articular, esclerose subcondral, formação de osteófitos marginais e a inflamação sinovial que resulta em dor e diminuição da função (Vidotto et al., 2013).

A injúria repetitiva parece ser um importante fator para a síntese de citocinas e qualquer alteração no equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode contribuir para o desenvolvimento do processo degenerativo. A produção insuficiente de fatores de crescimento e o desequilíbrio entre a inibição e a produção de metaloproteinasas favorecem o catabolismo da cartilagem (Johnston, 1997).

Acredita-se que as citocinas mais importantes envolvidas na patofisiologia da OA sejam as interleucinas (I α , I β , 6 e 8), o FNT- α , o fator de crescimento transformador β (TGF- β) e o antagonista do receptor da interleucina I. Estas citocinas podem ser encontradas no líquido sinovial (Doom et al., 2008; Carter et al., 1999).

Existem biomarcadores sanguíneos e do líquido sinovial que podem ser usados para identificar os estágios iniciais do processo degenerativo, para avaliar a evolução do mesmo e para determinar a eficácia dos tratamentos. Os marcadores refletem a síntese e a degradação da MEC (Doom et al., 2008).

A OA é um processo doloroso e incapacitante, cujo objetivo primário do tratamento é o alívio da dor. Geralmente empregam-se agentes modificadores da osteoartrose, visando diminuir a dor e manter ou melhorar a função articular, sendo necessário tratar a causa primária que deu origem ao problema (Rezende e Gobbi, 2009).

Os principais agentes empregados são os glicosaminoglicanos polissulfatados, o sulfato de condroitina e o ácido hialurônico intra-articular, que podem reduzir a dor, a inflamação e restabelecer o ambiente articular. Eles possuem substâncias como glicolipídeos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos dentre outros que desenvolvem um papel fundamental na formação das superfícies articulares, tendões, tecido sinovial, ossos e que têm participação no metabolismo da cartilagem articular (Canapp, 2013). Embora estas substâncias sejam empregadas com frequência na rotina, elas nem sempre têm os efeitos desejados e não oferecem um controle satisfatório do desenvolvimento da OA.

Tem sido relatado também, o uso de antiinflamatórios não esteroidais na tentativa de diminuir a inflamação e a dor causadas pela OA, mas em muitos casos, estes medicamentos oferecem poucos benefícios sobre o controle da doença e podem ter efeitos deletérios sobre a articulação e outros sistemas corporais (Clark, 2006; Lees et al., 2004).

Diante da ausência de efetivo controle do processo, novas alternativas de tratamento são propostas. Elas se baseiam na aplicação intra-articular de diferentes tipos de células autógenas obtidas de diferentes fontes, cuja ação é favorecer a recuperação dos tecidos lesionados. Essas células possuem características intrínsecas tais como fatores de crescimento e pluri potencialidade para proliferar e se diferenciar em diferentes tipos celulares que podem modular a recuperação tecidual. Estas novas terapias são conhecidas como terapia regenerativa e engenharia tecidual (Silva, 2012; Huang et al., 2008; Petrigliano et al., 2006).

Dentre as terapias celulares encontra-se o concentrado autólogo de plaquetas (CAP), cuja literatura relata o benefício de seu uso na reparação e cicatrização de tecidos doentes ou lesionado. Os resultados mostram grande potencial terapêutico quando empregado em humanos, na reparação dental e maxilar (Flores et al., 2012), em cavalos, para o tratamento de lesões musculoesqueléticas (Carmona, 2006) e em cães, como terapia coadjuvante no tratamento da osteoartrose adquirida (Silva, 2012).

Os concentrados autólogos de plaquetas possuem altos níveis de plaquetas que, após serem ativadas, liberam algumas substâncias provenientes dos grânulos presentes no seu citoplasma, principalmente fatores de crescimento, dentre os quais destacam-se o fator de crescimento beta transformador (TGF- β) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (Silva, 2012). Esses fatores de crescimento têm varias funções e atuam em conjunto com outros tipos de células e substâncias anti e pro-inflamatórias para a regeneração os tecidos (Kim et al., 2008).

Estudos experimentais têm mostrado o efeito favorável do emprego de CAP no retorno das funções após lesões ligamentares, lesões traumáticas na cartilagem articular e em fraturas, mas ainda há controvérsia sobre sua ação nos tecidos articulares (Patel et al., 2013; Milano et al., 2010; Weibrich et al., 2004).

2.1. Osteoartrose

A OA não é uma doença única e sim uma doença multifatorial que envolve diferentes fatores predisponentes (Stockwell, 1991) e que pode acometer qualquer articulação (Rychel, 2010; Franklin et al., 2009). Esta doença é a mais comum das afecções articulares nos animais domésticos e é considerada como uma doença articular degenerativa crônica caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem articular (Beckwee et al., 2013; Zhu et al., 2013; Mercuri, 2008).

O dano progressivo compromete a integridade da cartilagem e está associado com dor e disfunção. As alterações no osso subcondral e a perda da cartilagem resultam em inflamação, claudicação, diminuição na amplitude dos movimentos, dor e incapacidade física (Dunlop et al., 2010; Mendonça, 2009; Liu et al., 2003; Westacott e Sharif, 1996).

A OA é uma condição degenerativa e de curso lento que envolve geralmente as articulações sinoviais. Embora a etiologia seja difícil de determinar, ela pode ter causa primária ou secundária, decorrente de forças anormais sobre a articulação (fratura intra-articular, luxações, ruptura de ligamentos) ou de uma força normal sobre uma articulação anormal (osteocondrose, displasias) (Johnston, 1997).

Radiograficamente é possível observar algumas mudanças articulares como neoformação óssea periarticular, efusão articular e esclerose subcondral (Ribeiro, 2011; Innes et al., 2004; Rayward et al., 2004; Melo et al., 2003; Buquera et al., 2002; Widmer et al., 1994).

Independente da variedade de causas que levam ao desenvolvimento da OA acredita-se que uma via celular e molecular comum conduz à ruptura da cartilagem articular, esclerose do osso subcondral e inflamação da membrana sinovial e da cápsula articular, cujo tratamento exige conhecimento avançado da anatomia, da fisiologia e da patologia envolvidas no processo (Johnston, 1997; Gardner, 1994).

Alguns estudos têm reportado numerosas alterações na biomecânica das articulações FTP acometidas pela deficiência do LCCr, bem como alterações como fibrilação e erosão da

cartilagem, hipertrofia das vilosidades, formação de osteófitos e mudanças bioquímicas que ocorrem principalmente durante o primeiro ano após a lesão ligamentar (Tashman et al., 2004; Guilak et al., 1994).

A degeneração da cartilagem se deve principalmente às alterações no metabolismo dos condrócitos e sinoviócitos em favor da atividade catabólica, a qual envolve outros tecidos articulares, como os meniscos, o osso subcondral subjacente e a sinovia (Zhu et al., 2013).

O diagnóstico da OA baseia-se principalmente nos exames clínicos de imagem (Widmer et al., 1994). Na maioria dos casos, entretanto, há discrepância entre os sinais clínicos e os radiográficos (Henrotin et al., 2012).

Independente da causa do processo degenerativo, a cartilagem acometida é usualmente mais fina e mais hidratada que a cartilagem normal (Liu et al., 2003). Os níveis das macromoléculas como glucosaminoglicanos encontram-se aumentados, indicando que as moléculas de agreganos contêm maior proporção de sulfato de condroitina, e que os condrócitos sintetizam agreganos imaturos e maiores, o que confirma a formação de cartilagem imatura (Liu et al., 2003).

As mudanças que tem lugar no processo degenerativo ocasionam alterações das características do líquido sinovial, sendo que, é possível avaliar macroscópica e celularmente o fluido para detectar alterações na MEC (MacWilliams e Friedrichs, 2003; Ratcliffe et al., 1998; Ellison, 1988).

2.1.1. Fatores bioquímicos

Alguns estudos recentes postulam a OA como uma doença inflamatória causada por respostas mediadas por condrócitos e sinoviócitos (Rezende e Campos, 2013; Konttinen et al., 2012; Bonnet e Walsh, 2005) que se perpetua. Os níveis séricos e sinoviais de citocinas inflamatórias são maiores em pacientes com OA (Rezende e Campos, 2013; Sohn et al., 2012).

As mudanças bioquímicas nesta cartilagem afetam os dois principais componentes da MEC: o colágeno e os proteoglicanos. Este último é a primeira macromolécula da matriz a ser acometida. Durante o processo patológico há uma diminuição dos proteoglicanos, que indica a gravidade da doença (Liu et al., 2003). Em estágios avançados os condrócitos são incapazes de compensar a diminuição dos proteoglicanos, resultando assim em perda da MEC (Pelletier et al., 1991).

As citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, a IL-8 e o FNT- α e as quimiocinas têm sido encontradas em quantidades elevadas em articulações de humanos com artrite reumatóide, assim como citocinas anti-inflamatórias tais como a IL-10. A IL-1 e o FNT- α estão entre as primeiras citocinas liberadas pelos monócitos ativados e pelos macrófagos na resposta imune. Uma vez liberadas elas agem nas células do sistema não imune como as células endoteliais, condrócitos e osteoblastos para produzir mais IL-1, IL-8 e FNT- α aumentando a concentração de citocinas que resulta em inflamação acentuada (De Bruin et al., 2005; Carter et al., 1999;

Dieppe et al., 1993).

Em um estudo no qual se induziu a OA através da colagenase, o grupo no qual houve a depleção dos macrófagos sinoviais não apresentou degradação da cartilagem, o que significa que os macrófagos têm papel fundamental na patogênese da OA e não é apenas consequência dela (Blom et al., 2007).

A IL-1 e o FNT- α induzem a liberação de outras interleucinas como a IL-6, as quais promovem a infiltração celular, a hematopoiese e a angiogênese através da proliferação das células endoteliais. Por meio destes mecanismos, as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos poderiam ser responsáveis por algumas das mudanças inflamatórias nas doenças articulares e podem estimular os sinoviócitos e os condrócitos a produzir e ativar as metaloproteinases, que tem um papel fundamental no processo destrutivo da cartilagem articular (Carter et al., 1999; Coughlan et al., 1998a; Coughlan et al., 1998b). A IL-1 e o FNT- α atuam sinergicamente para induzir e manter a inflamação e a erosão articular nas artrites (Bruin et al., 2005).

Um dos sinais clínicos observados em pacientes com OA é o aumento do volume articular, causado pelo derrame articular ou espessamento capsular, demonstrando assim a presença de sinovite (Rezende e Campos, 2013; Ellison, 1988). A sinovite e o derrame articular são considerados fatores que induzem a perda da cartilagem articular. Tem-se encontrado uma associação direta entre o grau de sinovite e o deterioramento articular (Ayril et al., 2005).

Aproximadamente 50% dos casos de OA em caninos apresentam sinovite moderada a acentuada em biópsias sinoviais (Baines, 1994; Hardy e Wallace, 1974). Esta sinovite é caracterizada por hipertrofia e hiperplasia das células da íntima sinovial, proliferação das vilosidades e infiltração moderada de linfócitos, células plasmáticas e monócitos (Carter et al., 1999).

Num estudo em ratos, pesquisou-se o efeito da IL-1 e do FNT- α no desenvolvimento da artrite aguda injetando estas substâncias na articulação FTP na dose de 3, 10 ou 30 μ g. Observou-se dois dias após que a IL-1 induziu significativamente, dose-dependente, um aumento na inflamação (de moderada a acentuada), na reabsorção óssea (de mínima a moderada) e na formação de osteoclastos (de mínima a moderada). Em contraste, o FNT- α induziu mínima a moderada inflamação, mas teve pouco efeito na reabsorção óssea e na proliferação de osteoclastos. Tanto a IL-1 quanto o FNT- α induziram discreta degeneração na cartilagem articular (Bolon et al., 2004). Os autores concluíram que ambas as citocinas estimulam o processo inflamatório, mas que a IL-1 é a citocina que leva à destruição do osso subcondral (Bolon et al., 2004).

É indiscutível o papel fundamental que desempenham as citocinas no processo fisiopatológico da OA. Elas promovem degradação da cartilagem articular e dos componentes da MEC através de enzimas liberadas por condrócitos e sinoviócitos estimulados por estas moléculas, ao mesmo tempo em que aumenta a resposta inflamatória do tecido local, favorecendo e perpetuando o processo inflamatório (Sanz et al., 2006; Coughlan et al., 1998a; Bolon et al., 2004; Brandt,

1989).

2.2 Líquido sinovial

O líquido sinovial é um dialisado do sangue acrescido com mucoproteínas produzidas pelos sinoviócitos. Normalmente é claro, límpido, com alta viscosidade, teste de mucina positivo (Borges et al., 1999) e tem como função principal a lubrificação das superfícies articulares para facilitar o movimento das estruturas ósseas e a nutrição da cartilagem articular (Parry, 1999).

O fluido sinovial é considerado também uma importante fonte de dados que permite identificar as modificações citológicas e bioquímicas que podem ocorrer nas articulações acometidas por alterações inflamatórias, degenerativas ou infecciosas (Fonseca et al., 2009; Bernabe et al., 2005; Tatarunas et al., 2004).

O líquido sinovial de uma articulação com osteoartrose pode mostrar alterações nas características macroscópicas, bioquímicas e citológicas como consequência do processo degenerativo. Mudanças na viscosidade, na cor, na turgidez, na contagem celular, dentre outras são as mais comumente encontradas (Borges et al., 1999; Fonseca et al., 2009; Bernabe et al., 2005).

2.3. Artroscopia

A artroscopia constitui-se na avaliação visual de uma articulação através de uma pequena fibra ótica, o artroscópio. Para a correta visualização das estruturas que compõem a articulação é necessário a distensão articular, que é feita geralmente com Ringer Lactato. As imagens obtidas durante a avaliação são vistas no monitor e gravadas, facilitando assim a observação e análise por todos da equipe (Rezende et al., 2006).

Através da artroscopia é possível avaliar estruturas como os meniscos, a cartilagem, a membrana sinovial, ligamentos, tendões e alterações articulares, facilitando assim o diagnóstico de alguns processos patológicos que não são diagnosticados clinicamente como a tendinite e a sinovite (Saito et al., 2009; Rezende et al., 2006; Tatarunas, 2004).

A artroscopia proporciona maior área de visualização, iluminação e aumento das estruturas, o que permite a visão detalhada da articulação e informações que não são obtidas com outros exames de rotina (Rezende et al., 2006). Outras vantagens relacionadas com o exame artroscópico são o diagnóstico precoce dos processos articulares degenerativos e outras patologias que envolvem a articulação, bem como a rápida recuperação do paciente por ser um procedimento minimamente invasivo, (Rezende et al., 2006).

É uma técnica que permite um exame rico em minúcias com informações significativas que podem ajudar a elucidar diversas afecções articulares que acometem as espécies domésticas (Muzzi et al., 2009; Rezende et al., 2016; Tatarunas et al., 2004). A técnica deve ser executada com precaução devido ao pequeno tamanho das articulações e a algumas complicações inerentes como o risco de lesão iatrogênica da cartilagem articular e acúmulo de fluido nos

tecidos moles intra-articulares (Tatarunas et al., 2006).

2.4. Fisiologia das plaquetas

As plaquetas são células anucleadas derivadas dos megacariócitos da medula óssea, cujo diâmetro varia de 1 a 3 μm nos cães e de 2 a 6 μm nos gatos, com uma vida média entre 6 a 10 dias. São células multifuncionais e atuam em vários processos fisiológicos como a hemostasia, manutenção e regulação do tônus vascular, formação e retração do coágulo (Harrison, 2005).

Essas células são caracterizadas por sua ampla variedade de funções e estão envolvidas em muitos processos fisiopatológicos incluindo a hemostasia e a trombose, formação e contração do coágulo, reparação e constrição dos vasos sanguíneos, inflamação, defesa do hospedeiro e inclusive o crescimento e metástase de tumores (Harrison, 2005).

Após uma lesão específica as plaquetas são dispostas sobre a parede do vaso afetado e desencadeia uma resposta funcional altamente regulada que envolve processos como adesão, espalhamento, reações de liberação, agregação, formação de micropartículas e retração do coágulo (Harrison, 2005).

Elas atuam na modulação da hemostase, na reparação de feridas e no início da cicatrização tecidual, uma vez que contêm fatores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios. Estes agem produzindo quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização, angiogênese e deposição de MEC, além de atuar na resposta imune (Silva et al., 2012a; Carrasco et al., 2009; Carmona, 2006; Sanchez et al., 2003).

Nas lesões teciduais, as plaquetas chegam ao local e entram em contato com o colágeno e o fator de Von Willebrand expostos dentro da MEC, o que ativa as mesmas e produz a liberação de substâncias que aumentam a agregação plaquetária e a ativação das vias da coagulação para a formação do coágulo de fibrina. Dessa forma exercem suas funções na coagulação e no processo de cicatrização (Silva, 2012; Boswell et al., 2012; Iacopetti et al., 2012; Blair e Flaumenhaft, 2009; Mishra et al., 2009).

As plaquetas contêm, no seu interior, uma variedade de grânulos encarregados de secretar diferentes substâncias depois de ativadas. Os principais grânulos são os lisossomais, os grânulos densos e os grânulos α , os quais exercem uma função diferente durante o período de reparação das feridas. As principais substâncias secretadas pelos grânulos, após a ativação, são os fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , IGF, FGF, EGF, VEGF), citocinas, fator de Von Willebrand, serotonina, fator V, XI e XIII, fibrinogênio, ATP, fibronectina, dentre outros que exercem diferentes funções no processo de cicatrização (Gobbi e Vitale, 2012; Intini, 2009).

Após a injúria, a membrana celular libera tromboxanos e prostaglandinas 2α , promovendo vasoconstrição inicial (Broughton et al., 2006a). Posteriormente, as plaquetas são ativadas pela exposição às proteínas da MEC como colágeno, fator de Von Willebrand e fibronectinas dentre outras (Smith e Roukis, 2009), fazendo com que se inicie a agregação plaquetária e a formação

inicial de um trombo (Broughton et al., 2006b; Witte e Barbul, 1997). Esse processo chamado ativação inclui mudanças na morfologia da plaqueta e liberação do conteúdo dos grânulos, cujas substâncias liberadas potencializam a ativação plaquetária (Diegelmann e Evans, 2004; Behnke e Forer, 1998).

Durante a fase de ativação, os grânulos α unem-se à membrana da plaqueta para liberar os fatores de crescimento, as citocinas e quimosinas que auxiliam na migração e crescimento celular. Este processo se inicia nos primeiros dez minutos após a ativação e termina aproximadamente uma hora depois (Diegelmann e Evans, 2004; Marx, 2004; Behnke e Forer, 1998). A progressão da coagulação sanguínea continua com a formação de trombina e fibrina, por meio das vias intrínsecas e extrínsecas ao redor do tampão plaquetário inicial. As interações finais entre os fatores e enzimas envolvidas no processo terminam com a formação de um coágulo estável (Smith e Roukis, 2009).

A liberação das substâncias contidas nos grânulos das plaquetas como serotonina e tromboxanos amplifica a ativação das plaquetas, enquanto a liberação de trombina atua como um forte agonista da ativação plaquetária, mas também da degranulação e deposição dos fatores de crescimento (Smith e Roukis, 2009; Marx, 2004; Froum et al., 2002).

Aproximadamente depois de 10 minutos da agregação plaquetária e da formação do coágulo as plaquetas secretam ativamente numerosos peptídeos e proteínas, processo que se estende até por 60 minutos, momento no qual 95% do conteúdo dos grânulos já foram secretados (Smith e Roukis, 2009; Marx, 2004).

As principais substâncias liberadas pelos grânulos depois da ativação plaquetária incluem os fatores de crescimento que desenvolvem funções importantes na sinalização e regulação do processo inflamatório e da cicatrização tecidual. Os grânulos α se aderem à membrana plasmática depois da ativação liberando o seu conteúdo e aumentando a superfície de área da plaqueta (Blair e Flaumenhaft, 2009). Os principais fatores de crescimento liberados são:

- **Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF):** Compreende uma família de fatores de crescimento homo e heterodímeros que incluem o PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD e exercem sua função através da união a três receptores transmembrana diferentes. O PDGF se caracteriza por aumentar a quimiotaxia, produzir migração de células como neutrófilos, monócitos e fibroblastos, favorece a proliferação dos fibroblastos e a produção da MEC e estimula a formação de miofibroblastos (Werner e Grose, 2003; Heldin e Westermark, 1999; Clark, 1993).

O PDGF foi encontrado pela primeira vez dentro dos grânulos α das plaquetas, mas também é possível encontrá-lo nos monócitos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, epiteliais e na matriz óssea (García-Denche, 2006; Lynch et al., 1987).

Têm sido propostos dois mecanismos principais de ação do PDGF na reparação das feridas: uma função inicial que estimula a proliferação dos fibroblastos e uma função tardia que induz a formação de miofibroblastos (Werner e Grose, 2003).

Estudos realizados *in vitro* com células humanas e animais parecem indicar que o PDGF pode contribuir para o recrutamento de células ósseas durante a reparação e remodelação do osso, sendo liberado posteriormente durante a degradação da matriz (Matsuda et al., 1992). Outra pesquisa demonstrou o efeito do PDGF sobre a matriz óssea. Toda a superfície do osso novo encontrava-se rodeado por uma camada de células osteoblásticas contínuas. Essa capacidade é devida ao efeito do fator de crescimento sobre as células mesenquimais presentes no local (Lynch et al., 1989).

O PDGF favorece a formação de colágeno tipo I e tem sido relatado seu potente efeito mitogênico e quimiotático sobre as células do tecido conectivo, além do estímulo sobre as células de origem mesenquimatosas como os fibroblastos, as células da glía, as células musculares lisas e as células ósseas (Rodríguez et al., 2012; García-Denche, 2006).

- **Fator de crescimento transformador (TGF):** O TGF é um fator de crescimento que contém dois subtipos, o TGF- α e o TGF- β . O principal é o TGF- β .

O TGF- α está estreitamente associado ao EGF e se unem aos mesmos receptores, o que leva a uma competição pelos sítios de ligação (Garcia-Denche, 2006). Entre suas principais ações biológicas podem se destacar o aumento da proliferação e migração de células epiteliais, a liberação de íons cálcio e o efeito angiogênico (Gao et al., 1999).

O TGF- β é um polipéptido que têm cinco isoformas. Esse fator de crescimento é secretado pelas plaquetas, pelos macrófagos, linfócitos T, células endoteliais e keratinócitos e está envolvido em todas as fases do processo de cicatrização, desenvolvendo seu papel principalmente na inflamação, na angiogênese, na reepitelialização e na regeneração do tecido conectivo (Smith e Roukis, 2009; Broughton II et al., 2006a).

Praticamente todas as células sintetizam o TGF- β e todas as células expressam receptores para os TGF- β , o que indica que esse fator de crescimento afeta de alguma forma todos os processos fisiológicos (García-Denche, 2006).

O TGF- β estimula os monócitos para secretar fatores de crescimento, dentre eles o FGF, PDGF, IL-1 e FNT α , além de ser quimiotático para os macrófagos aumentando assim o debridamento dos tecidos lesionados (Smith e Roukis, 2009; Lawrence e Diegelmann, 1994). Esse fator de crescimento estimula também a quimiotaxia e proliferação dos fibroblastos e é um potente estimulador da síntese de colágeno e fibronectina. O TGF- β 1 aumenta a síntese de proteoglicanos através dos fibroblastos e age como um inibidor das proteases catabólicas (Smith e Roukis, 2009; Derynck e Choy, 1998).

Uma das principais características do TGF- β é sua influência sobre a organização da MEC favorecendo a formação de um tecido mais organizado. O TGF- β atua também na remodelação e contração do tecido de cicatricial (Smith e Roukis, 2009; Lawrence e Diegelmann, 1994).

Tem sido descrito na literatura outras funções do TGF- β relacionadas com a superregulação de outros fatores de crescimento, tais como o VEGF, estimulando indiretamente a angiogênese e atuando simultaneamente como um cofator para o IGF e para o PDGF (Riedel et al., 2007).

O TGF- β exerce um papel inibitório sobre as metaloproteinases (1, 3 e 9), através do estímulo da síntese de substâncias inibidoras das metaloproteinases, o que inibe a ruptura do colágeno (Smith e Roukis, 2009; Hui et al., 2000).

O TGF- β é conhecido também por modular a síntese da matriz óssea pelo estímulo da proliferação de células precursoras de osteoblastos e síntese de colágeno ósseo. Adicionalmente o TGF- β induz a apoptose dos osteoclastos e diminui assim a reabsorção óssea e a atividade das metaloproteinases degradadoras da MEC (Smith e Roukis, 2009; Grageda, 2004; Johansson et al., 2000). Os receptores para TGF- β são encontrados em abundância principalmente no osso e na cartilagem. Sua maior ligação com o fator de crescimento ocorre nas fases de proliferação das células da cartilagem e durante a ossificação endocondral (Bourque et al., 1993; Bolander, 1992).

- **Fator de crescimento insulínico (IGF):** Têm sido identificadas duas variedades desse fator de crescimento, o IGF-1 e o IGF-2. O IGF-1 plaquetário é liberado durante a degranulação e pelos fibroblastos após estimulação. Esse fator é conhecido por promover a neovascularização através de seu potente efeito como agente quimiotático para os osteoblastos, para as células do músculo liso vascular e para as células endoteliais (Broughton II et al., 2006b; Smith e Roukis, 2009).

O IGF é produzido mais intensamente durante a vida fetal, embora seja sintetizado durante toda a vida no fígado, coração, pulmões, rins, pâncreas, cartilagem, cérebro e músculo. Associado ao hormônio do crescimento humano estimula o desenvolvimento ósseo e da cartilagem articular (Broughton II et al., 2006a). Tem sido reportado também o efeito mitogênico sobre os fibroblastos, osteócitos e condrócitos (Lynch et al., 1987). Tem um papel essencial na formação óssea e no equilíbrio desse tecido, além de estimular os precursores dos osteoblastos e favorecer a formação da matriz óssea a partir de osteoblastos completamente diferenciados (Niu e Rosen, 2005)

- **Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF):** A maioria dos membros da família do FGF tem um efeito mitogênico e estimula a proliferação de várias células de origem mesodermal, ectodermal e endodermal. Regula a migração e diferenciação das células alvo e em alguns casos têm efeito citoprotector que favorece a sobrevivência das células sob condições de estresse (Wesner e Grose, 2003; Basilico e Moscatelli, 1992).

O FGF exerce múltiplas funções que ajudam na regeneração tecidual, dentre as quais se destacam a estimulação e coordenação da mitogênese de células mesenquimais como os fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células musculares lisas e mioblastos esqueléticos. Induz o bloqueio dos osteoclastos encarregados do catabolismo da matriz óssea, promove a proliferação dos fibroblastos e da secreção de fibronectina através destes e estimula a angiogênese por médio da quimiotaxia das células endoteliais (Rodríguez et al., 2012).

- **Fator de crescimento epidérmico (EGF):** A família do EGF compreende alguns membros como o TGF- α , EGF de ligação a heparina, dentre outros. Todos esses fatores de crescimento exercem sua função através de quatro receptores de alta afinidade que depois da ligação ao fator formam homo ou heterodímeros. A sobre-expressão desses receptores é encontrada com frequência no câncer humano e é comum ter um papel causal na tumorigênese (Werner e Grose, 2003).

As plaquetas liberam o EGF depois de sua ativação e degranulação. As células epiteliais são as que apresentam maior afinidade e maior quantidade de receptores na sua superfície, embora os fibroblastos e as células do músculo liso também possuam uma quantidade significativa de receptores para o EGF. Esse fator de crescimento tem um potente efeito quimiotático e mitogênico para as células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos estimulando assim a angiogênese e a atividade do colágeno (Broughton II et al., 2006a).

O EGF tem efeitos mitogênico e quimiotático nas células epiteliais, induz a migração celular, estimula a expressão de receptores para EGF através dos fibroblastos, pró-osteoblastos e pró-condrócitos (Flores et al., 2012), estimula a mitose dessas células (Bennett e Schultz, 1993) e a síntese da MEC (Kang e Kang, 1999).

- **Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF):** A família do VEGF está composta por seis fatores de crescimento diferentes (A, B, C, D, E e o fator de crescimento da placenta) que exercem sua função biológica pela união a três receptores transmembranais diferentes (Werner e Grose, 2003; Gale e Yancopoulos, 1999).

O VEGF é secretado principalmente pelas plaquetas, células mesenquimais e células do estroma e age sobre as células endoteliais, sobre os monócitos e macrófagos, neurônios, células epiteliais renais e células tumorais. Essa família de fatores de crescimento tem como funções principais a quimiotaxia e proliferação de células endoteliais, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e indução da formação de novos vasos sanguíneos locais (Schwartz et al., 2011). Essa função lhe permite aumentar o aporte de células inflamatórias e reparadoras para facilitar o processo de cicatrização (Carmona e Lopez., 2011).

As duas principais formas do VEGF têm como função estimular a proliferação e o movimento células endoteliais para o tecido afetado contribuindo assim com a

angiogênese e a linfangiogênese nesse tecido. Esses fatores de crescimento podem também estimular a síntese de colágeno, a contração da ferida, a epitelialização e a síntese de fibronectina e proteoglicanos (Smith e Roukis, 2009; Broughton II et al., 2006b; Lawrence e Diegelmann, 1994).

2.5. As plaquetas e seu papel na cicatrização

As plaquetas têm um papel fundamental no processo de cicatrização principalmente através da estimulação e liberação de grandes quantidades de fatores de crescimento. Uma vez que estes são liberados dos grânulos α , unem-se aos receptores transmembrana das células alvo tais como as células tronco mesenquimais, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células epidérmicas. Os fatores derivados das plaquetas influenciam diretamente no crescimento, morfogênese e diferenciação celular (Smith e Roukis, 2009).

Essas células atuam na modulação da hemostase, na reparação de feridas e no início da cicatrização tecidual, uma vez que elas contêm fatores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios que agem produzindo quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização, angiogênese e deposição de MEC, além de modular a resposta imune (Zhu et al., 2013; Silva et al., 2012b; Carrasco et al., 2009; Carmona, 2006; Sanchez et al., 2003).

As plaquetas possuem uma ampla variedade de fatores bioativos com diferentes funções, como por exemplo, a fibrina, que atua como um arcabouço provisional para a migração e diferenciação das células tronco e funciona como um adesivo biológico. As plaquetas armazenam proteínas com efeito antibacteriano e antifúngico, fatores de coagulação, e glicoproteínas de membrana que interferem na inflamação, aumentando a síntese de interleucinas e quimiocinas (Zhu et al., 2013).

Após a ativação as plaquetas liberam adenosin difosfato, que é também liberado pelas células vasculares lesionadas e pelas células sanguíneas. Essa substância é uma potente agonista da agregação e a ativação plaquetária (Blair e Flaumenhaft, 2009).

2.6. Concentrado Autólogo de Plaquetas

O Concentrado Autólogo de plaquetas (CAP) é um produto autólogo usado para recuperar os tecidos lesionados (Anitua et al., 2012; Carmona et al., 2011). Ele favorece o processo de cicatrização de feridas e de lesões em diferentes tecidos como o cutâneo, musculoesquelético, intestinal, dentre outros (Boswell et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012; Sanchez et al., 2009) ao proporcionar uma MEC com capacidade para permitir um desempenho mecânico e funcional similar aos tecidos sadios (Wasterlain et al., 2012).

O princípio básico da ação do CAP é mimetizar as vias naturais da cicatrização organizando os elementos que a influenciam e levando ao lugar lesionado um conjunto de moléculas que propiciarão a recuperação funcional dos tecidos (Anitua et al., 2012; Werner e Grose, 2003),

O CAP tem sido classicamente descrito como um volume de plasma que tem uma contagem de plaquetas superior aos níveis basais. Essa definição sugere uma mistura de plasma e plaquetas com os fatores de crescimento e citocinas. O plasma é conhecido como a fração acelular líquida do sangue que contém proteínas para a coagulação e outras moléculas bioativas que têm um papel fundamental na reparação de feridas (Zhu et al., 2013).

O CAP é uma fração de plasma obtida de sangue autólogo que possui uma concentração de plaquetas três a cinco vezes superiores aos níveis basais do sangue total e é considerada uma fonte natural de fatores de crescimento (Kon et al., 2012; Flores et al., 2012; Carrasco et al., 2009; Lagunas, 2006).

Esse tipo de tratamento biológico mimetiza as vias naturais da cicatrização de feridas favorecendo o processo. Isso é obtido pelo aporte ao local lesionado do complexo de proteínas do CAP que estão envolvidos na reparação tecidual. Desta forma todas as proteínas necessárias para a reparação do tecido são liberadas localmente (Anitua et al., 2012; Werner e Grose, 2003).

O mecanismo de ação do CAP está fundamentado na quantidade de plaquetas concentradas que são aplicadas diretamente sobre os tecidos lesionados (Wasterlain et al., 2012; Silva, 2012; Yamaguchi et al., 2012) e na modulação dos processos de cicatrização através dos fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias, presentes nos grânulos α das plaquetas, que após sua liberação, iniciam e mantêm o processo de regeneração tecidual (Textor, 2011; Mishra et al., 2009).

Os fatores de crescimento, mediadores pró-inflamatórios, fibrina e outras substâncias são capazes de influenciar o meio onde são aplicadas para produzirem mitose celular, recrutamento de outras células, proliferação e diferenciação celular, síntese de proteínas da MEC como colágeno e substâncias que promovem a angiogênese e a vascularização (Anitua et al., 2012; Lee et al., 2012; Iacopetti et al., 2012; Silva et al., 2012a; Mishra et al., 2009).

A ampla variedade de fatores de crescimento secretados pelos grânulos α das plaquetas contribui para as múltiplas funções do CAP que incluem o melhoramento do anabolismo, remodelação óssea e vascular, proliferação celular, angiogênese, coagulação e diferenciação celular (Zhu et al., 2013). Essas substâncias agem sinergicamente com as células locais induzindo respostas específicas como a estimulação da proliferação e migração celular, síntese de proteínas da MEC incluindo colágeno, alterando inclusive, o fenótipo e disposição das células.

Para que essas substâncias possam ter efeito terapêutico devem ser concentradas em níveis adequados para proporcionar os fatores de crescimento e outras substâncias numa quantidade adequada para estimular a neovascularização, o incremento sanguíneo e de nutrientes necessários para a regeneração do tecido lesionado (Tiwari e Bhargava, 2013; Xie et al., 2013b; Boswell et al., 2012; Gobbi e Vitale, 2012). A concentração celular pode aumentar ou diminuir segundo o método empregado na obtenção do CAP.

Além da concentração das plaquetas é necessária a ativação das mesmas para que seja liberado o conteúdo dos grânulos e, dependendo da substância que seja empregada pode-se obter um gel ou um líquido de consistência viscosa que permite a ativação das plaquetas mediante diferentes vias.

Os diferentes métodos empregados para ativar as plaquetas, provavelmente afetam a concentração dos fatores de crescimento. São empregadas diferentes substâncias como o cloreto de cálcio, trombina, quitosan e batroxobina (Zhu et al., 2013). Cada substância tem seu mecanismo de ação.

- **Batroxobina:** induz a ativação das plaquetas pela formação e polimerização da fibrina a partir do fibrinogênio e da interação da fibrina com sais de cálcio. A ativação e liberação dos grânulos é lenta (Silva, 2012; Silva et al., 2012b; Mazzuco et al., 2008).
- **Trombina:** Media a agregação plaquetária, a liberação do ADP, tromboxano A2, serotonina, e epinefrina, além da produção de fibrina a partir do fibrinogênio (Silva et al., 2012a; Jennings, 2009).
- **Gluconato de cálcio:** O cálcio é um importante segundo mensageiro na cascata de ativação das plaquetas, pois media as respostas características da ativação plaquetária como mudanças na forma da plaqueta, secreção dos grânulos e agregação. Ativar as plaquetas com gluconato de cálcio leva a um aumento dos níveis do cálcio no citoplasma e conseqüentemente a um aumento da resposta das funções das plaquetas que são diretamente dependentes deste. Essas respostas são ativação da integrina, liberação de uma segunda onda de mediadores, ADP e tromboxano A2 e a expressão da atividade procoagulante das plaquetas, principalmente pela geração de trombina (Silva et al., 2012a; Silva et al., 2012b).

Após a adição dos diferentes produtos para a ativação das plaquetas, o CAP ativado deve ser imediatamente aplicado no local lesionado para evitar que a degranulação e os fatores de crescimento liberados sejam depositados fora da área de interesse (Mazzuco et al., 2008).

É importante considerar que diferentes fatores podem influenciar a qualidade do CAP e a quantidade de plaquetas concentradas. Dentre esses fatores tem-se: a fração colhida após a centrifugação, a força de centrifugação, o tempo de centrifugação, a substância empregada para ativar as plaquetas e o conteúdo de leucócitos (Tiwari e Bhargava, 2013; Ehrenfest et al., 2008).

2.7. Obtenção do CAP

O CAP é preparado a partir do sangue periférico e centrifugação do mesmo para obter uma amostra concentrada de plaquetas. As plaquetas são submetidas à degranulação, usando uma substância ativadora, para causar posterior liberação dos fatores de crescimento que possuem propriedades reparadoras. O plasma contém citocinas, trombina e outros fatores de crescimento, com propriedades biológicas e adesivas inerentes (Zhu et al., 2013).

O CAP, fonte natural de fatores de crescimento e substâncias pró-inflamatórias pode ser obtido mediante diferentes métodos (Argüelles et al., 2006). Na medicina veterinária são descritos três métodos empregados com sucesso para este fim, que são o método manual ou método do tubo com única centrifugação (Silva, 2012; Silva et al., 2011b), o método manual com dupla centrifugação (Xie et al., 2013a; Virchenko e Aspenberg, 2006) e o método semi-automatizado (Textor, 2011; Ehrenfest et al., 2008). A concentração de plaquetas depende do tempo e da força da centrifugação empregada e da quantidade de sangue total para a produção do CAP (Baksh et al., 2013; Jo et al., 2012).

2.7.1. Método do tubo com centrifugação única

Neste método é coletada em tubos com solução ACD-A, uma quantidade determinada de sangue total que varia de acordo com a espécie. Esta solução contém citrato de trisódio (22 g/L), ácido cítrico (8 g/L) e dextrose (24,5 g/L) (Silva, 2012; Argüelles et al., 2006) e age como anticoagulante. Posteriormente, as mostras são centrifugadas a velocidades que variam de 85 a 1220 g (Silva et al., 2011a; Silva et al., 2011b; Argüelles et al., 2006; Virchenko e Aspenberg, 2006) durante 5 a 20 minutos. Com este método, são obtidas duas frações diferentes de concentrados de plaquetas, sendo que a primeira corresponde aos 50% imediatamente acima da capa leucocitária (CAP) e a segunda aos 50% localizados acima da primeira fração que é denominada plasma pobre em plaquetas (PPP).

Posteriormente com auxílio de uma micropipeta de volume fixo, ambas as frações são separadas e depositadas em tubos de polipropileno para avaliação mediante impedância volumétrica do hematócrito, plaquetas, leucócitos, valores relativos e absolutos de linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos (Silva et al., 2011a; Argüelles et al., 2006).

Esta mesma avaliação é feita também em amostras de sangue total para se obter os valores de referência para posterior comparação dos valores do CAP (Jo et al., 2012; Virchenko e Aspenberg, 2006).

2.7.2. Método do tubo com centrifugação dupla

Este método segue os princípios básicos do método do tubo com centrifugação única, mas após a primeira centrifugação, a fração correspondente aos primeiros 50% imediatamente acima da capa leucocitária é coletada em tubos de polipropileno e é novamente centrifugada a velocidades que variam de 240 a 3600 g durante períodos de tempo que variam de 5 a 20 minutos (Xie et al., 2013a; Lee et al., 2012; Argüelles et al., 2006; Virchenko e Aspenberg, 2006). Após a centrifugação o produto obtido pode ser dividido em duas frações (A e B), onde a primeira corresponde a 25% da fração mais baixa no tubo e a segunda aos 75% da fração restante. Posteriormente as plaquetas obtidas após a segunda centrifugação são resuspendidas em plasma, ficando o produto disponível para seu uso (Argüelles et al., 2006).

2.7.3. Método semi-automatizado

Este método é caracterizado pelo emprego de aparelhos de alta tecnologia para concentrar as plaquetas mediante o processo de centrifugação. Durante este procedimento pretende-se separar o plasma pobre em plaquetas e a fração sanguínea do CAP (Hakimi et al., 2010; Froum et al., 2002).

Para obter o CAP com este método é colhida uma determinada quantidade de sangue total que varia de acordo com a espécie (entre 5 a 50 ml), que posteriormente é depositada em tubos de CAP para ser centrifugada a uma velocidade que varia de 3200 a 5600g durante 15 a 20 minutos. Após este procedimento o sangue é separado em PPP e CAP e o PPP é descartado. O CAP é submetido à análise celular para avaliar seu conteúdo e realiza-se a contagem celular no sangue total (5-10 ml) para comparar com o CAP e avaliar se houve ou não ativação das plaquetas, a qualidade e, portanto, a eficiência do método (Vagdatli et al., 2010; Tiwari e Bhargava, 2013).

Independente do método empregado para se obter o CAP, é importante avaliar se este foi eficiente para concentrar as plaquetas. Deve ser considerada também a força empregada na centrifugação e a duração do processo, pois a quantidade de plaquetas concentradas e a viabilidade das mesmas são altamente dependentes desses pontos críticos (Ehrenfest et al., 2008; Weibrich et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do concentrado autólogo de plaquetas sobre a OA induzida em coelhos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os animais, através do exame clínico e ortopédico antes e depois de induzir a lesão articular e após o tratamento.
- Determinar as alterações articulares por meio de avaliações artroscópica, goniométrica, radiográfica e ultrassonográfica da articulação FTP após a indução da lesão e durante o tratamento.
- Avaliar as características celulares e macroscópicas do líquido sinovial antes e após a ruptura do ligamento e durante o tratamento.
- Determinar a concentração do PDGF e do TGF- β 1 no plasma antes da ruptura do LCCr e após as injeções intra-articulares de CAP ou Ringer Lactato.
- Avaliar a progressão do processo degenerativo utilizando a concentração plasmática do PDGF e do TGF- β 1 como um marcador biológico da evolução da OA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o nº 63/2014.

Foram usados 14 coelhos da raça Nova Zelândia, adultos jovens, machos com massa corporal média de 3,0 kg fornecidos pela fazenda experimental Prof. Hélio Barbosa da UFMG. O critério de inclusão dos animais na pesquisa foi seu estado geral saudável e ausência de alterações no sistema locomotor (ossos, articulações, músculos, tendões) confirmados mediante avaliação física, hemograma e bioquímica sanguínea, exame ortopédico e radiográfico nas incidências craniocaudal e médio lateral. Os animais foram mantidos no laboratório de metabolismo animal do departamento de Zootecnia em gaiolas individuais de tamanho 60 cm x 60 cm x 37 cm com acesso à água *ad libitum* e alimentação duas vezes por dia de acordo as necessidades nutricionais específicas.

Os coelhos foram divididos em dois grupos de sete animais de acordo com o tratamento. Os animais do grupo I constituíram o controle e receberam 0,5 ml intra-articular de solução Ringer Lactato e os animais do grupo II constituíram o tratamento e receberam 0,5 ml intra-articular de CAP numa concentração de 1,5 a 2,5 vezes os níveis basais.

No pré-operatório, os coelhos receberam pela via intravenosa, 30 mg/Kg de cefalotina sódica¹ como terapia antibiótica profilática. Após a artroscopia, foi feita analgesia pós-operatória empregando-se tramadol² na dose de 1 mg/kg por via SC a cada 12 horas, durante três dias e terapia anti-inflamatória com meloxicam³ na dose de 0,2 mg/kg por via IM a cada 24 horas durante três dias.

Os animais foram submetidos à avaliação ortopédica, goniométrica, ultrassonográfica, radiográfica, artroscópica e coleta de líquido sinovial e de sangue antes da ruptura do LCCr (M1), aos 21 dias (M2) e aos 15 dias após a substituição do ligamento (M3). Os animais foram mantidos durante três semanas nas respectivas gaiolas individuais sob supervisão diária, sem imobilização do membro operado.

Decorridos 21 dias, os animais foram encaminhados para novo exame artroscópico e concomitante estabilização cirúrgica com auto-enxerto de fásia lata e aplicação de CAP ou solução de Ringer Lactato⁴. Em seguida ambas as articulações FTP foram radiografadas nas posições ventrodorsal e mediolateral e o membro posterior direito foi submetido à avaliação ultrassonográfica.

1 Cefalotina sodica (ceflen®) Aspen, Pharma

2 Cloridrato de tramadol (Tramadol®) Teuto, Cristalpharma

3 Meloxicam (maxicam 0,2%®) Ourofino, Brazil

4 Ringer lactato® Sanobiol, Brazil

4.1.1. Momento 1 (M1)

Neste tempo, todos os animais foram submetidos a avaliações clínica e ortopédica, goniométrica, ultrassonográfica e radiográfica. A radiografia de ambas as articulações FTP foi realizada nas posições ventrodorsal e mediolateral. Foram coletados, antes da artroscopia, dois ml de sangue em tubos com EDTA⁵ para hemograma e obtenção de plasma no qual foi determinada a concentração dos fatores de crescimento PDGF e TGF β 1. Em seguida os animais foram submetidos à avaliação artroscópica⁶ da articulação FTP direita, seguida da transecção do LCCr.

4.1.2. Momento 2 (M2)

Após três semanas todos os animais foram submetidos a avaliações clínica e ortopédica, goniométrica, ultrassonográfica e radiográfica e encaminhados para avaliação artroscópica seguida da estabilização articular, empregando-se auto-enxerto de fâscia lata segundo Schawalder e Gitterle (1989). Foram coletados, antes da artroscopia, dois ml de sangue em tubos com EDTA para hemograma e obtenção de plasma, no qual foi determinada a concentração dos fatores de crescimento PDGF e TGF β 1. Nos animais que receberam o CAP foram coletados adicionalmente sete ml de sangue total para o CAP, que foi injetado imediatamente após a cirurgia.

Os animais receberam os tratamentos de acordo com o grupo ao qual foram alocados. Os animais do grupo I receberam 0,5 ml intra-articular de solução de Ringer Lactato e os animais do grupo II receberam 0,5 ml intra-articular de CAP.

4.1.3. Momento 3 (M3)

Duas semanas após, todos os animais foram submetidos a avaliações clínica e ortopédica, goniométrica, ultrassonográfica e radiográfica e encaminhados para avaliação artroscópica. Antes da artroscopia procedeu-se à coleta de sangue para os exames já mencionados e com as respectivas injeções intra-articulares de CAP e de Ringer Lactato.

4.2. Anestesia

Todos os procedimentos realizados como a medicação pré-anestésica (MPA), indução e a manutenção da anestesia seguiram protocolos desenvolvidos pela equipe de anestesiologia do hospital veterinário da Escola de Veterinária da UFMG.

A MPA foi feita com midazolam⁷ e morfina⁸ na dose de 1 mg/kg pela via intramuscular. Para a

⁵ Tubo para hemograma com EDTA®, Sarstedt, Alemanha

⁶ Equipamento de artroscopia, Karl Storz, Alemanha

⁷ Midazolam (dormire®) Cristália, Brazil

⁸ Morfina (dimorf®) Cristália, Brazil

indução da anestesia foi administrado 15 mg/kg de cetamina⁹, seguido de bloqueio anestésico dos nervos ciático e femoral do membro a ser operado com lidocaína¹⁰ sem vasoconstritor na dose de 5 mg/kg. A manutenção anestésica foi feita com isoflurano¹¹. Durante todo o período anestésico, foram monitorados os aspectos fisiológicos tais como frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial e gasometria. Fluidoterapia de apoio foi realizada com solução Ringer Lactato.

4.3. Procedimentos artroscópicos.

4.3.1. Ruptura do LCCr (M1)

Foi feita uma punção no recesso supra-patelar com uma agulha hipodérmica 25x7 para coleta do líquido sinovial com seringa hipodérmica de 3 ml¹² heparinizada, seguida da dilatação da articulação com infusão de 3 ml de Ringer Lactato. Em seguida foram feitas duas incisões na pele de aproximadamente 3 mm com uma agulha hipodérmica 40x12, lateral e medial ao ligamento patelar, que foram empregadas como portais de acesso para o artroscópio e para os instrumentos. Seguiram-se três pontos de reparo com nylon¹³ 3-0 adjacente aos portais medial e lateral e na inserção do ligamento patelar envolvendo parcialmente o coxim adiposo infra-patelar, para evitar o deslizamento da pele, a perda dos portais artroscópicos e para tracionar ligeiramente o coxim adiposo para permitir melhor visão dos ligamentos cruzados e da fosa intercondilar.

Utilizou-se uma lâmina de bisturi número 11 para perfurar a cápsula articular, seguindo-se a introdução da camisa artroscópica de 2,2 mm guiada por trocarte rombo. O sistema de irrigação foi conectado à bainha artroscópica e o trocarte foi substituído pelo artroscópio de 1,9 mm acoplado à câmera. Com o artroscópio posicionado na articulação foi feita a inspeção artroscópica sistemática das estruturas intra-articulares começando pelo recesso suprapatelar, compartimento medial, compartimento lateral, fossa inter-condilar, ligamentos cruzados cranial e caudal e os meniscos.

Depois da avaliação articular e sob visualização artroscópica procedeu-se à ruptura do LCCr utilizando uma pinça artroscópica de jacaré associada ou não a uma agulha hipodérmica 40x12.

4.3.2. Reparação do LCCr (M2)

A substituição do ligamento foi realizada conforme o descrito por Schawalder e Gitterle (1989) após avaliação artroscópica da articulação conforme os procedimentos descritos anteriormente. Foi feita uma incisão na pele iniciando no terço proximal do fêmur e estendendo-se até a fabela

⁹ Cetamina (cetamin®) Syntec, Brazil

¹⁰ Lidocaína 2% sem vasoconstritor (xylestesin®) Cristália, Brazil

¹¹ Isoflurano (isoforine®) Cristália, Brazil

¹² Seringas® de 1, 3, 5 e 10 ml, BD plastic, USA

¹³ Nylon cirúrgico® 3-0, Ethicon, Brazil

lateral. Posteriormente foi feita a divulsão do tecido subcutâneo até expor a fásia lata. Foi feita uma pequena incisão com lâmina de bisturi no. 11 sobre a fásia lata e com auxílio de tesoura Metzenbaum foi colhido um enxerto de fásia lata em toda sua extensão, com largura de cerca de um cm. O enxerto foi liberado no extremo proximal e manteve-se pediculado adjacente à fabela lateral. Posteriormente com auxílio de uma furadeira pneumática e um pino de 2,5 mm de diâmetro foi feito um túnel tibial, posicionando o pino (sob visão artroscópica) no ponto de inserção do LCCr na tibia e emergindo na face medial proximal da tibia a cerca de um cm da superfície articular. Com uma pinça de Deschamps o enxerto de fásia lata foi tracionado através da fossa intercondilar e exteriorizado no portal medial. Um fio de aço de 0,8 mm foi introduzido no túnel tibial e exteriorizado no portal medial onde o enxerto foi introduzido na alça do fio de aço e tracionado através do túnel tibial. O enxerto foi suturado na sua extremidade livre sobre a tuberosidade da tibia empregando-se fio cirúrgico absorvível caprofyl¹⁴ 2-0 em padrão simples separado. O tecido subcutâneo e a pele foram fechados de forma rotineira com caprofyl 4-0 em padrão contínuo e nylon 4-0 em padrão simples separado, respectivamente.

4.4. Obtenção das amostras de sangue e do CAP

Neste experimento foi empregado o método do tubo com centrifugação única, segundo o relatado por Silva (2012) modificando o tempo de centrifugação, que foi de 7 minutos para se obter uma maior concentração de plaquetas. Foi considerado como CAP a fração de plasma com concentração de plaquetas entre 1,5 e 2,5 vezes os níveis basais do sangue total.

Utilizando seringa de 10 ml foram coletados da veia jugular dos coelhos do grupo II, 7 ml de sangue que foram depositados em tubos de 8,5 ml, contendo solução de ACD-A como anticoagulante (citrato de trisódio; 22 g/L, ácido cítrico; 8g/L e dextrose; 24,5 g/L)¹⁵. As mostras foram processadas imediatamente no laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário da UFMG utilizando uma centrífuga clínica (CENTROBIO-80 2B, CHINA)¹⁶. Adicionalmente, foram coletados 2 ml de sangue em tubos com EDTA para hemograma completo e avaliação dos níveis basais de plaquetas. O sangue nos tubos ACD-A foi centrifugado a 191 g durante 7 minutos. Posteriormente, com auxílio de um cateter¹⁷ calibre 22 e uma seringa de 3 ml foram coletados aproximadamente os primeiros 100 µL da fração vermelha abaixo da interface sangue-plasma e os primeiros 900 µL de plasma acima da mesma interface. As amostras de sangue total e os preparados autólogos foram analisados mediante hemograma automatizado por impedância volumétrica¹⁸. Cada amostra foi analisada três vezes e a média foi tomada como medida amostral para as análises estatísticas.

Os parâmetros analisados nos preparados plaquetários e no sangue total foram:

¹⁴ Caprofyl® absorvível 2-0 e 3-0, Ethicon, Brazil

¹⁵ Tubos de ACD-A como anticoagulante®, BD vacutainer, USA

¹⁶ Centrífuga clínica (centrobio-80 2B®), China

¹⁷ Catéter intravenoso® calibre 22 e 24 G, BD insyte, USA

¹⁸ Aparelho de hemograma (abacus junior vet 5®), China

Hematócrito
 Contagem de plaquetas
 Leucócitos
 Valores relativos e absolutos de linfócitos, monócitos, granulócitos.
 Volume plaquetário médio

Imediatamente antes da aplicação do CAP o mesmo foi ativado com gluconato de cálcio¹⁹ a 10% na proporção de 0,1 ml de gluconato de cálcio por cada ml de CAP, segundo o recomendado.

4.5. Avaliação ortopédica

Foram realizadas as avaliações ortopédicas em ambos os grupos considerando parâmetros como apoio do membro e abdução, crepitação, sensibilidade dolorosa à palpação e presença ou não de efusão articular com base na tabela proposta por Muzzi et al., (2009).

Para avaliar o apoio, o coelho foi posicionado na mesa e no chão, permitindo a deambulação. A abdução do membro foi considerada em relação ao eixo do corpo. A avaliação do suporte do peso no membro foi considerada com base na posição anatômica e o apoio dos dígitos.

Tabela 1. Sistema de classificação do apoio e abdução do membro, da crepitação, da efusão articular e da sensibilidade dolorosa de coelhos portadores de OA experimental, tratados com CAP ou solução de Ringer Lactato intra-articular.

Apoio do membro e abdução em relação ao eixo do corpo	
Pontuação	Descrição
1	Apoio normal do membro em estação. Membro alinhado com o eixo do corpo.
2	Alívio discreto do suporte de peso no membro, com apoio total dos dígitos. Membro alinhado com o eixo do corpo.
3	Alívio moderado do suporte de peso no membro, com apoio total dos dígitos. Abdução discreta (cerca de 10-15°) do membro em relação ao eixo do corpo.
4	Acentuada transferência do suporte de peso do membro, com apoio dos dígitos. Abdução moderada (cerca de 15-30°) do membro em relação ao eixo do corpo.
5	Apoio com a ponta dos dígitos ou elevação do membro em estação. Abdução acentuada (>30°) do membro.
Presença de crepitação	
Pontuação	Descrição
1	Ausente.
2	Crepitação discreta: presença de crepitação discreta nos extremos de flexão e extensão da articulação femoro-tíbio-patelar.
3	Crepitação moderada: presença de crepitação intermitente ao flexionar/extender a articulação femoro-tíbio-patelar.

¹⁹ Gluconato de cálcio 10%®, Isofarma, Brazil

- 4 Crepitação acentuada: presença de crepitação intensa e constante em toda a amplitude de movimentos da articulação femoro-tíbio-patelar.

Presença de sensibilidade dolorosa	
Pontuação	Descrição
1	Sem sinais de dor.
2	Dor discreta: ato de virar a cabeça para reconhecimento.
3	Dor moderada: ato de puxar o membro ao flexionar/extender a articulação femoro-tíbio-patelar.
4	Dor acentuada: ato de vocalizar e tentar fugir, não permitindo a movimentação da articulação femoro-tíbio-patelar.

Efusão articular	
Pontuação	Descrição
0	Ausência de aumento de volume da articulação femoro-tíbio-patelar.
1	Presença de aumento de volume da articulação femoro-tíbio-patelar e líquido sinovial <0,5 ml.
2	Presença de aumento de volume da articulação femoro-tíbio-patelar e líquido sinovial >0,5 ml.

Fonte: Adaptada de Muzzi et al., (2009).

Para a avaliação da crepitação, os coelhos foram dispostos em decúbito lateral sobre uma mesa e procedeu-se a flexão e a extensão de ambos os membros. Uma mão foi disposta sobre a articulação FTP e com a outra sobre a região do metatarso foram realizados os movimentos de flexão e extensão. Observou-se a presença ou não, e o grau de crepitação durante a amplitude do movimento articular.

Na avaliação da sensibilidade dolorosa os coelhos foram posicionados em decúbito lateral sobre uma mesa e foi realizada pressão suave sobre a patela, sobre o ligamento patelar e nos espaços articulares parapatelar medial e lateral, observando a reação do coelho durante a flexão e extensão para atribuir uma pontuação com relação aos achados. Como efusão foi considerada o aumento de volume flutuante da articulação FTP e o afastamento da patela do sulco troclear observado na radiografia.

4.6. Avaliação goniométrica

Para a determinação dos ângulos foi empregado um goniômetro universal convencional²⁰. O centro do goniômetro foi posicionado no centro da articulação FTP, o braço proximal foi posicionado sobre o fêmur com o centro no trocânter maior e o braço distal foi posicionado sobre a tíbia com o centro sobre a articulação tarsocrural.

Foram feitas as medidas dos ângulos de flexão e de extensão, em decúbito lateral de ambos os membros posteriores nos três momentos do experimento. As avaliações foram feitas antes dos procedimentos cirúrgicos e da artroscopia.

²⁰ Goniômetro convencional®, Medlife, Brazil

Foram realizadas três medidas de cada ângulo para se obter a média a ser utilizada para as análises estatísticas.

4.7. Análise radiográfica

Foram realizadas avaliações radiográficas (VMI COMPACTO 500, BRAZIL)²¹ em ambos os grupos e em ambas as articulações FTP nas posições craniocaudal e médiolateral antes da ruptura (M1), após a estabilização articular (M2) e aos 15 dias (M3).

Nesta análise foram considerados parâmetros como presença de osteófitos intra e peri-articulares (ausente: 0; discreto: 1; moderado: 2 e acentuado: 3), efusão articular (ausente: 0 e presente: 1), esclerose do osso subcondral tibial (ausente: 0 e presente: 1). Estes dados foram usados para determinar a intensidade do processo degenerativo, que foi classificada como ausente: 0; discreta: 1; moderada: 2 e acentuada: 3. Cada parâmetro foi avaliado segundo o descrito por Innes et al (2004).

As radiografias foram avaliadas por três avaliadores diferentes e a classificação do grau da osteoartrose foi feita segundo os sinais radiográficos presentes.

4.8. Avaliação ultrassonográfica

Imediatamente após os procedimentos artroscópicos e radiográficos nos momentos M1, M2 e M3 os coelhos foram encaminhados para avaliação ultrassonográfica da articulação (Mindray M5 com prove linear de 7,5 mHz)²².

Nessa avaliação foram feitos diferentes cortes da articulação visando observar a superfície articular da tibia, do fêmur, da patela, o ligamento patelar e o espaço articular. Considerou-se a regularidade da superfície óssea para se fazer uma correlação com os achados radiográficos e artroscópicos.

Foi avaliada a espessura do ligamento patelar, o osso subcondral e o espaço correspondente à cartilagem e ao líquido sinovial. Esses dados foram comparados entre os tempos experimentais. Os achados foram classificados em ausência de alterações (score 0), alterações discretas (score 1), irregularidades moderadas (score 2) e irregularidades acentuadas (score 3).

4.9. Coleta e análise do líquido sinovial

Para a coleta do líquido sinovial foi realizada uma punção no recesso supra-patelar utilizando uma agulha 25x7 à qual foi posteriormente acoplada uma seringa de 3 ml. A coleta foi feita em todos os momentos experimentais, antes da ruptura do ligamento (M1), 21 dias após, (M2) e aos 15 dias (M3) e foram avaliados o conteúdo celular total e diferencial e as características

²¹ Aparelho radiográfico (VMI compacto 500®), Brazil

²² Aparelho de ultrassonografia (mindray M5 prove linear 7,5 mHz®), Brazil

macroscópicas do mesmo.

Para a contagem celular do líquido sinovial foi empregada uma câmara de Neubauer e procedeu-se à preparação das amostras conforme descrito a seguir:

Foram preparadas diluições com o líquido sinovial de acordo com a seu aspecto e sua cor. As diluições utilizadas foram 1:10 onde se preparou uma solução com 270µl de solução salina e 30µl de líquido sinovial para as amostras com aspecto límpido ou ligeiramente turvo e coloração transparente ou palha e uma solução com 380µl de solução salina e 20µl de líquido sinovial para amostras de líquido sinovial com aspecto turvo e coloração ligeiramente avermelhada ou vermelha.

Depois de preparada a diluição e com ajuda de uma pipeta volumétrica foram coletados 30µl da solução e dispostos na câmara de Neubauer onde foram observadas e contadas as células com ajuda de um microscópio ótico. Foram considerados o número total de hemácias e o número total de células nucleadas.

Posterior à contagem celular no microscópio, o líquido sinovial foi centrifugado utilizando uma centrífuga clínica (CENTROBIO-80 2B, CHINA) a uma força de 302 g durante cinco minutos. Depois da centrifugação e com auxílio de um tubo capilar foram coletados aproximadamente 10µl de líquido sinovial e depositados numa lâmina para microscopia. Com auxílio de outra lâmina foi feito um esfregaço e a lâmina foi corada para posterior análise e contagem citológica diferencial ao microscópio ótico.

4.10. Coleta do sangue e armazenamento das amostras de plasma

A determinação das concentrações plasmáticas dos fatores de crescimento, Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Fator de Crescimento Transformador β 1 (TGF- β 1) foram determinados no plasma de coelhos através do Ensaio Imuno-enzimático (ELISA) utilizando-se kits comerciais específicos para esta espécie (MyBioSource.com LTDA).

Foi fixado um cateter calibre 24 na artéria auricular dos coelhos, protegido com um PRN²³. Posteriormente com uma seringa de 10 ml acoplada a uma agulha 25x7 foram coletados 10 ml de sangue, dos quais, dois ml foram depositados em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético. 1,5%. 2mg/ml de sangue) para se obter o plasma e os 8 ml restantes foram acondicionados em eppendorfes estéreis em alíquotas iguais de um ml e armazenados para posteriores análises. O plasma obtido foi utilizado para fazer a dosagem de TGF- β 1 e PDGF. Após a coleta todas as amostras foram mantidas sob refrigeração (2-8°C) até o momento do processamento, conforme o descrito a seguir:

²³ BD PRN adapter®, Brazil

4.10.1. Amostras de plasma para determinação do PDGF

A alíquota de 2 ml de sangue foi submetida à centrifugação (centrífuga minispin)²⁴ durante 30 minutos a uma rotação de 3000 rpm, para obtenção do plasma. O sobrenadante dos tubos foi coletado, acondicionado em eppendorf estéril e armazenado sob refrigeração a 2-8°C para posterior dosagem do PDGF.

4.10.2. Amostras de plasma para determinação do TGF-β1

Para obtenção do plasma procedeu-se à centrifugação das amostras de sangue durante 20 minutos a uma rotação de 3000 rpm. Coletou-se o sobrenadante e acondicionou-o em eppendorf estéril. O plasma foi congelado e estocado a -20°C até o dia das análises correspondentes.

4.11. Quantificação dos fatores de crescimento TGF-β1 e PDGF

A determinação das concentrações de TGF-β1 e PDGF foram realizadas através de ensaios imuno-enzimáticos de ELISA, utilizando-se Kits comerciais da MyBioSource.com LTDA específicos para coelhos e de referência MBS 2512747 (PDGF)²⁵ MBS 2508871 (TGF-β1)²⁶, respectivamente. Esses kits apresentam um poder de detecção que varia de 31,25 até 2000 pg/ml. O ELISA foi realizado em duplicata.

4.11.1. Elisa para determinação de PDGF

As amostras de plasma foram acondicionadas à temperatura ambiente e adicionadas em duplicata à placa de ELISA (96 poços). As amostras foram previamente diluídas cinco vezes em diluente do kit comercial. Para a diluição colocou-se 40 µl de solução diluente em cada well e 10 µl de amostra de plasma. Paralelamente, solução padrão de PDGF foram adicionadas à placa na concentração de 300, 150, 75, 37.5 e 18.8 ng/ml. Após a colocação da amostra e curva padrão, 50 µL da solução anticorpo Anti-PDGF e de estreptavidina- ligada à peroxidase (estreptavidina – HRP) foram adicionados à placa, exceto nos poços das amostras “branco”. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 60 minutos. Depois de completado o tempo de incubação as placas foram devidamente lavadas com solução de lavagem. Este procedimento foi repetido cinco vezes. A seguir adicionou-se aos wells da placa, 50 µL da Solução de cromógeno A (primeiramente) e 50 µl da Solução de cromógeno B. Após a adição dos reagentes a placa foi incubada em estufa de 37°C por 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação a reação foi interrompida por adição de 50µl da Solução “stop solution”. A leitura das placas foi realizada em Leitor de placa de ELISA (ThermoScientific modelo Multiskan FC)²⁷ utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm.

24 Centrífuga minispin para eppendorf (minispin plus®), Brazil

25 Kit ELISA PDGF para coelho®, Mybiosource, USA

26 Kit ELISA TGF-β1 para coelho®, Mybiosource, USA

27 Leitor de placa de ELISA(multiskan FC®), ThermoScientific, USA

4.11.2. Elisa para determinação de TGF-β1

Amostras de plasma foram descongeladas a temperatura ambiente e adicionadas 50 µl em duplicata à placa de ELISA (96 poços). Paralelamente, solução padrão de TGF-β1 foi adicionada à placa nas concentrações de 1200, 600, 300, 150 e 75 pg/ml. Após a colocação das amostras as seguintes soluções foram adicionadas à placa: (1) nos poços contendo o plasma sanguíneo foram colocados 10 µL da solução de anticorpo biotilado anti- TGF-β1 (Anti- TGF-β1- Biotina) e 50 µL de solução de estreptavidina-HRP; (2) nos poços com a solução padrão administrou-se 50 µL de solução de estreptavidina-HRP e (3) nas amostras branco 50 µL da solução Anti- TGF-β1- Biotina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 60 minutos. Depois de completado o tempo de incubação as placas foram devidamente lavadas com solução de lavagem por cinco vezes. A seguir adicionou-se aos poços da placa, 50 µL da Solução de cromógeno A (primeiramente) e 50 µl da Solução de cromógeno B. Após adição dos reagentes a placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação a reação foi interrompida por adição de 50 µl da Solução denominada “*stop solution*”. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA, utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm.

4.11.3. Determinação da concentração final dos fatores de crescimento

Utilizou-se o método de regressão linear para conversão dos valores em leitura óptica em concentração (ng/ml de PDGF e pg/ml de TGF-β1). Conforme a concentração dos padrões e os valores em absorbância correspondentes, calculou-se a equação de regressão linear da curva padrão e em seguida, aplicou-se os valores de absorbância da amostra na equação de regressão para calcular a concentração da amostra correspondente.

4.12 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foram empregadas as seguintes provas:

- Teste de Student-Newman-Kels para avaliar as diferenças entre os valores pareados do sangue total e o CAP;
- Teste de Tukey para comparações de variáveis pareadas;
- Teste de Kruskal-Wallis para determinar a interação entre as variáveis grupo e tempo.
- Teste de Friedman para determinar o efeito do tempo em cada um dos grupos.

Os valores das médias, valores mínimos e máximos e desvio padrão obtidos dos dados observados foram comparados empregando-se a análise de variância ANOVA para determinar se existem diferenças significativas nas respostas aos tratamentos aplicados.

O intervalo de confiança foi de 95% aceitando uma diferença estatística de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação ortopédica

Os resultados da avaliação ortopédica dentro e entre os grupos nos diferentes momentos são apresentados nas tabelas 2, 3, 4, e 5.

Houve dificuldade para realizar a avaliação ortopédica dos coelhos devido ao temperamento desta espécie cuja locomoção é rápida e saltitante. Três coelhos (21,42%) apresentaram, após a ruptura do LCCr, alterações discretas na locomoção dificultando a avaliação dos parâmetros e a percepção de mudanças na locomoção.

5.1.1 Apoio e abdução do membro

Foram comparadas as médias do apoio e da abdução do membro nos diferentes grupos e momentos avaliados (Tab. 2).

Tabela 2. Valores da média e do desvio padrão do apoio e abdução do membro posterior direito de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

APOIO E ABDUÇÃO DO MEMBRO (Média, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	1 ($\pm 0,0$) ^{aA}	1 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	2 ($\pm 0,0$) ^{bA}	2 ($\pm 0,0$) ^{bA}
M3	3,14 ($\pm 0,69$) ^{bA}	2,28 ($\pm 0,48$) ^{bB}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3. CAP: concentrado autólogo de plaquetas.

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nos grupos controle e CAP observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados o M1 com o M2 e o M3, mas não houve diferença significativa entre o M2 e o M3 nos grupos controle e CAP.

Entre grupos, entretanto, verificou-se diferença estatisticamente significativa no M3, com melhor apoio e menor abdução do membro no grupo que recebeu o CAP intra-articular (Tab. 2).

Observou-se, em ambos os grupos, no M2, discreto alívio do suporte do peso com discreta abdução do MPD, o que é esperado devido à instabilidade articular. Quinze dias após a estabilização articular verificou-se em cinco coelhos (75,4%) do grupo CAP quadro semelhante ao M2 (anexo Tab. 8.1.1) e abdução do membro com alívio moderado do suporte do peso em dois animais (28,5%).

Embora tenha ocorrido melhora da deambulação 15 dias após a estabilização e injeção de CAP, esta não retornou aos níveis iniciais, devido ao processo degenerativo já instalado e ao curto

tempo de aplicação de CAP já que o protocolo sugerido é de três aplicações.

No grupo controle, entretanto, observou-se neste mesmo intervalo de tempo (M3), alívio discreto do suporte de peso em um animal (14,28%), alívio moderado do suporte do peso em quatro animais (57,14%) e transferência do suporte do peso em dois (28,57%), mesmo após a estabilização articular (anexo Tab. 8.1.1). Observou-se neste grupo maior desconforto clínico. Isto leva a concluir que o CAP exerce ação benéfica sobre a articulação com redução da dor e melhora do apoio do membro.

Quando comparados os grupos CAP e controle, observou-se diferença significativa no apoio e abdução do membro no M3. O melhor uso do membro no grupo CAP provavelmente seja devido ao controle da inflamação neste grupo. O CAP modula a inflamação e favorece a reparação tecidual diminuindo assim o processo inflamatório e a dor pela ação dos fatores de crescimento e suas funções no metabolismo celular (García-Denche, 2006; Froum et al., 2002; Gale e Yancopoulos, 1999).

A ruptura do LCCr promove instabilidade articular que afeta diretamente o suporte de peso e a locomoção (Pelisson et al., 2010). Mesmo após o tratamento é comum observar discreta instabilidade e alívio do suporte do peso sobre o membro acometido segundo o relatado por Muzzi et al., (2009). Essa instabilidade remanescente pode favorecer o quadro inflamatório e consequentemente a progressão do processo degenerativo.

A evolução do processo degenerativo é influenciada pela degradação da MEC e pelas alterações nos tecidos articulares (Canapp, 2013; Kontinen et al., 2012). A perda dos elementos constituintes da cartilagem, a formação de osteófitos, a exposição do osso subcondral e a inflamação da cápsula sinovial causam dor e limitam o uso do membro (Brandt, 1989). O quadro clínico menos acentuado no grupo CAP se deve possivelmente à ação benéfica dos fatores de crescimento que atuam na redução da liberação de enzimas degradativas e da inflamação e propicia maior conforto aos animais.

5.1.2 Crepitação

Os valores das médias são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Valores da média e desvio padrão do grau de crepitação articular em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

CREPITAÇÃO (Media, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	1 ($\pm 0,0$) ^{aA}	1 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	1,14 ($\pm 0,37$) ^{aA}	1,14 ($\pm 0,37$) ^{aA}
M3	1,71 ($\pm 0,75$) ^{bA}	1,28 ($\pm 0,48$) ^{aA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Em relação à crepitação, no grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos M1 e M2, mas foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre M1 e M3 e entre M2 e M3, indicando a aumento da crepitação ao longo do tempo de estudo.

Por outro lado, nos coelhos do grupo CAP, não foi observada diferença significativa entre M2 e M3, sugerindo controle do processo articular degenerativo (Tab. 3).

Entretanto, quando comparados os grupos, não se verificou diferença significativa nos tempos avaliados, apesar de a crepitação no grupo CAP apresentar um valor numérico inferior ao do grupo controle no M3, o que induz a inferir que o CAP tem ação benéfica na articulação lesionada.

De fato, a crepitação foi observada em ambos os grupos no M2 de maneira semelhante, pois até então ambos os grupos receberam o mesmo tratamento. A diferença se manifestou no M3 (Tab. 3). Nesse momento, as radiografias não apresentavam evidências da presença de osteófitos. A crepitação pode ocorrer pela presença de osteófitos ou pelo atrito entre estruturas (Rayward et al., 2004).

Os animais do grupo CAP apresentaram evolução mais lenta dos sinais característicos do processo degenerativo, devido possivelmente ao efeito do CAP que auxilia na proliferação, diferenciação e mitose celular (Werner e Grose, 2003; Heldin e Westermarck, 1999; Clark, 1993) migração de células epiteliais e angiogênese (García-Denche, 2006; Gao et al., 1999), que controlam o processo inflamatório e pode favorecer o controle da progressão do processo articular degenerativo.

Conforme o descrito por Stockwell (1991) e Rychel (2010) a OA afeta as articulações sinoviais, causando destruição da cartilagem articular e alterações que provocam inflamação, dor, claudicação e formação de osteófitos (Zhu et al., 2013; Franklin et al., 2009; Liu et al., 2003; Westacott e Sharif, 1996), como evidenciado nesta pesquisa ainda em curto tempo de observação.

A OA é caracterizada pela degeneração da cartilagem articular a qual se torna mais fina e desgastada, pela eburnação do osso subcondral e formação de osteófitos marginais (Beckwee et al., 2013; Mercuri, 2008). Segundo Muzzi et al (2009) a presença de crepitação está relacionada com o aumento progressivo de osteófitos peri-articulares e segundo Johnson e Johnson (1993), esse fato está diretamente relacionado com a progressão do processo degenerativo, como evidenciado em dois coelhos do grupo controle. Muito embora o período de observação tenha sido curto, pode-se verificar maior conforto dos animais no grupo CAP.

Os fatores de crescimento modulam o processo inflamatório e favorecem a chegada de substâncias anti-inflamatórias que podem minimizar as alterações na cartilagem, na MEC e conseqüentemente podem desacelerar o avanço da OA e a manifestação dos sinais clínicos (Saito et al., 2009), conforme observado nos resultados deste estudo.

5.1.3 Sensibilidade dolorosa

Foram comparadas as médias da sensibilidade dolorosa em ambos os grupos cujos valores são apresentados na tabela 4.

Observou-se em ambos os grupos sensibilidade dolorosa no M2, o que já era esperado, visto que ambos foram submetidos ao mesmo tratamento. Cinco animais (71,42%) do grupo controle apresentaram dor discreta e dois (28,56%) dor moderada (anexo Tab. 8.1.3). No grupo CAP observou-se presença de dor discreta em quatro animais (57,14%) e dor moderada em três (42,85%).

No grupo controle houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos valores da sensibilidade dolorosa entre M1 e M2 e entre M1 e M3. Não foi verificada diferença estatística nesse parâmetro quando comparados M2 com M3, evidenciando manutenção do quadro mesmo após a estabilização articular (Tab. 4).

Tabela 4. Valores da média e desvio padrão da sensibilidade dolorosa da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

SENSIBILIDADE DOLOROSA (Média, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	1 ($\pm 0,0$) ^{aA}	1 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	2,29 ($\pm 0,49$) ^{bA}	2,43 ($\pm 0,53$) ^{bA}
M3	2,86 ($\pm 0,38$) ^{bA}	1,86 ($\pm 0,90$) ^{abB}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Como no grupo controle, também no grupo CAP foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos valores da sensibilidade entre o M1 e o M2, porém sem diferença entre os momentos M1 e M3, indicando redução da sensibilidade dolorosa nos coelhos do grupo CAP, atribuída a esta substância. Isto contribuiu para o melhor apoio e uso do membro, como foi evidenciado na avaliação desse parâmetro. O CAP contém fatores de crescimento e citocinas que regulam e modulam o processo inflamatório (Rezende et al., 2016).

No M3 houve redução deste parâmetro em relação ao M2 nos animais do grupo CAP. Em três animais (42,85%) não havia dor, em dois (28,57%) ela reduziu de moderada para discreta e em outros dois (28,57%). Não houve alteração em relação ao M2 (anexo Tab. 8.1.3). No grupo controle, entretanto, observou-se em quatro animais (57,14%) aumento da sensibilidade dolorosa de discreta para moderada e manutenção do quadro nos demais. Assim, seis animais (85,71%) no M3 apresentaram sensibilidade dolorosa moderada e um animal (14,29%) dor discreta (Anexo tab. 8.1.3).

Quando comparados os valores das médias de ambos os grupos, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre M1 e M2, mas foi evidenciada diferença

significativa ($p < 0,05$) entre ambos grupos no M3 (Tab. 4).

Alguns fatores como a degradação progressiva da cartilagem articular que leva à inflamação sinovial, formação de osteófitos, esclerose do osso subcondral e exposição do osso subcondral podem causar dor articular (Vidotto et al., 2013; Ayrál et al., 2005; Lavigne et al., 2005). A dor presente na OA pode decorrer da pressão sobre as terminações nervosas nas regiões onde se desenvolvem os osteófitos, de microfraturas no osso subcondral ou da distensão da cápsula articular (Brandt, 1989). Todos esses fatores associados levam ao uso limitado da articulação e conseqüente claudicação e apoio limitado do membro, fato observado neste experimento, principalmente nos coelhos do grupo controle.

A redução da dor nos coelhos do grupo CAP no momento M3, isto é, duas semanas após a injeção do CAP está de acordo com o relatado por Saito et al (2009) sobre o efeito favorável da injeção intra-articular de CAP. Segundo o referido autor, o CAP intra-articular retarda a evolução do processo degenerativo, a formação de osteófitos e a perda da cartilagem. Apesar de ter sido feita após uma única aplicação de CAP, pode-se observar sua ação favorável no controle da dor em relação ao grupo controle.

5.1.4 Efusão articular

Os valores das médias da efusão articular para ambos os grupos nos três momentos avaliados são apresentadas na tabela 5.

A efusão articular foi observada em ambos os grupos nos momentos M2 e M3 (anexo Tab. 8.1.4), traduzida pelo discreto aumento de volume flutuante da articulação e pela comprovação após a coleta do líquido sinovial. Esse aumento foi de cerca de 0,4 a 0,8 ml, considerando que quando possível, a colheita do líquido sinovial no M1 correspondeu a 0,1 ml.

Nos coelhos do grupo controle foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos valores das médias da efusão articular entre M1 e M2 e entre M1 e M3, porém não foi verificada diferença significativa nos valores da média da efusão quando comparados M2 com M3 (Tab. 5).

Tabela 5. Valores da média e desvio padrão do parâmetro efusão articular de coelhos de ambos os grupos nos momentos M1, M2 e M3.

EFUSÃO ARTICULAR (Media, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	0,0 ($\pm 0,0$) ^{aA}	0,0 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	1,29 ($\pm 0,49$) ^{bA}	1,29 ($\pm 0,49$) ^{bA}
M3	1,86 ($\pm 0,38$) ^{bA}	1 ($\pm 0,0$) ^{bB}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Já nos animais do grupo CAP, foi observada diferença estatística nos valores das médias da efusão articular no M1 em relação ao M2 e ao M3, contudo, não houve diferença significativa nas médias da efusão quando comparados M2 com M3.

Na comparação entre os grupos, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores das médias da efusão articular no M3 (Tab. 5).

Verificou-se em cinco coelhos (71,42%) do grupo CAP efusão articular com menos de 0,5 ml de líquido sinovial enquanto dois coelhos (28,57%) apresentaram efusão articular com mais de 0,5 ml de líquido sinovial (anexo Tab. 8.1.4). No M3, embora a efusão estivesse presente em todos os animais do grupo CAP, observou-se redução da mesma em dois coelhos (28,57%) que apresentaram mais de 0,5 ml no M2. Os demais animais (71,42%) mantiveram a efusão articular no mesmo nível do M2. Apesar da diminuição da efusão articular no grupo CAP não houve retorno aos valores iniciais.

No grupo controle os valores da efusão articular foram maiores no M3 em relação ao M2, com aumento progressivo, porém sem diferença significativa. No M2 cinco animais (71,42%) apresentaram efusão com menos de 0,5 ml de líquido sinovial e dois animais (28,56%) com mais de 0,5 ml de líquido. Foi observado no M3 um aumento da efusão articular em quatro coelhos (57,14%), dos quais foram coletados mais de 0,5 ml de líquido sinovial, enquanto nos outros três (42,85%) manteve-se a efusão articular do M2. Assim, no M3 seis coelhos (85,71%) apresentaram efusão com mais de 0,5 ml de líquido sinovial e um coelho (14,28%) apresentou efusão com menos de 0,5 ml de líquido.

Vale salientar que esta avaliação é subjetiva e está diretamente relacionada com a sensibilidade do examinador e pode ser influenciada pelo espessamento da cápsula articular. Entretanto, nos momentos M2 e M3 foram coletadas maior quantidade de líquido sinovial compatível com articulação sujeita a injúrias. Comparando-se os grupos verificou-se diferença significativa entre os mesmos no momento M3 com maior grau de efusão articular no grupo controle. A ruptura do LCCr leva a alterações na qualidade do líquido sinovial e ao aumento na produção do mesmo com consequente efusão articular que pode ser palpada no recesso suprapatelar e no espaço parapatelar (Mateus, 2010).

A efusão articular é causada pela lesão da cartilagem articular presente na OA ou pela sinovite (Tatarunas et al., 2006). Em resposta a uma injúria os condrócitos e os sinoviócitos liberam citocinas que causam vasodilatação dos capilares subsinoviais com aumento na permeabilidade vascular e saída de fluido, proteínas e células inflamatórias para o espaço articular (MacWilliams e Friedrichs, 2003). Nos coelhos do grupo controle observou-se aumento dos *scores* da efusão articular confirmados pelo maior volume de líquido sinovial coletado no momento M3.

Nos coelhos do grupo CAP, entretanto observou-se uma diminuição dos *scores* da efusão em dois coelhos (28,57%) após a aplicação do CAP. Este é conhecido pelas suas propriedades anti-inflamatórias e sua capacidade de recuperar os tecidos lesionados (Boswell et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012). Após a aplicação do CAP e a liberação dos fatores de crescimento no

local, inicia-se a chegada de diferentes tipos celulares que aceleram a recuperação dos tecidos estimulando a mitose celular, a proliferação e diferenciação celular, a síntese de proteínas da MEC como colágeno, prevenindo a destruição da cartilagem e seus efeitos (Anitua et al., 2012; Silva et al., 2012a; Silva et al., 2012b).

É possível que após aplicações subsequentes do CAP como no protocolo usado por Silva (2012) se obtenha maior redução da efusão articular até alcançar o retorno aos parâmetros considerados normais.

Segundo Carter et al (1999) e Gardner (1994) a liberação de substâncias e enzimas que degradam a MEC como as metaloproteinases, a IL-1 e o FNT α leva à degradação da cartilagem articular e induzem a inflamação local e mudanças bioquímicas que conduzem a outras alterações como sinovite (Bolon et al., 2004; Guilak et al., 1994). O CAP modula o processo inflamatório, diminuindo a inflamação e a degradação da cartilagem articular (Iacopetti et al., 2012; Henrotin et al., 2012).

5.2 Avaliação goniométrica

A goniometria é usada para mensurar os ângulos de uma articulação e portanto, sua amplitude de movimento. A técnica permite determinar o efeito da doença articular e monitorar a progressão de uma lesão, bem como do tratamento conforme o relatado por Conceição et al., (2012). Os valores obtidos para ambos os grupos são apresentados na tabela 6.

Verificou-se no grupo controle diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas as médias da flexão do MPD no M1 em relação ao M2 e ao M3, porém não houve diferença significativa na flexão do MPD quando comparados o M2 e o M3 nesse grupo. Apesar da estabilização articular, houve um impacto negativo na amplitude de movimento da articulação FTP (Tab. 6) traduzido pelo aumento significativo na média do ângulo de flexão e redução significativa da média do ângulo de extensão.

Nos coelhos do grupo CAP houve aumento não significativo dos valores de flexão da articulação FTP do MPD no M2 quando comparado com M1. Aos 15 dias após a estabilização e injeção intra-articular de CAP (M3), este parâmetro mostrou redução não significativa quando comparado com o M2 e manteve-se distante dos valores iniciais (anexo Tab. 8.2.1).

Tabela 6. Valores da média e desvio padrão dos ângulos de flexão e extensão da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

	COELHOS CAP		COELHOS CONTROLE	
	MPD		MPD	
	F	E	F	E
M1	36,7 ($\pm 2,8$) ^{aA}	148,1 ($\pm 1,6$) ^{aA}	36,1 ($\pm 0,7$) ^{aA}	148,8 ($\pm 3,6$) ^{aA}
M2	38,1 ($\pm 2,0$) ^{aA}	146,8 ($\pm 10,2$) ^{aA}	39,5 ($\pm 1,9$) ^{bA}	145,1 ($\pm 7,8$) ^{aA}

M3	37,8 ($\pm 4,1$) ^{aA}	144,4 ($\pm 10,0$) ^{aA}	41,4 ($\pm 2,4$) ^{bB}	137,4 ($\pm 13,7$) ^{bB}
COELHOS CAP			COELHOS CONTROLE	
MPE			MPE	
	F	E	F	E
M1	36,2 ($\pm 3,8$) ^{aA}	149,5 ($\pm 6,1$) ^{aA}	36,4 ($\pm 4,7$) ^{aA}	149,8 ($\pm 5,5$) ^{aA}
M2	37,0 ($\pm 4,0$) ^{aA}	149,7 ($\pm 9,7$) ^{aA}	36,8 ($\pm 3,5$) ^{aA}	150,5 ($\pm 2,1$) ^{aA}
M3	36,2 ($\pm 5,2$) ^{aA}	150,2 ($\pm 4,7$) ^{aA}	35,7 ($\pm 3,4$) ^{aA}	150,7 ($\pm 5,4$) ^{aA}

MPD: membro posterior direito. MPE: membro posterior esquerdo. M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas. F: flexão, E: extensão

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Quando comparados os grupos CAP e controle, não se observou diferença estatística em relação à flexão do MPD quando comparadas as médias entre M1 e M2, mas, houve diferença significativa ($p < 0,05$) das médias quando comparadas entre M2 e M3 (Tab. 6).

Em relação ao ângulo de extensão da articulação FTP do MPD nos coelhos do grupo controle, não foi observada diferença significativa na média quando comparados o M1 com o M2 apesar de ter sido registrada uma diminuição discreta nos valores da média. Houve, entretanto, diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores da média quando comparado o M3 em relação ao M1 e ao M2 (Tab. 6).

Nos coelhos do grupo CAP não se observou diferença significativa em relação às médias do ângulo de extensão do MPD nos momentos avaliados apesar de ter sido encontrada diminuição discreta dos valores dessa medida (anexo Tab. 8.2.1), o que demonstra possivelmente ação inicial do CAP sobre os processos articulares.

Na comparação entre os grupos CAP e controle, não se observou diferença significativa no ângulo de extensão da articulação FTP do MPD nos momentos M1 e M2. Já no M3, entretanto, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos valores do ângulo de extensão da articulação FTP do MPD.

Os resultados obtidos demonstram a ação benéfica do CAP na amplitude de movimento (flexão e extensão) do membro afetado. A continuidade do tratamento, isto é, a terceira aplicação do CAP e avaliações subsequentes são necessárias para determinar completamente o efeito do CAP.

Não foram observadas diferenças estatísticas nos valores das médias dos ângulos de flexão e extensão no MPE em nenhum dos grupos.

O processo articular degenerativo afeta as estruturas que compõem a articulação e causa danos irreversíveis na cartilagem e no osso subcondral, propicia o uso limitado do membro, a atrofia da musculatura, contribui para a disfunção articular e altera a amplitude do movimento articular

(Dunlop et al., 2010; Baraúna Jr et al., 2007).

Os resultados mostram diferença clínica entre os dois grupos com tendência à melhora do quadro no grupo CAP, o que sugere um efeito benéfico dessa substância. O CAP contém fatores de crescimento que modulam e regulam o processo inflamatório e de cicatrização tecidual, favorecendo a revascularização e epitelialização dos tecidos lesionados (Carmona et al., 2011).

Algumas pesquisas tanto em humanos quanto em animais, demonstraram que o CAP favorece a reparação de lesões agudas e crônicas do sistema musculoesquelético em ambas as espécies (Sánchez et al., 2009. Carmona et al., 2007). Todos esses fatores podem ter influenciado os valores da goniometria observados neste estudo, pois aqueles obtidos no grupo CAP foram mais favoráveis no M3 quando comparados com os do grupo controle.

As alterações da amplitude de movimento das articulações sinoviais são observadas após lesões que comprometem a estabilidade articular como fraturas articulares, lesões nos meniscos ou ligamentos que, associadas à atrofia muscular produzem significativa disfunção articular e conseqüentemente alterações na amplitude de movimento (Mendonça, 2009). A redução da extensão é observada em cães com ruptura do LCCr (Korvick e Pijanowski, 1994) e tem sido associada com o mecanismo de adaptação e liberação de peso durante a fase de apoio do membro, diminuindo dessa forma a sensação de dor (Tashman et al., 2004).

Além do processo degenerativo que interfere com a mobilidade articular, os valores dos ângulos de flexão e extensão do membro podem ser influenciados pela contração muscular dos coelhos durante o exame ortopédico, que foi realizado sem sedação do animal. A contração muscular limita também a amplitude do movimento (Govoni, 2011). O coelho é um animal de movimentos rápidos e ágeis e de difícil avaliação ortopédica.

A função do ligamento cruzado é estabilizar a articulação FTP (Canapp Jr, 2007), portanto após sua ruptura é de se esperar o surgimento do processo articular degenerativo e das conseqüentes alterações biomecânicas adquiridas. Mesmo que a articulação seja estabilizada o desenvolvimento da OA e o aumento da rigidez articular são inevitáveis (Tashman et al., 2004), fato que, sem dúvida, influenciou os resultados da amplitude de movimento da articulação FTP direita.

Nos membros contralaterais, em ambos os grupos, não foram observadas alterações nos diferentes momentos em relação à amplitude do movimento articular, contrário ao relatado por Innes et al., (2000) que, em avaliações tardias, e em situação diferente deste estudo, observaram na articulação FTP de cães com ruptura do LCCr alterações significativas no membro contralateral com aumento de volume articular e alterações na amplitude de movimento. O tempo de avaliação dos coelhos neste estudo ainda é precoce e a biomecânica da articulação do coelho é diferente da articulação do cão.

5.3 Avaliação radiográfica

As imagens radiográficas dos coelhos do grupo controle e do grupo CAP no M1 são apresentadas nas figuras 1 e 2, as do M2, nas figuras 3 e 4 e as do M3, nas figuras 5 e 6. A comparação entre as médias dos parâmetros avaliados encontra-se nas tabelas 7, 8, 9 e 10.

No M1 todos os animais mostravam as articulações saudáveis, sem alterações visíveis (Fig. 1 e 2). A tabela 7 apresenta os valores da média e desvio padrão referente à presença de osteófitos periarticulares de ambos os grupos no M1, M2 e M3. A tabela 8 apresenta os valores da média da efusão articular observado na radiografia nos grupos avaliados e em todos os momentos. A tabela 9 apresenta os valores da média e do desvio da variável esclerose subcondral e a tabela 10 mostra os valores da média e desvio padrão da intensidade do processo degenerativo em ambos os grupos. O exame radiográfico permitiu acompanhar as alterações ósseas e a evolução da OA no período previsto.

No M2, verificou-se em ambos os grupos presença de osteófitos na extremidade distal da patela em 85,71% dos animais (6/7) e efusão articular em todos os animais de ambos os grupos (Fig. 3 e 4). A esclerose subcondral, entretanto, não foi visível em nenhum dos grupos neste tempo.

5.3.1 Presença de osteófitos

Os valores das médias da presença de osteófitos nos tempos avaliados são apresentados na tabela 7.

Em ambos os grupos foram encontradas alterações articulares compatíveis com a OA a partir do M2. Essas alterações progrediram e foram mais acentuadas nos coelhos do grupo controle no M3.

A presença de osteófitos no pós-operatório foi similar entre os grupos com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as médias no M1 em relação ao M2 e M3. Entre M2 e M3 não se verificou diferença significativa nos grupos controle e CAP, apesar do discreto maior aumento no grupo controle. Os achados radiográficos indicam alterações compatíveis com o processo articular degenerativo com aparente menor progressão no grupo que recebeu o CAP intra-articular.

No M2 foi verificado aumento no valor da média em relação ao M1 em ambos os grupos. Nos coelhos do grupo controle observou-se quatro animais (57,14%) com osteofitose discreta (anexo Tab. 8.3.1) e três animais (42,86%) com osteofitose moderada (Fig. 3). No M3, observou-se evolução mais intensa dos sinais radiográficos nos coelhos deste grupo. Um animal (14,28%) apresentou osteofitose discreta, três animais (42,86%) osteofitose moderada e os outros três (42,86%), acentuada.

Nos animais do grupo CAP, no M2, havia osteofitose discreta (Fig. 4) em cinco (71,42%), moderada em um (14,28%) e acentuada em um (14,28%). No M3, observou-se a evolução da

osteofitose de discreta para acentuada em um coelho (14,28%) e permanência dos valores do M2 em quatro coelhos, resultando portanto, dois coelhos (28,57%) com osteofitose acentuada, um coelho moderada (14,28) e os quatro restantes apresentaram osteofitose discreta (57,14%) (anexo Tab. 8.3.3).

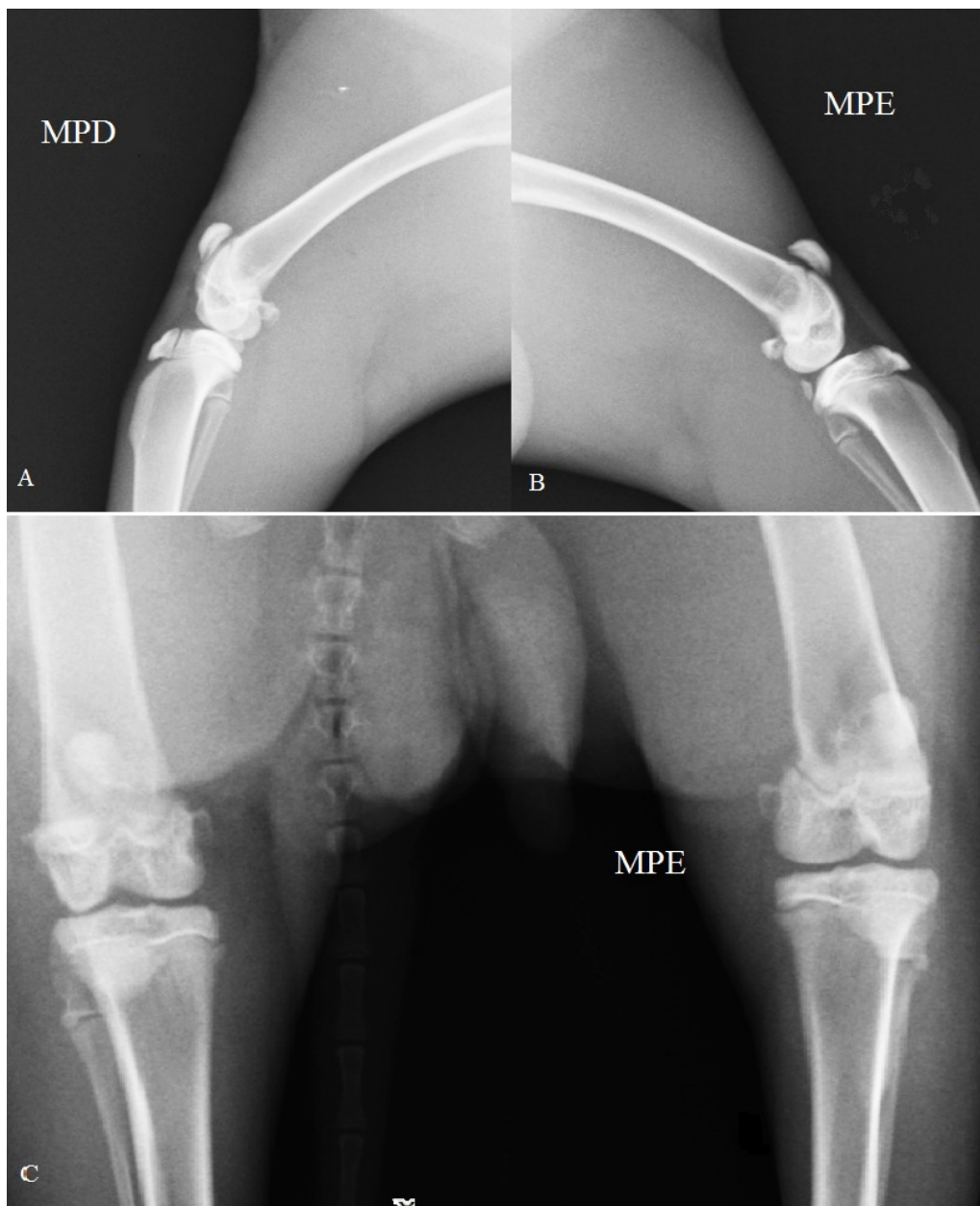


Figura 1. Radiografias mediolateral e ventrodorsal da articulação FTP saudável de coelhos do grupo controle no momento M1. A: MPD sem alterações; B: MPE sem alterações e C: Radiografia ventrodorsal

sem alterações.

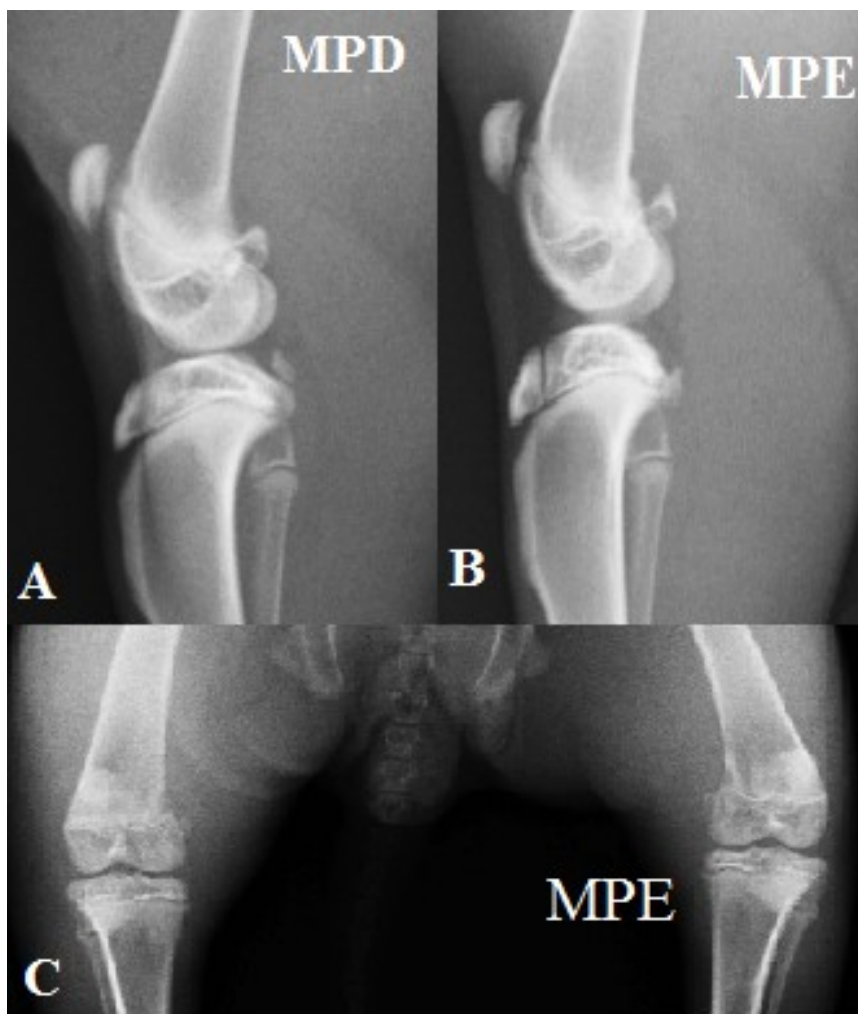


Figura 2. Radiografias mediolateral e ventrodorsal da articulação FTP saudável de coelhos do grupo CAP no momento M1. A: MPD sem alterações ; B: MPE sem alterações e C: Radiografia ventrodorsal sem alterações.

Tabela 7. Valores da média e do desvio padrão do parâmetro presença de osteófitos nos coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

PRESENÇA DE OSTEÓFITOS (Média, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	0,0 ($\pm 0,0$) ^{aA}	0,0 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	1,43 ($\pm 0,53$) ^{bA}	1,43 ($\pm 0,79$) ^{bA}
M3	2,29 ($\pm 0,76$) ^{bA}	1,71 ($\pm 0,95$) ^{bA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas
^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A osteofitose é um achado comum após ruptura do LCCr. No estudo de Innes et al (2004) e Rayward et al (2004) foi encontrado um aumento significativo no *score* da osteofitose ao longo do tempo de observação. Achado semelhante foi encontrado nos coelhos deste experimento, nos quais foi observado discreto aumento progressivo nesse parâmetro, apesar do curto período de observação.

Em geral, os osteófitos são observados no plateau tibial, nas fabelas laterais e medial, na borda distal da patela e na região pericondilar (Louboutin et al., 2009). Também neste experimento, em ambos os grupos, os osteófitos foram observados nestas localizações, no M2 e no M3, com mais intensidade nos coelhos do grupo controle.

A presença de osteófitos pode resultar em limitação da função articular devido ao aumento da sensibilidade dolorosa que interfere na amplitude de movimento articular (Mercuri, 2008; Brandt, 1989) e é um dos parâmetros considerado no monitoramento do avanço da OA. Eles podem ser vistos radiograficamente duas semanas após a ruptura do LCCr, embora comecem a se formar depois do terceiro dia (Rayward et al., 2004). Neste estudo os osteófitos foram evidenciados radiograficamente três semanas após a ruptura do LCCr, em ambos os grupo.

5.3.2 Efusão articular

Os valores da efusão articular em ambos os grupos nos momentos avaliados são apresentados na tabela 8.

No parâmetro efusão articular avaliado radiograficamente não havia alterações no M1, pois os animais estavam saudáveis. Foi observada diferença significativa entre M1 e M2 e M1 e M3. Apesar da presença de efusão nos momentos subsequentes, não houve diferença estatisticamente significativa entre M2 e M3 em ambos os grupos.

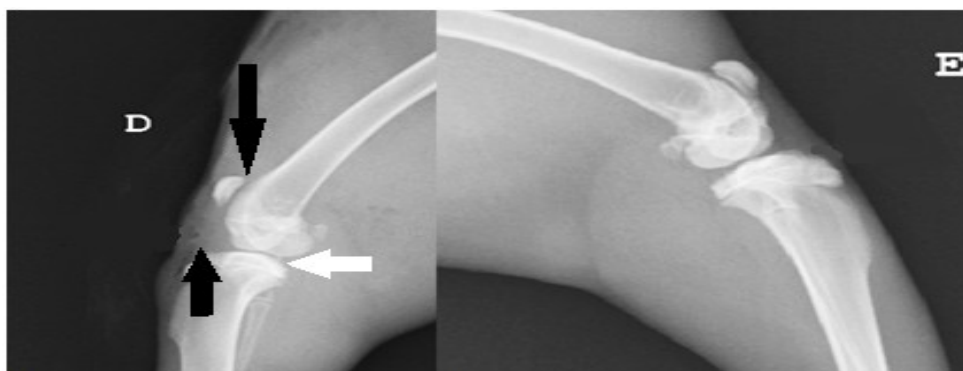


Figura 3. Radiografias mediolateral de coelhos do grupo controle no momento M2. A: efusão articular

evidenciada pelo afastamento da patela do sulco da tróclea e pela perda da sombra do coxim adiposo infrapatelar (setas pretas). Presença de osteófitos na superfície do plateu da tíbia (seta branca cheia); B: MPE sem alterações.

Tabela 8. Valores da média e do desvio padrão do parâmetro efusão articular em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

EFUSÃO ARTICULAR (Média, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	0 ($\pm 0,0$) ^{aA}	0 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	1 ($\pm 0,0$) ^{bA}	1 ($\pm 0,0$) ^{bA}
M3	1 (0,0) ^{bA}	0,86 ($\pm 0,38$) ^{bA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na avaliação entre grupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos momentos avaliados, embora tenha sido observada uma discreta redução nos valores da efusão no grupo CAP em relação ao grupo controle no M3.

No M2, todos os animais de ambos os grupos apresentaram efusão articular ao exame radiográfico, a qual foi confirmada clinicamente pelo aumento do líquido sinovial colhido antes da cirurgia de reparação do LCCr (Fig. 3 e 4). Essa condição se manteve até o M3 em ambos os grupos, exceto em um animal (14,28%) do grupo CAP que não apresentava mais efusão articular.

A radiografia da articulação FTP pode evidenciar alguns sinais que indicam a presença e/ou gravidade da OA (Canapp, 2013), e a efusão, como verificado neste estudo é observada radiograficamente pelo afastamento da patela em relação à troclea e pela perda da sombra do coxim adiposo na articulação (Innes et al., 2004; Rayward et al., 2004).

O aumento na quantidade de líquido sinovial leva à efusão articular, em consequência do processo inflamatório após a ruptura do LCCr (Innes et al., 2004). O líquido sinovial em excesso pode conter microcristais que agravam o processo inflamatório e estimulam a dor (Brandt, 1989), que reflete no uso do membro, como observado no grupo controle e em menor gravidade no grupo CAP.

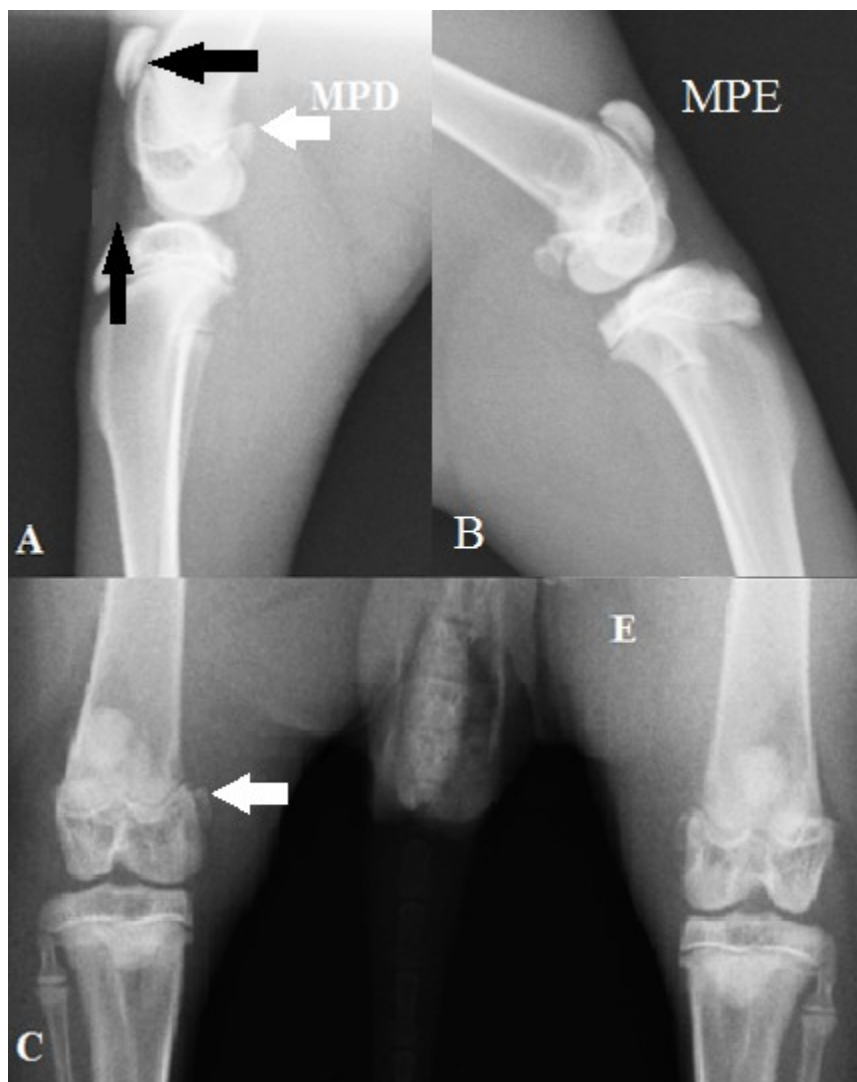


Figura 4. Radiografias mediolateral e ventrodorsal de coelhos do grupo CAP no momento M2. A: efusão articular evidenciada pelo afastamento da patela do sulco da tróclea e pela perda da sombra do coxim adiposo infrapatelar (setas pretas). Presença de osteófitos na superfície da fábela lateral (seta branca cheia); B: MPE sem alterações; C: osteófitos na superfície da fábela medial (seta branca cheia).

5.3.3 Esclerose subcondral

Os valores das médias da esclerose subcondral nos coelhos de ambos os grupos, nos três momentos, são mostrados na tabela 9.

No M2, no grupo controle, quatro animais (57,14%) apresentaram esclerose subcondral (Fig. 5).

Já no M3, evidenciou-se esclerose em outros dois coelhos (28,57%) não acometidos em M2. Portanto, seis animais (85,71%) do grupo controle apresentaram esclerose subcondral em M3 (anexo Tab. 8.3.2 e 8.3.4).

Os resultados foram semelhantes em ambos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa entre M1 e M2 e entre M2 e M3, embora tenha sido evidenciado discreto aumento nos valores. Contudo, em ambos os grupos houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre M1 e M3, indicando surgimento da esclerose.

Tabela 9. Valores da média e do desvio padrão do parâmetro esclerose subcondral nos coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

ESCLEROSE SUBCONDAL (Média, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	0 ($\pm 0,0$) ^{aA}	0 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	0,57 ($\pm 0,53$) ^{abA}	0,43 ($\pm 0,33$) ^{abA}
M3	0,86 ($\pm 0,38$) ^{bA}	0,71 ($\pm 0,49$) ^{bA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No grupo CAP, entretanto, observou-se no M2, presença de esclerose subcondral em três animais (42,85%) e ausência da mesma condição nos demais quatro (57,14%). Já no M3, verificou-se esclerose em outros dois coelhos (28,57%). Portanto, no M3, cinco animais (71,42%) mostraram esclerose subcondral (Fig. 6), registrando assim um avanço do processo degenerativo nos animais tratados.

Quando comparados os valores da média de ambos os grupos, não se evidenciou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos momentos avaliados. Os resultados semelhantes entre os grupos sugerem que o CAP não controla a progressão da esclerose subcondral, pelo menos na aplicação única.

A esclerose subcondral pode ser identificada radiograficamente e reflete uma alteração na estrutura óssea, como diminuição na sua porosidade, que é observada na radiografia como uma área mais radiopaca com perda do padrão trabecular (Ribeiro, 2011), como observado nos coelhos de ambos os grupos (Fig. 3, 4, 5 e 6).

O processo degenerativo produz lesões na cartilagem que levam à exposição do osso subcondral, ocasionando mudanças estruturais que produzem dor e alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias (Westacott e Sharif, 1996).

Algumas pesquisas realizadas para avaliar o efeito do processo degenerativo sobre o osso subcondral demonstraram que é possível encontrar alterações ósseas mediadas pelas citocinas inflamatórias através dos osteoblastos (Westacott e Sharif, 1996; Dieppe et al., 1993).

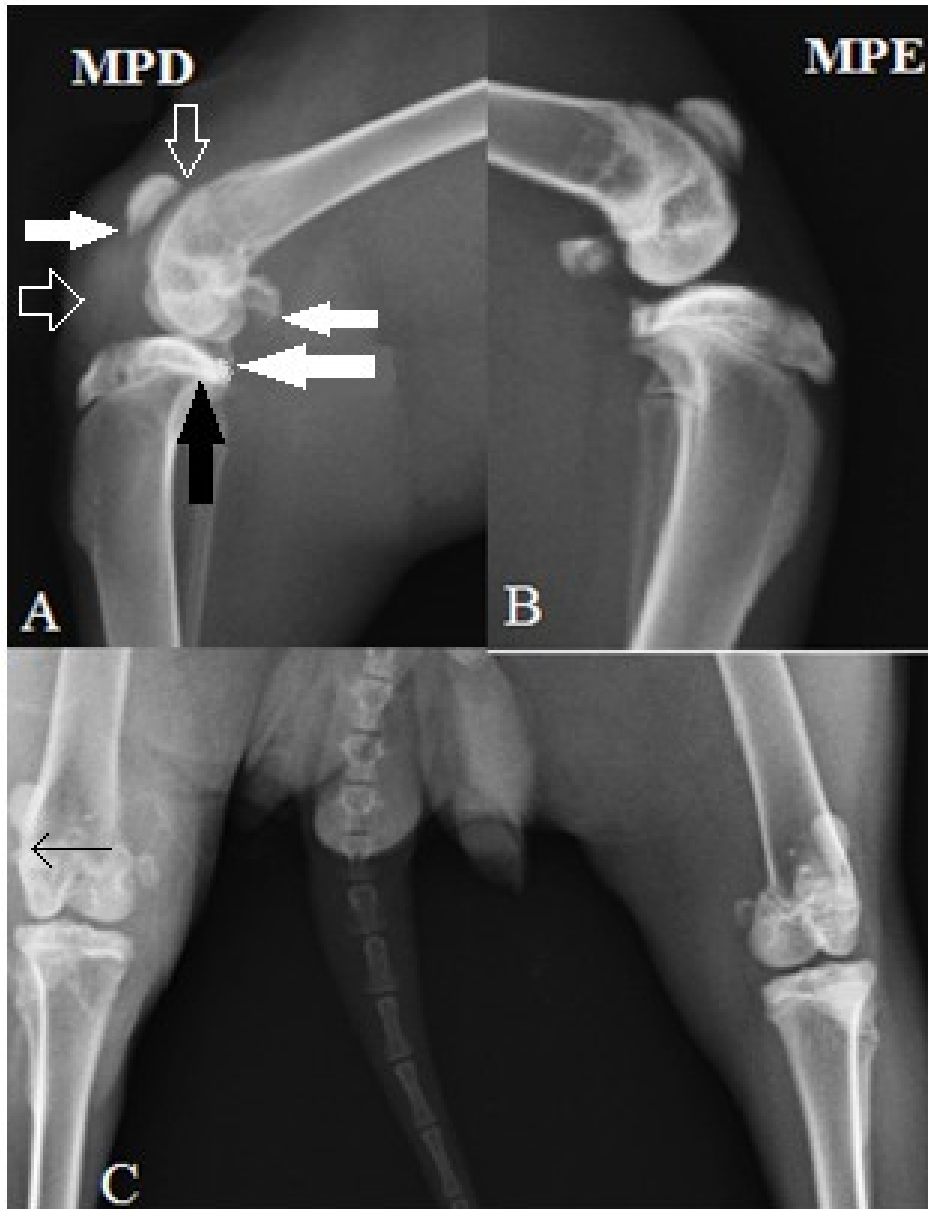


Figura 5. Radiografias mediolateral e ventrodorsal de coelhos do grupo controle no momento M3. A: presença de efusão articular evidenciada pelo afastamento da patela do sulco da tróclea e pela perda da sombra do coxim adiposo infrapatelar (setas brancas vazias). Presença de osteófitos na superfície do plateau da tíbia e na fabela lateral (setas brancas cheias). Presença de esclerose subcondral no plateau da tíbia evidenciada pelo aumento na radiopacidade (seta preta) B: MPE sem alterações; C: presença de osteófitos no côndilo lateral do fêmur (seta preta fina).

5.3.4 Intensidade do processo degenerativo

Os valores da média da intensidade do processo degenerativo são apresentados na tabela 10. A associação dos parâmetros presença de osteófitos, efusão articular e esclerose subcondral possibilitou a estimativa da intensidade do processo articular degenerativo.

Tabela 10. Valores da média e do desvio padrão do parâmetro intensidade do processo degenerativo em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

INTENSIDADE DO PROCESSO DEGENERATIVO (Media, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	0 ($\pm 0,0$) ^{aA}	0 ($\pm 0,0$) ^{aA}
M2	1 ($\pm 0,27$) ^{bA}	0,95 ($\pm 0,30$) ^{bA}
M3	1,38 ($\pm 0,30$) ^{bA}	1,09 ($\pm 0,50$) ^{bA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Do ponto de vista clínico os coelhos do grupo controle mostraram menor uso do membro, maior efusão articular e valores baixos na avaliação ortopédica geral quando comparados com os coelhos do grupo CAP. Isto leva a concluir que o CAP tem efeito benéfico nos tecidos articulares minimizando os efeitos clínicos do processo articular degenerativo, porém esses efeitos benéficos não são evidenciados radiograficamente.

Quando avaliados os valores da média da intensidade do processo degenerativo do grupo CAP, verificou-se um padrão similar ao do grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre M1 e M2 e entre M1 e M3, porém sem diferença significativa entre M2 e M3, evidenciando a progressão da OA. Numericamente há diferença entre os grupos em M3, mas não estatisticamente.

Possivelmente alguma diferença poderia ser observada no final do protocolo de três aplicações de CAP. Embora tenha sido observado um efeito clínico positivo nos animais que receberam o CAP, não foi possível observar esse mesmo efeito do ponto de vista radiográfico.

No membro contralateral não foram encontradas alterações radiográficas em nenhum dos grupos nos tempos estudados (Figs. 1-6).

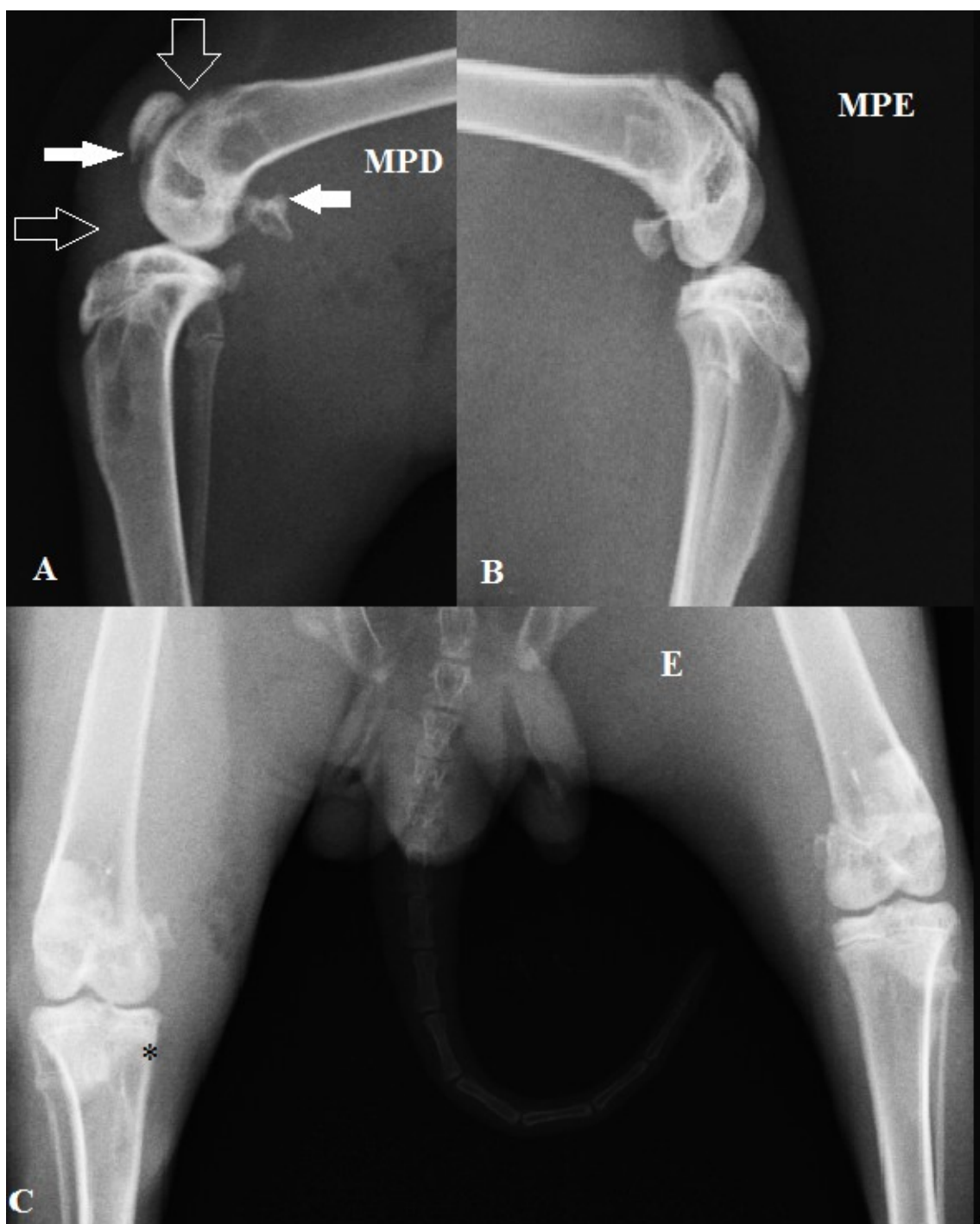


Figura 6. Radiografias mediolateral e ventrodorsal de coelhos do grupo CAP no momento M3. A: presença de efusão articular evidenciada pelo afastamento da patela do sulco da tróclea e pela perda da sombra do coxim adiposo infrapatelar (setas brancas vazias). Presença de osteófitos na fabela lateral e na

extremidade distal da patela (setas brancas cheias). B: MPE sem alterações. C: esclerose subcondral no plateau da tíbia (*).

No estudo prospectivo desenvolvido por Innes et al (2004) que avaliou a progressão radiográfica da OA em cães acometidos pela ruptura do LCCr, foi relatado que cerca do 40% dos membros contralaterais também mostraram alterações como presença de osteófitos peri-articulares, quando avaliados aos sete e 13 meses após a ruptura do LCCr. Nessa mesma pesquisa os autores observaram aumento significativo nos scores de efusão articular, de osteófitos e no score global do processo degenerativo, sendo os osteófitos a variável que mais aumentou no tempo em relação às demais. O processo degenerativo evolui e as alterações radiográficas são mais evidentes com o tempo, caracterizando a evolução do processo degenerativo como já conhecido.

Esta evolução também foi observada neste estudo com os coelhos, porém verificou-se melhor *escore* clínico naqueles animais tratados com CAP. O tempo de avaliação ainda é curto, mas pode-se supor um aparente controle do processo inflamatório que por sua vez poderia retardar a evolução do processo degenerativo. Um acompanhamento a longo prazo se faz necessário.

A principal mudança radiográfica observada foi a presença mais acentuada de osteófitos e efusão articular, principalmente nos coelhos do grupo controle. Radiograficamente verificou-se em ambos os grupos, progressão discreta do processo degenerativo, porém com menor desempenho clínico dos coelhos do grupo controle no M3.

A intensidade do processo degenerativo no M2 em ambos os grupos foi classificada como discreta, devido aos discretos achados radiográficos. Nos estágios iniciais do processo degenerativo as alterações radiográficas são mínimas e estas avançam conforme a cronicidade da lesão (Innes et al., 2004). Neste experimento osteófitos foram observados em ambos os grupos e o uso do CAP não previniu seu aparecimento.

A OA é uma condição potencialmente debilitante que atinge uma porcentagem significativa de animais domésticos, caracterizada pela degradação da cartilagem articular, sinovite, alterações nos tecidos moles intra-articulares, formação de osteófitos marginais e esclerose óssea subcondral (Melo et al., 2003), como verificado nesta pesquisa.

As alterações radiográficas que ocorrem na osteoartrose femorotibiopatelar em cães tem sido amplamente descritas (Bennet et al., 1988). As mais comuns incluem a efusão articular evidenciada pela perda da sombra do coxim adiposo infrapatelar e pelo afastamento da patela em relação a tróclea, osteofitose, principalmente ao longo das bordas trocleares, superfície caudal do platô tibial e extremidade distal da patela, esclerose subcondral (Innes et al., 2004) e remodelação óssea (Melo et al., 2003; Widmer et al., 1994). Essas alterações foram encontradas neste estudo e são indicativas da intensidade e progressão do processo degenerativo.

Os sinais radiográficos na osteoartrose nem sempre podem ser correlacionados com os sinais clínicos manifestados após a ruptura do ligamento, sendo que a claudicação, efusão articular, deslocamento cranial da tíbia, dentre outras manifestações devem ser associadas

cuidadosamente ao exame radiográfico para avaliar o grau de OA (Buquera et al., 2002). Alguns animais com achados radiográficos mínimos apresentam claudicação acentuada, enquanto outros com alterações degenerativas graves apresentam claudicação discreta, assim como observado nesta pesquisa, na qual, os animais do grupo CAP apresentaram melhor avaliação ortopédica, goniométrica e do líquido sinovial quando comparados com os animais do grupo controle embora não tenha sido observada diferença significativa na avaliação radiográfica.

5.4 Avaliação ultrassonográfica

Os resultados da avaliação ultrassonográfica são apresentados nas tabelas 11 e 12 como média e desvio padrão. A figura 7 mostra a imagem da articulação FTP saudável, indicando os principais componentes da articulação e os pontos de referência considerados no momento da avaliação.

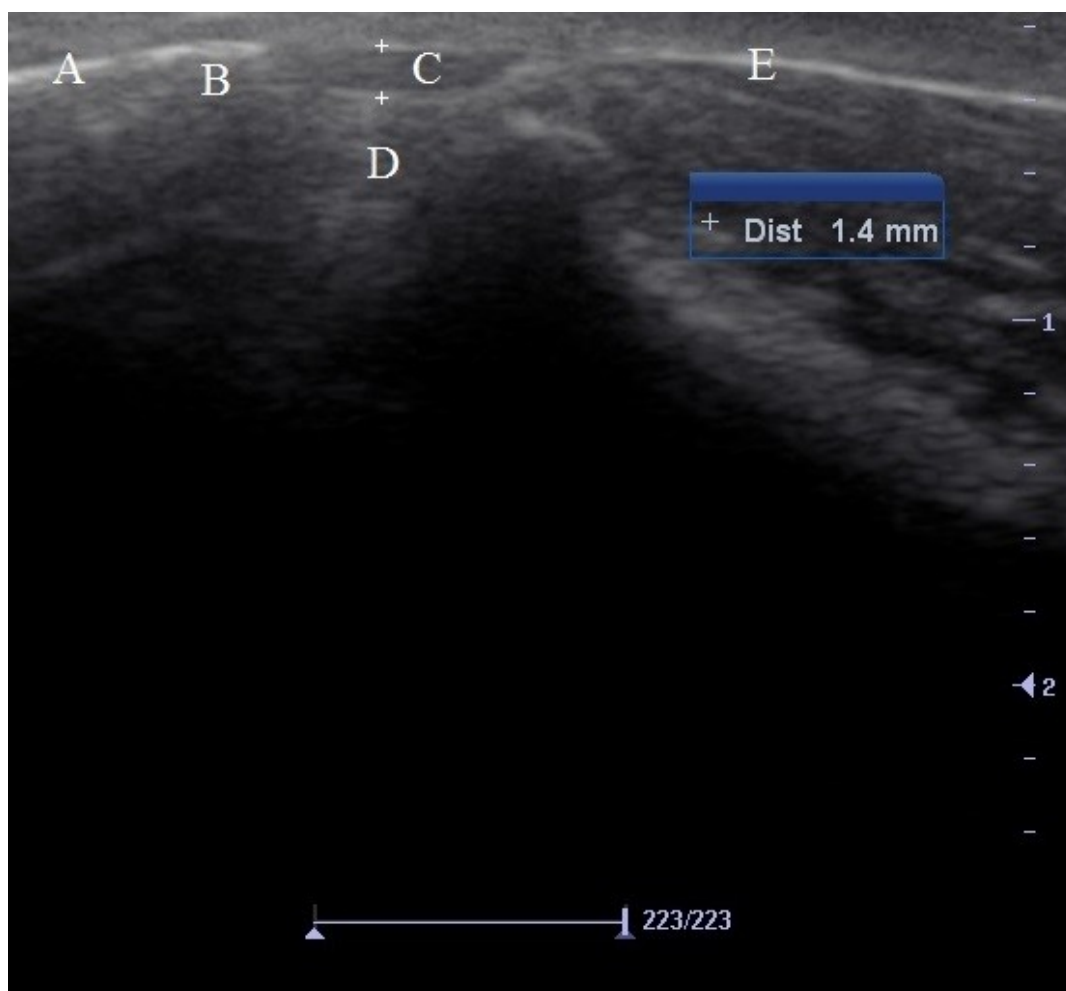


Figura 7. Imagem ultrassonográfica da articulação FTP saudável de coelho antes da secção do LCCr. A) côndilo femoral. B) Patela. C) ligamento patelar. D) espaço articular. E) superfície óssea da tibia.

5.4.1 Espessura da cartilagem e espaço do líquido sinovial

Na tabela 11 são apresentados os dados referentes à espessura da cartilagem e o espaço ocupado pelo líquido sinovial.

Tabela 11. Valores da média e do desvio padrão da espessura da cartilagem e espaço ocupado pelo líquido sinovial em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

ESPESURA DA CARTILAGEM E ESPAÇO OCUPADO PELO LÍQUIDO SINOVIAL (média e desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	0,48 ($\pm 0,16$) ^{aA}	0,48 ($\pm 0,10$) ^{aA}
M2	0,65 ($\pm 0,28$) ^{bA}	0,61 ($\pm 0,17$) ^{aA}
M3	0,54 ($\pm 0,13$) ^{abA}	0,52 ($\pm 0,04$) ^{aA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A figura 8 mostra as imagens ultrassonográficas referentes à espessura da cartilagem articular e o espaço do líquido sinovial dos coelhos do grupo controle no M2 e no M3 e a figura 9 representa as imagens ultrassonográficas do mesmo parâmetro nos coelhos do grupo CAP no M2 e no M3.

No grupo controle foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias de M1 e M2 (Tab. 11), porém sem diferença significativa entre M1 e M3 e entre M2 e M3.

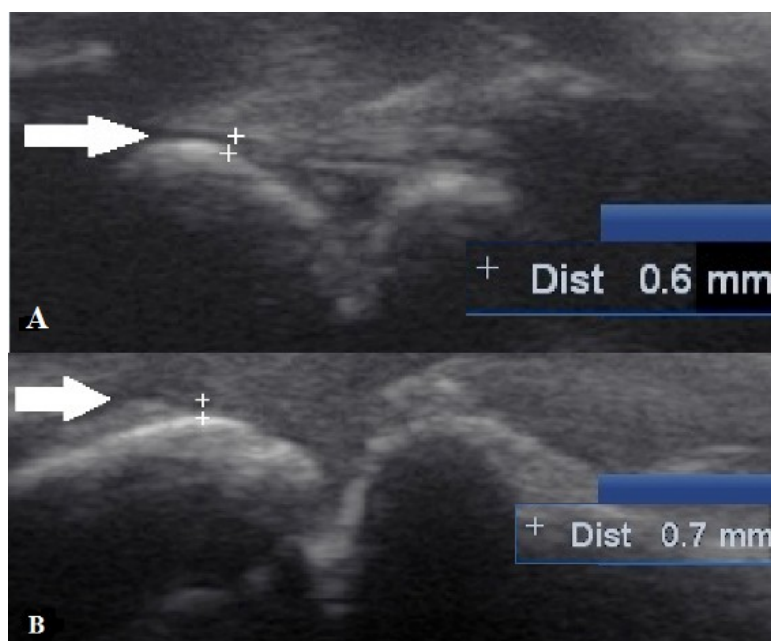


Figura 8. Imagem ultrassonográfica da articulação FTP de coelho do grupo controle no M2 e M3. A) M2.

21 dias após ruptura do LCCr. Espessura do espaço ocupado pela cartilagem articular e o líquido sinovial (seta branca e cruces). B) M3. 15 dias após estabilização articular. Espessura do espaço ocupado pela cartilagem articular e o líquido sinovial (seta branca e cruces).

Nos coelhos do grupo CAP não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos momentos avaliados. Observou-se padrão similar de comportamento em relação às médias dos coelhos do grupo controle, registrando discreta diminuição no M3, sem retorno aos valores iniciais.

Quando comparadas as médias de ambos os grupos, não se verificou diferença estatisticamente significativa no M3 (Tab. 11), provavelmente pelo curto período de tempo considerado para as análises.

O aumento no valor da média no M2 está relacionado com a instauração do processo degenerativo e conseqüente aumento na produção do líquido sinovial. Já no M3 a discreta redução no valor da média no grupo CAP em relação ao M2, se deve possivelmente a diminuição na produção do líquido sinovial (Fig. 9). Embora tenha sido registrada uma diminuição da média no M3, esta não alcançou os valores iniciais do M1.

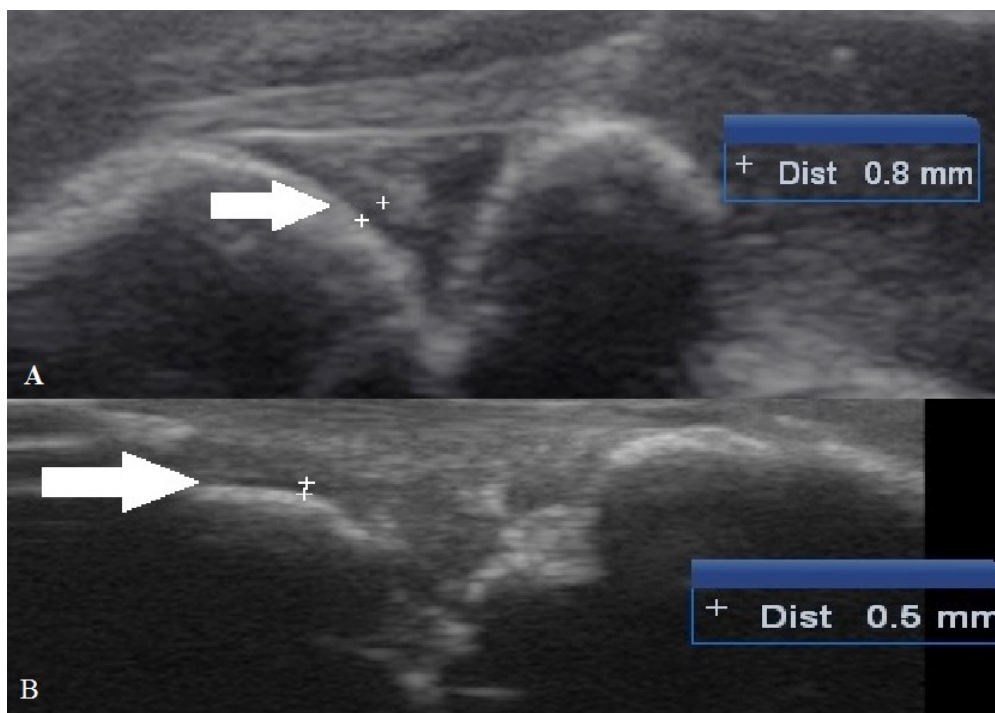


Figura 9. Imagem ultrassonográfica da articulação FTP de coelho do grupo CAP no M2 e M3. A) M2. 21 dias após ruptura do LCCr. Espessura do espaço ocupado pela cartilagem articular e o líquido sinovial (seta branca e cruces). B) M3. 15 dias após aplicação CAP. Espessura do espaço ocupado pela cartilagem articular e o líquido sinovial (seta branca e cruces).

Nos coelhos do grupo controle no M2 não foi registrada variação da média em relação ao M1. Em dois coelhos (28,57%) houve aumento nos valores da espessura da cartilagem e do espaço ocupado pelo líquido sinovial (Fig. 8), em quatro coelhos (57,14%) e diminuição do valor da média em um coelho (14,28%). Esses dados confirmam a presença de alterações nas estruturas articulares já no M2.

No mesmo momento, nos animais do grupo CAP, não foram evidenciadas alterações no valor da média em quatro animais (57,14%), enquanto em três (42,85%) registrou-se um aumento no valor da média da espessura da cartilagem e do espaço ocupado pelo líquido sinovial (Fig. 9). As diferenças observadas entre ambos os grupos, são provavelmente devidas à variação individual na resposta inflamatória e ao processo degenerativo, bem como a baixa sensibilidade da ultrassonografia para detectar alterações sutis intra-articulares.

No M3, no grupo controle, foi observado aumento no valor da média em três coelhos (42,85%), diminuição em outros três (42,85%) e em um (14,28%) foi registrado um valor da média igual ao M2. A média do grupo no M3, apresentou um valor menor em relação ao M2, que pode ser atribuída ao efeito favorável da estabilização articular.

Aos 15 dias após a estabilização articular (M3), verificou-se em ambos os grupos diminuição do valor da média da espessura da cartilagem e do espaço ocupado pelo líquido sinovial em relação ao M2 (Fig. 8 e 9). No grupo CAP esta redução foi maior, porém, os valores se mantiveram altos em relação ao valor inicial. Esta redução maior no grupo CAP se deve provavelmente ao efeito anti-inflamatório do CAP que reduz as enzimas degradativas da cartilagem articular (Schwartz et al., 2011; Sanz et al., 2006), sugerindo o efeito benéfico do CAP.

Após a instauração do processo degenerativo são observadas alterações cartilaginosas precoces mediadas pelas citocinas pró-inflamatórias, acompanhadas de um aumento na produção de líquido sinovial causado pela sinovite e pela degradação da MEC, (MacWilliams e Friedrichs., 2003; Doom et al., 2008), esta pode ser a razão do aumento no valor da média no M2 nos animais desta pesquisa.

As citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 e o FNT- α , aumentam a síntese das enzimas de degradação da MEC e diminuem a síntese de proteínas que formam a matriz (Doom et al., 2008; Bolon et al., 2004; Cheon et al., 2002). Essa alteração no mecanismo de renovação da cartilagem junto com a ação das enzimas degradativas, liberadas pelos condrócitos e sinoviócitos, contribuem para a degradação e adelgaçamento da cartilagem e a perda de matriz cartilaginosa (Vidotto et al., 2013; Doom et al., 2008; De Bruin et al., 2005; Irie et al., 2003). A diminuição na produção de líquido sinovial levou, provavelmente, à diminuição dos valores da média nesse parâmetro no M3.

O ultrassom permite a avaliação articular, inclusive de erosão e fibrilação da cartilagem (Guermazi et al., 2013), mas o tamanho reduzido da articulação FTP dos coelhos impede uma avaliação mais detalhada das estruturas intra-articulares bem como a visualização dos ligamentos cruzados cranial e caudal. A impossibilidade do ultrassom para diferenciar o líquido

sinovial da cartilagem articular impide uma avaliação mais acurada, fazendo desta, uma técnica menos sensível para a avaliação da OA. Essa dificuldade pode ter influenciado nos valores da média e nos resultados obtidos.

5.4.2 Espessura do ligamento patelar

Os valores da espessura do ligamento patelar em ambos os grupos nos diferentes momentos avaliados são apresentados na tabela 12 e as imagens da avaliação ultrassonográfica são apresentadas nas figuras 10 e 11.

Nos animais de ambos os grupos, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores das médias da espessura do ligamento patelar em nenhum dos tempos avaliados, embora tenha sido observado um aumento discreto da média no M2 em relação ao M1 (Tab. 12). No entanto, no M3, evidenciou-se discreta redução da média dessa variável quando comparado com o M2, mas sem alcançar os valores observados no M1 (Tab. 12).

Tabela 12. Valores da média e do desvio padrão da espessura do ligamento patelar em coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

ESPESSURA LIGAMENTO PATELAR (Média, desvio padrão)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M1	1,14 ($\pm 0,20$) ^{aA}	1,17 ($\pm 0,34$) ^{aA}
M2	1,44 ($\pm 0,33$) ^{aA}	1,44 ($\pm 0,23$) ^{aA}
M3	1,30 ($\pm 0,26$) ^{aA}	1,32 ($\pm 0,29$) ^{aA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No M2, cinco coelhos (71,42%) do grupo controle, mostraram aumento no valor da média da espessura do ligamento patelar, um (14,28%) mostrou redução do valor e em outro coelho (14,28%) manteve-se o valor da média em relação ao M1 (anexo Tab. 8.4.2). Já no M3, observou-se redução do valor da média em cinco animais (71,42%) e aumento no valor desse parâmetro (28,57%) nos dois restantes quando comparado com o M2.

Nos animais do grupo CAP, no M2, também em cinco coelhos (71,42%), houve aumento no valor da média da espessura do ligamento patelar, um animal (14,28%) apresentou diminuição no valor e no outro (14,28%) manteve-se o valor da média em relação ao M1 (Tab. 8.4.2), assim como observados nos coelhos do grupo controle.

No M3, quatro animais (57,14%) mostraram redução do valor da espessura do ligamento patelar, dois (28,57%), aumento no valor da média e em um coelho (14,28%) manteve-se o valor em relação ao M2 (Fig. 10).

No processo degenerativo há proliferação das vilosidades, presença de fibrina e cordões fibrosos na tentativa de estabilizar a articulação. O aumento na espessura do ligamento patelar no M2 é causado pelo processo inflamatório que leva à espessura dos tecidos intra e extra-articulares (Oliveira et al., 2009; Gnudi e Bertoni, 2001). Isto explica o aumento no valor da média nesse momento.

Durante o curso da OA a cápsula articular torna-se mais espessa com aumento da vascularização. Os sinoviócitos são uma fonte importante de citocinas e leucotrienos, os quais contribuem adicionalmente para as mudanças articulares atraindo células inflamatórias e liberando prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios. As articulações com OA mostram hipertrofia das vilosidades da sinóvia e aumento na quantidade de colágeno maduro e imaturo nos tecidos intra-articulares (Johnston, 1997; Baines, 1994), fato que pode contribuir para o aumento da espessura do ligamento patelar em ambos os grupos no M2.

O tamanho reduzido da articulação dos coelhos não permitiu a visualização dos ligamentos cruzados por meio da ultrassonografia, conforme descrito por Oliveira et al (2009), assim como também não foi possível evidenciar alterações como sinovite e hipertrofia sinovial visíveis através da ultrassonografia como áreas hipoeóicas anormais de tecido intra-articular (Guermazzi et al., 2013).

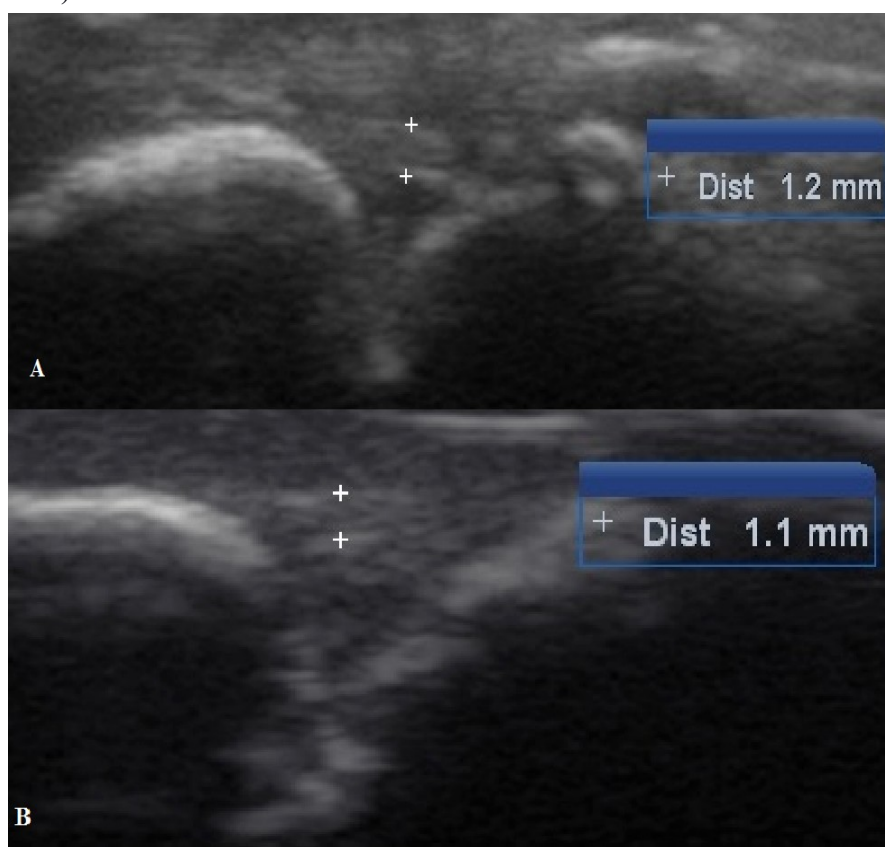


Figura 10. Imagem ultrassonográfica da espessura do ligamento patelar da articulação FTP de coelho do grupo controle no M2 e M3. A) M2. 21 dias após ruptura do LCCr. Espessura do ligamento patelar (cruzes). B) M3. 15 dias após aplicação de Ringer Lactato. Espessura do ligamento patelar (cruzes).

Não se verificou alterações da patela em nenhum dos grupos.

O exame ultrassonográfico é usado rotineiramente no homem e em eqüinos para avaliar diferentes alterações articulares e tendinosas (Flynn e Whitcomb, 2002; Cisneros, 2008). Em animais de companhia, a ultrassonografia articular é um método de diagnóstico ainda pouco utilizado. É um exame não invasivo e não utiliza radiação ionizante que permite a observação de estruturas intra-articulares (Muzzi et al. 2001; Schnappauf et al. 2001).

O ultrassom é também uma das opções mais utilizadas na avaliação de tecidos moles do membro torácico e pélvico como musculatura, tendões e ligamentos (Cisneros, 2008; Flynn e Whitcomb, 2002), bem como das superfícies articulares (Cisneros, 2008; Denoix, 1996). Apesar de ainda pouco utilizada para avaliação articular em pequenos animais a ultrassonografia permitiu avaliar a articulação FTP, suas principais estruturas e as mudanças progressivas que ocorreram durante o período de estudo, embora não tenham sido evidenciadas alterações significativas do processo degenerativo (Fig. 10 e 11), devido provavelmente, ao curto tempo de avaliação. O pequeno tamanho da articulação, também pode ter influenciado.



Figura 11. Imagem ultrassonográfica da articulação FTP de coelho do grupo CAP no M2 e no M3. A) M2. 21 dias após ruptura do LCCr. Espessura do ligamento patelar (cruzes). B) M3. 15 dias após aplicação de CAP. Espessura do ligamento patelar (cruzes).

Muzzi et al (2009) observaram alterações discretas nas superfícies ósseas 30 dias após a cirurgia de reparação do LCCr que progrediram para alterações moderadas ou acentuadas com a evolução do processo degenerativo. As alterações da superfície óssea são mais comumente observadas nas fases crônicas, o que justifica a ausência de achados semelhantes neste estudo.

Muzzi et al., (2001) relataram também a eficácia do exame ultrassonográfico na identificação precoce de osteófitos intra-articulares em relação ao exame radiográfico, diferente dos resultados nesta pesquisa. Possivelmente o tamanho da articulação tenha sido a causa

Embora o tempo de avaliação nesta pesquisa tenha sido curto, é possível através do exame ultrassonográfico identificar as principais estruturas que compõem a articulação FTP e observar alterações na cartilagem articular e no ligamento patelar decorrentes do processo degenerativo. Avaliações mais tardias são sugeridas.

5.5 Avaliação do líquido sinovial

A colheita do líquido sinovial no M1 só foi possível em três coelhos devido á pequena quantidade disponível na articulação saudável (0,1 ml). Posteriormente nos momentos M2 e M3 foram coletados de 0,1 a 0,9 ml de líquido sinovial.

Os resultados da avaliação macroscópica do líquido sinovial nos coelhos do grupo CAP e do grupo controle no M2 são apresentados na tabela 13 e o resultado da avaliação do líquido sinovial nos coelhos de ambos os grupos no M3 são apresentados na tabela 14. Os valores referentes ao volume coletado e à proteína nos coelhos de ambos os grupos, nos momentos avaliados são apresentados na tabela 15.

Os valores referentes à contagem celular total no líquido sinovial dos coelhos do grupo controle e do grupo CAP no M2 e M3 são apresentados na tabela 16 e os valores da contagem diferencial de ambos os grupos no M2 e M3 são apresentados na tabela 17. A colheita do líquido sinovial no momento M1 só foi possível em três coelhos devido à pequena quantidade disponível na articulação saudável (0,1 ml).

5.5.1 Avaliação macroscópica

No M2 o líquido sinovial coletado nos coelhos do grupo CAP foi em média 0,57 ml (Tab. 15). Quatro animais (57,14%) mostraram líquido sinovial ligeiramente avermelhado e três (42,86%) coloração palha (Tab. 13). Em quatro animais (57,14%) verificou-se viscosidade alta (>2 cm) e viscosidade média (entre 1 e 2 cm) em três (42,86%). Em todas elas o líquido apresentou-se ligeiramente turvo. O conteúdo de proteína foi em média 3,67 g/dL (valor normal: < 2,5g/dL). A tixotropia foi positiva em 71,42% das amostras (5/7) e negativa em 28,57% (2/7) . O teste de mucina foi bom em todas as amostras.

Tabela 13. Avaliação macroscópica do líquido sinovial de coelhos de ambos os grupos no M2.

CARACTERÍSTICAS DO LÍQUIDO SINOVIAL NO GRUPO CAP, M2					
CAP	Tixotropia	Viscosidade	Teste de mucina	Cor pré-centrifugação	Aspecto pré-centrifugação
Coelho 1	+	Alta	Bom	palha	Lig. turvo
Coelho 2	+	Alta	Bom	Lig. vermelho	Lig. turvo
Coelho 3	-	Media	Bom	palha	Lig. turvo
Coelho 4	+	Media	Bom	Lig. vermelho	Lig. turvo
Coelho 5	+	Alta	Bom	Palha	Lig. turvo
Coelho 6	-	Media	Bom	Lig. vermelho	Lig. turvo
Coelho 7	+	Alta	Bom	Lig. vermelho	Lig. turvo
Media	----	----	----	----	----
D. padrão	----	----	----	----	----
CARACTERÍSTICAS DO LÍQUIDO SINOVIAL NO GRUPO CONTROLE, M2					
CONTROLE	Tixotropia	Viscosidade	Teste de mucina	Cor pré-centrifugação	Aspecto pré-centrifugação
Coelho 1	+	Alta	Bom	Lig. Vermelho	Turva
Coelho 2	+	Media	Bom	Palha	Turva
Coelho 3	+	Alta	Bom	Lig. Vermelho	Turva
Coelho 4	-	Media	Bom	Palha	Turva
Coelho 5	-	Media	Bom	Lig. vermelho	Turva
Coelho 6	+	Alta	Bom	Lig. Vermelho	Turva
Coelho 7	+	Alta	Bom	Lig. Vermelho	Turva
Media	----	----	----	----	----
D. padrão	----	----	----	----	----

Nos coelhos do grupo controle no mesmo momento foram coletados em média 0,52 ml de líquido sinovial (Tab. 15). Cinco animais (71,42%) apresentaram coloração ligeiramente avermelhada e dois (28,58%), coloração palha. A viscosidade em 57,14% (4/7) das amostras foi alta (>2 cm) e em 42,86% (3/7), média (entre 1-2 cm). Todas as amostras analisadas mostraram aspecto turvo (Tab. 13). O conteúdo de proteína do líquido sinovial foi em média 3,87 g/dL (Tab. 15), a tixotropia foi positiva em 71,42% (5/7) das amostras e negativa em 28,57% (2/7) e o teste de mucina foi bom em todas as amostras.

Tabela 14. Avaliação macroscópica do líquido sinovial de coelhos de ambos os grupos no M3.

CARACTERÍSTICAS DO LÍQUIDO SINOVIAL NO GRUPO CAP, M3					
CAP	Tixotropia	Viscosidade	Teste de mucina	Cor pré-centrifugação	Aspecto pré-centrifugação
Coelho 1	+	Alta	Bom	Palha	Lig. Turvo
Coelho 2	+	Media	----	Lig. Vermelho	Turvo
Coelho 3	+	Alta	Bom	Palha	Lig. Turvo
Coelho 4	-	Media	Bom	Lig. Vermelho	Turvo
Coelho 5	-	Media	----	Palha	Turvo
Coelho 6	+	Media	----	Lig. Vermelho	Turvo
Coelho 7	+	Media	Bom	Lig. Vermelho	Turvo
Media	----	----	----	----	----

D. padrão	----	----	----	----	----
CARACTERÍSTICAS DO LÍQUIDO SINOVIAL NO GRUPO CONTROLE, M3					
CONTROLE	Tixotropia	Viscosidade	Teste de mucina	Cor pré-centrifugação	Aspecto pré-centrifugação
Coelho 1	-	Baixa	Ruim	Vermelho	Turvo
Coelho 2	+	Media	Bom	Lig. Vermelho	Turvo
Coelho 3	+	Media	Bom	Palha	Turvo
Coelho 4	-	Baixa	Ruim	Vermelho	Turvo
Coelho 5	+	Media	Ruim	Lig. Vermelho	Turvo
Coelho 6	+	Media	Bom	Palha	Turvo
Coelho 7	-	Baixa	Ruim	Vermelho	Turvo
Media	----	----	----	----	----
D. padrão	----	----	----	----	----

Nos coelhos do grupo CAP, no M3, houve redução no volume de líquido sinovial coletado, que foi em média 0,35 ml (Tab. 15). Quatro amostras (57,14%) apresentaram coloração ligeiramente avermelhada e três (42,85%) coloração palha (Tab. 14). Cinco amostras (71,42%) tinham aspecto turvo e viscosidade média (entre 1 a 2 cm). As outras duas amostras (28,58%) apresentaram aspecto ligeiramente turvo e viscosidade alta (>2 cm). Os níveis de proteína diminuíram quando comparados com o M2 com média de 3,01 g/dL (Tab. 15). A tixotropia foi positiva em cinco animais (71,42%) e negativa em dois (28,57%). O teste de mucina foi feito somente em quatro amostras, devido à pouca quantidade de líquido disponível e foi considerado bom em todas as amostras.

No grupo controle, no mesmo momento, foi também observada discreta redução no volume de líquido coletado, com média de 0,62 ml (Tab. 15). Três amostras (42,85%) mostraram coloração avermelhada, duas (28,57%), coloração ligeiramente avermelhada e as outras duas (28,57%) coloração palha (Tab. 14). Em quatro amostras (57,14%) a viscosidade foi média (entre 1 a 2 cm) e nas demais, baixa (< 1cm). O aspecto de todas as amostras foi turvo e os níveis de proteína foram de 3,80 g/dL, mais baixos em relação ao M2 (Tab. 15). A tixotropia foi positiva em quatro animais (57,14%) e negativa em três (42,85%). O teste de mucina foi bom em 57,14% das amostras e ruim em 42,85%.

Os animais do grupo CAP, entretanto, apresentavam melhor aspecto do líquido sinovial em relação à turbidez quando comparados com os coelhos do grupo controle (Tab. 14). Adicionalmente, verificou-se também, manutenção dos valores do M2 relativos à tixotropia, viscosidade e teste de mucina (Tabs. 13 e 14), diferente do observado no grupo controle, evidenciando a ação benéfica do CAP na articulação.

Tabela 15. Volume (ml) de líquido sinovial e níveis de proteína (g/dL) no líquido sinovial da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos acometidos pela OA no M2 e M3.

VOLUME (ml) DE LÍQUIDO SINOVIAL			PROTEÍNA (g/dL) NO LÍQUIDO SINOVIAL		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP		GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M2	0,52 (±0,16) ^{aA}	0,57 (±0,14) ^{aA}	M2	3,87 (±0,11) ^{aA}	3,67 (±0,28) ^{aA}
M3	0,62 (±0,13) ^{aA}	0,35 (±0,17) ^{bB}	M3	3,80 (±0,17) ^{aA}	3,01 (±0,16) ^{bB}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nos animais do grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias do volume de líquido sinovial entre M2 e M3, diferente do grupo CAP que mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre M2 e M3. A redução do volume do líquido sinovial sugere melhora da condição articular.

Quando comparados os valores das médias de ambos os grupos, verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos valores da média do volume no M3.

Em relação aos níveis de proteína presentes no líquido sinovial nos animais do grupo controle, não houve diferença significativa entre a média no M2 e M3, diferente ao grupo CAP, que mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o M2 e o M3.

Na comparação das médias entre os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de proteína no M2. No M3, entretanto, foi observada redução significativa no nível de proteína no grupo CAP em relação ao grupo controle.

Os achados em relação ao volume e aos níveis de proteína no líquido sinovial sugerem efeito benéfico do CAP evidenciado já em M3. O CAP intra-articular diminui a inflamação (Silva, 2012; Saito et al., 2009) o que tem efeito na permeabilidade dos vasos da membrana sinovial e influencia a produção de líquido sinovial (MacWilliams e Friedrichs, 2003).

Essas avaliações, entretanto, são subjetivas e são influenciadas por alguns fatores como a quantidade da amostra disponível para as análises, grau de diluição da amostra e processamento da mesma (Ellison, 1988). O líquido sinovial tem a capacidade de formar um gel, propriedade conhecida como tixotropismo e está associada com a viscosidade do líquido sinovial e o conteúdo de ácido hialurônico presente na amostra (MacWilliams e Friedrichs, 2003).

A efusão articular pode ser mediada pela lesão da cartilagem articular presente no processo articular degenerativo e pela sinovite causada pela instabilidade articular. Em resposta a uma lesão os condrócitos e os sinoviócitos liberam citocinas que causam vasodilatação dos capilares sinoviais levando a um aumento da permeabilidade vascular e extravasamento do fluido,

proteínas e células inflamatórias no espaço articular (MacWilliams e Friedrichs, 2003).

Os leucócitos e macrófagos no espaço articular induzem a liberação de enzimas degradativas que alteram a integridade das estruturas articulares (Blom et al., 2007). Neste estudo foi observado um aumento no nível das proteínas em ambos os grupos e do volume do líquido sinovial, conforme o descrito na literatura. O aumento do nível total de proteínas ocorre geralmente quando há inflamação e exsudação dos resíduos do metabolismo da MEC e das proteínas plasmáticas para o meio articular (MacWilliams e Friedrichs, 2003; Ratcliffe et al., 1998).

O processo de coleta do líquido sinovial pode influenciar o resultado e a interpretação dos mesmos. A hemodiluição da amostra pode ser devida à perfuração inadvertida de vasos sanguíneos, que pode alterar a contagem das células nucleadas e a contagem diferencial de células (MacWilliams e Friedrichs, 2003; Hardy e Wallace, 1974). O líquido sinovial avermelhado ou tingido de vermelho pode indicar hemorragia da articulação associada com traumas ou inflamação, assim como foi visto nesta pesquisa devido à ruptura do LCCR e ao processo inflamatório associado decorrente da OA. Para minimizar o efeito da hemodiluição o líquido sinovial pode ser colhido em seringa com heparina, como feito neste estudo

Algumas amostras do líquido sinovial mostraram coloração palha. Segundo MacWilliams e Friedrichs (2003) essa condição conhecida como xantocromia pode ser devida à presença de hemorragias prévias na articulação ou ao rompimento da hemoglobina. O aumento da turbidez do líquido sinovial em ambos os grupos, pode ser causado por partículas como eritrócitos, leucócitos ou fibrina (MacWilliams e Friedrichs, 2003).

O fluido sinovial em animais de estimação é normalmente de coloração transparente, viscoso, livre de debris e não coagula, sendo que líquidos alterados têm maior tendência a formar coágulo (MacWilliams e Friedrichs, 2003). A doença articular é caracterizada pelo aumento do volume do fluido sinovial que pode ser observado durante o exame físico como distensão articular. Nos coelhos do grupo controle, bem como no grupo tratado, observou-se no M2 aumento na produção de líquido sinovial decorrente das lesões ocasionadas pela instabilidade articular.

A viscosidade normal do líquido sinovial é determinada pela polimerização do ácido hialurônico. Ela é um indicador das propriedades de lubrificação do fluido, que pode estar diminuída por diferentes causas como baixa produção, em consequência de alterações da membrana sinovial ou por degradação do ácido hialurônico por bactérias ou células brancas (MacWilliams e Friedrichs, 2003). Em ambos os grupos deste estudo foi observada uma diminuição na viscosidade do líquido sinovial mais acentuada no grupo controle que se manteve até os 15 dias de avaliação pós-operatória. A viscosidade é avaliada visualmente colocando uma gota do fluido entre as pontas do dedo polegar e o indicador e afastando os dedos para medir a extensão do fio formado pelo líquido sinovial, que deve ter extensão mínima de 2 cm antes de sua ruptura.

O ácido hialurônico pode ser avaliado semiquantitativamente pelo teste da mucina (MacWilliams e Friedrichs, 2003; Ellison, 1988). O teste da mucina é um indicador semiquantitativo da quantidade de ácido hialurônico presente. A concentração adequada de ácido hialurônico é traduzida pela formação de um coágulo firme e viscoso (MacWilliams e Friedrichs, 2003). Nesta pesquisa a maioria das amostras apresentou coágulo firme, consistente com um teste de mucina bom, que indica um nível aceitável de ácido hialurônico no líquido sinovial de ambos os grupos no M2, que foi diminuindo no M3 principalmente nos coelhos do grupo controle, o que significa uma perda da qualidade do líquido sinovial causada pela OA.

Os resultados da análise do líquido sinovial na OA podem ser normais ou revelar alterações mínimas. Devido a vasodilatação, o volume do líquido sinovial e os níveis de proteína total podem estar ligeiramente aumentados. Adicionalmente, a diluição do ácido hialurônico pode ser moderada e a viscosidade pode estar normal ou ligeiramente diminuída. O coágulo de mucina pode permanecer normal, pois a diluição ou degradação do ácido hialurônico é mínima (MacWilliams e Friedrichs, 2003). Os achados encontrados nesta pesquisa são semelhantes ao descrito por Cameron et al., (1997) que observaram alterações discretas nas características do líquido sinovial do cão depois da ruptura do LCCr.

5.5.2 Avaliação microscópica e celular

Na avaliação microscópica e celular do líquido sinovial foram considerados o número total de células (Tab. 16) e o tipo de células presentes no fluido (contagem diferencial) no M2 e M3. Foram observados principalmente células como neutrófilos, macrófagos e sinoviócitos (Tab. 17).

Tabela 16. Valores da contagem celular total no líquido sinovial da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

CONTAGEM CELULAR TOTAL NO LÍQUIDO SINOVIAL (cél/s/ μ l)		
	GRUPO CONTROLE	GRUPO CAP
M2	1114,28 (\pm 682,95) ^{aA}	594,28 (\pm 583,14) ^{aA}
M3	1816,66 (\pm 719,49) ^{aA}	1161,42 (\pm 957,70) ^{aA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias da contagem celular total em M2 e em M3, em ambos os grupos.

No M3, no grupo controle, foi observado um aumento no número total de células presentes no líquido sinovial em cinco amostras (71,42%) e redução em uma (14,28%). Em um animal não foi possível a coleta do líquido sinovial (anexo Tab. 8.5.1).

No grupo CAP, verificou-se também aumento na contagem total de células no líquido sinovial

em quatro amostras (57,14%) e redução em três (42,85%). Apesar dos valores celulares relativamente menores em comparação aos animais do grupo controle, não foi verificada diferença significativa entre os grupos. Apesar disto, observou-se tendência de redução dos valores que pode ter sido influenciado pelos fatores de crescimento presentes no CAP que atuam no local afetado regulando a quimiotaxia, a migração celular, a proliferação e a diferenciação celular (Anitua et al., 2012; Lee et al., 2012; Iacopetti et al., 2012).

Conforme o relatado por Saito et al., (2009), quando o CAP é injetado diretamente no local afetado exerce um efeito local imediato, diminuindo a inflamação e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, modificando assim a quantidade e tipo de células encontradas no líquido sinovial, fato observado nesta pesquisa, no M3.

No grupo controle, não foi observada diferença estatisticamente significativa na contagem celular de neutrófilos e de sinoviócitos quando comparado o M2 com M3. Em relação aos macrófagos observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias no mesmo intervalo de tempo (Tab. 17).

Tabela 17. Valores da contagem celular diferencial no líquido sinovial da articulação FTP de coelhos de ambos os grupos no M2 e M3.

CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO LÍQUIDO SINOVIAL (%)						
	GRUPO CONTROLE			GRUPO CAP		
	Neutrófilos	Macrófagos	Sinoviócitos	Neutrófilos	Macrófagos	Sinoviócitos
M2	10 ($\pm 4,08$) ^{aA}	82,85 ($\pm 3,93$) ^{aA}	7,15 ($\pm 3,77$) ^{aA}	9,28 ($\pm 3,45$) ^{aA}	81,42 ($\pm 2,43$) ^{aA}	9,28 ($\pm 3,45$) ^{aA}
M3	12,5 ($\pm 2,73$) ^{aA}	80 ($\pm 2,88$) ^{bA}	7,5 ($\pm 4,18$) ^{aA}	10 ($\pm 4,08$) ^{aA}	82,14 ($\pm 2,67$) ^{aA}	7,85 ($\pm 3,93$) ^{aA}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nos animais do grupo CAP, não foi evidenciada diferença significativa nos valores da contagem de neutrófilos, macrófagos e sinoviócitos quando comparados os valores das médias no M2 e no M3 (Tab. 17).

Embora não tenha sido evidenciada diferença significativa, os valores de neutrófilos mostraram aumento discreto em ambos os grupos no M3, em relação ao M2, diferente dos valores de macrófagos, que mostraram discreta redução na contagem no grupo controle no M3 e discreto aumento nos valores no grupo CAP. Os sinoviócitos apresentaram discreto aumento em M3 no grupo controle e uma pequena redução no grupo CAP.

A análise do líquido sinovial é importante na rotina clínica pois pode propiciar informações como a natureza e a extensão das lesões intra-articulares, que associadas aos sinais clínicos e histórico auxilia no tratamento e no prognóstico (Fonseca et al., 2009; Bernabé et al., 2005).

Geralmente, na contagem celular total no líquido sinovial de articulações com ruptura do LCCr,

são encontrados valores celulares entre 250 a 3000 cels/ μ l (Borges et al., 1999), como observado nesta pesquisa, com predominância de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos) e algumas polimorfonucleares. Os resultados obtidos neste estudo estão dentro do esperado, segundo os relatos da literatura, sendo os macrófagos o tipo celular observado com mais frequência, acompanhados em menor porcentagem de neutrófilos.

Os tipos celulares encontrados no líquido sinovial foram macrófagos (80-82,8%) seguido dos neutrófilos (9,2-12,5%) e dos sinoviócitos (7,1-9,2%). Esses resultados encontram-se dentro do esperado na atual condição clínica. Borges et al., (1999), relataram a presença de neutrófilos e macrófagos no fluido sinovial como parte de uma resposta inflamatória inicial após da ruptura do LCCr

O aumento na contagem de neutrófilos em ambos os grupos no M3 encontra-se dentro dos valores esperados segundo o relatado por Fonseca et al., (2009) e Tatarunas et al., (2004). Esse aumento foi mais acentuado nos animais do grupo controle, possivelmente devido a uma resposta inflamatória mais acentuada nesses animais. Apesar de não haver diferença estatística significativa entre os grupos, observou-se tendência de redução desses valores no grupo CAP, provavelmente devido à ação anti-inflamatória dos fatores de crescimento, que regulam a migração e quimiotaxia celular, diminuindo a resposta inflamatória nos tecidos lesionados (Zhu et al., 2013).

Tatarunas et al., (2004) e Bernabe et al., (2005) relataram valores de neutrófilos não superiores a 10%, e Fonseca et al (2009) e Borges et al., (1999) relataram valores de macrófagos entre 65 e 90% em articulações de equinos e caninos respectivamente, acometidas por alterações articulares diversas. Os valores obtidos nesta pesquisa, estão nesta faixa.

Na contagem diferencial verificou-se nos valores de macrófagos tendências diferentes entre os grupos. No grupo controle houve diminuição no M3 e aumento discreto no grupo CAP.

Os macrófagos fagocitam agentes estranhos e debridam os tecidos lesionados na tentativa de limpar o local. A injeção intra-articular de CAP induz quimiotaxia dos macrófagos no local afetado e estimula a limpeza articular (Smith e Roukis, 2009) através dos fatores de crescimento. O aumento da contagem de macrófagos nos animais do grupo CAP provavelmente influenciou na melhoria clínica dos animais.

Os sinoviócitos são células constituintes da membrana sinovial e são encontrados em pequena quantidade no líquido sinovial (Borges et al., 1999). Nesta pesquisa os sinoviócitos constituíram menos del 10% de células em ambos os grupos, com aumento discreto no grupo controle no M3 e diminuição no grupo CAP.

Em articulações com OA a contagem de células nucleadas geralmente não excede a 5000 céls/ μ l, e os neutrófilos podem apresentar aumento discreto junto com os macrófagos e os sinoviócitos, dando características degenerativas à alteração articular. O aumento na contagem de células encontra-se geralmente, dentro dos limites considerados normais (Tatarunas et al.,

2004). Os sinoviócitos podem ter função fagocítica em articulações acometidas pela doença degenerativa e os neutrófilos e macrófagos têm papel importante no processo inflamatório inicial que ocorre imediatamente após da ruptura do LCCr.

5.6 Avaliação hematológica e do CAP

Os resultados da contagem celular no sangue total e no CAP no M2 e no M3 são apresentados nas tabelas 18 e 19 como média e desvio padrão. A figura 12 ilustra o CAP obtido após centrifugação do sangue total de coelhos. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o número de leucócitos, eritrócitos e plaquetas no sangue total e no CAP. O valor do MPV no CAP foi similar ao valor do sangue total, indicando a obtenção de plaquetas inativas depois da centrifugação.

Tabela 18. Valores da média e desvio padrão das variáveis hematológicas no sangue total e no CAP de coelhos do grupo CAP 21 dias após a ruptura do LCCr (M2).

Variável	Sangue total	CAP
WBC (celsx10³/μl)	6,16 (±1,53) ^a	0,39(±0,23) ^b
RBC (celsx10³/μl)	5,28 (±0,85) ^a	0,03(±0,01) ^b
PLT (fragmentosx10³/μl)	169,85 (±53,72) ^a	312,85(±78,43) ^b
LYM (celsx10³/μl)	2,70 (±0,35)	---
LYM %	43,97 (±26,24)	---
MID (celsx10³/μl)	0,36 (±0,04)	---
MID %	5,94 (±3,83)	---
GRA (celsx10³/μl)	3,08 (±0,65)	---
GRA %	50,10 (±25,41)	---
MPV (fl)	5,85 (±0,52) ^a	5,88(±0,31) ^a

WBC: leucócitos; RBC: eritrócitos; HGB: hemoglobina; PLT: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; LYM: linfócitos; MO: monócitos; GR: granulócitos; --- = valor não detectado pelo aparelho. ^{a,b}: Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$).

Tabela 19. Valores da média e desvio padrão das variáveis hematológicas no sangue total e no CAP de coelhos do grupo CAP 15 dias após a substituição do LCCr (M3).

Variável	Sangue total	CAP
WBC (celsx10³/μl)	6,27 (±3,41) ^a	0,30 (±0,11) ^b
RBC (celsx10³/μl)	4,80 (±0,80) ^a	0,03 (±0,01) ^b
PLT (fragmentosx10³/μl)	216,71 (±71,41) ^a	401,62 (±133,99) ^b
LYM (celsx10³/μl)	2,67 (±0,47)	---
LYM %	42,70 (±26,91)	---

MID (celsx10³/μl)	0,44 (±0,05)	---
MID %	6,62 (±2,48)	---
GRA (celsx10³/μl)	3,16 (±0,65)	---
GRA %	50,54 (±25,37)	---
MPV (fl)	5,54 (±0,62) ^a	5,97 (±0,40) ^a

WBC: leucócitos; RBC: eritrócitos; HGB: hemoglobina; PLT: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; LYM: linfócitos; MO: monócitos; GR: granulócitos; --- = valor não detectado pelo aparelho. ^{a,b}: Medias seguidas de letras distintas diferem significativamente (P<0,05).

O protocolo proposto por Silva (2012) e modificado nesta pesquisa, foi efetivo para concentrar plaquetas no sangue de coelhos. O aumento de um minuto no tempo de centrifugação foi suficiente para a obtenção do concentrado de plaquetas (Tab. 18 e 19) de aproximadamente 1,5 a 2,5 vezes os níveis basais do sangue total, com média de 1,8 vezes, esta concentração entretanto, foi considerada satisfatória para se obter efeito clínico. O CAP obtido neste estudo apresentou concentrações baixas de leucócitos (média: 0,35 células x 10³/μL), situando-se assim nos níveis desejados (Fig. 12).

Embora a literatura reporte que as concentrações ideais para se obter um efeito clínico usando preparações ricas em plaquetas seja de três a cinco vezes superiores às concentrações basais, neste estudo foi possível observar melhora clínica dos sintomas, diminuição da sensibilidade dolorosa e melhor uso do membro nos animais que receberam o CAP intra-articular com as concentrações de plaquetas obtidas.

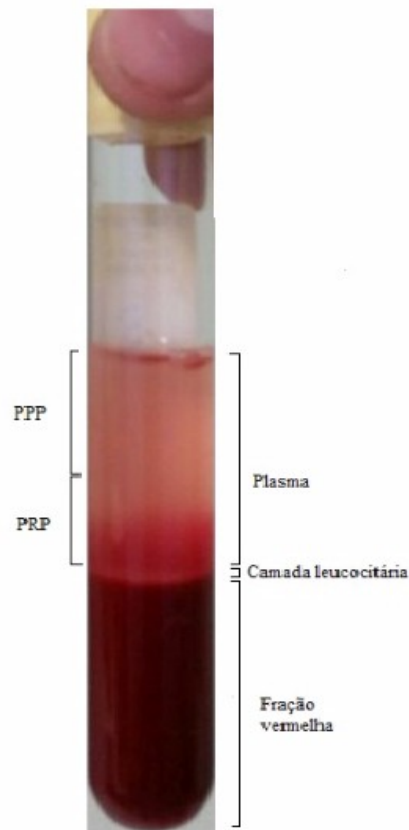


Figura 12. Concentrado Autólogo de Plaquetas obtido após centrifugação do sangue total dos coelhos do grupo CAP.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas contagens dos valores hematológicos no sangue total e no CAP para os parâmetros WBC, RBC e PLT (Tab 18 e 19). O CAP baseia-se no processo de concentração de plaquetas (Wasterlain et al., 2012) no plasma e este não elimina todas as outras células contidas no sangue total (Textor, 2011).

O baixo número de leucócitos é considerado fundamental para se obter um concentrado autólogo de qualidade e prevenir possíveis reações inflamatórias causadas pela presença em alto número desse tipo de células (Textor, 2011). Acredita-se entretanto, que sua presença em baixa concentração seja favorável como microbiostático (Carmona e Lopez, 2011; Ehrenfest et al. 2008). Outros pesquisadores relataram, que níveis baixos destas células poderia influenciar o efeito clínico e biológico do CAP devido à ação reguladora dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos sobre a cicatrização (Silva, 2012; Broughton II et al., 2006a).

São vários os fatores que interferem com a qualidade das plaquetas e estão diretamente

relacionados com a qualidade do CAP (Xie et al., 2013a; Weibrich et al., 2004; Matsuda et al., 1992). Dentre eles destacam-se o método empregado para obter o CAP, o tempo e a força da centrifugação (Tiwari e Bhargava, 2013). O método empregado neste estudo foi eficiente para separar as diferentes células do sangue, manter os leucócitos presentes em níveis baixos e obter plaquetas inativas e de qualidade, conforme relatado por Silva (2012), Silva et al., (2011a; 2011b) e Virchenko e Aspenberg (2006).

O concentrado deve conter plaquetas inativadas até o momento da aplicação, mas durante a centrifugação isto pode acontecer (Jennings, 2009), o que implica em mudanças morfológicas e no tamanho das plaquetas, alterando os valores do MPV (Vagdatli et al., 2010; Argüelles et al., 2006; Behnke e Forer, 1998). O MPV é portanto um indicador de ativação das plaquetas. Não foi observado aumento no valor do MPV no CAP em relação ao sangue total após a centrifugação. Pode-se deduzir que as amostras neste estudo não foram ativadas durante esse processo.

O CAP tem sido empregado como tratamento de lesões na cartilagem e em tendões ou como estimulador biológico para melhorar a neovascularização (Xie et al., 2013b) durante procedimentos cirúrgicos (Kon et al., 2012). Essa substância tem sido empregada isoladamente ou em combinação com auto-enxertos ósseos e outros biomateriais para estimular a regeneração óssea e a reparação tecidual (Lagunas, 2006). Nesta pesquisa, o CAP foi empregado como coadjuvante terapêutico após reparação do LCCr com a expectativa de controle do processo articular degenerativo e recuperação clínica precoce, observando resultados clinicamente favoráveis.

As plaquetas são as principais reguladoras da fase inflamatória e tem um papel fundamental na fase de proliferação e diferenciação. Após uma lesão elas são ativadas e desenvolvem um conjunto de respostas funcionais altamente especializadas que incluem a liberação de substâncias anti e pró-inflamatórias (Intini, 2009; Harrison, 2005). O CAP é uma fonte autóloga de plaquetas e fatores de crescimento com ampla variedade de ações biológicas (Carrasco et al., 2009; Mishra et al., 2009; Diegelmann e Evans, 2004). Os grânulos α liberam seu conteúdo unindo-se à membrana da plaqueta depois de sua ativação, alterando a superfície de área da plaqueta (Blair e Flaumenhaft, 2009). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que não houve ativação plaquetária durante o processo de concentração das plaquetas pelo método de centrifugação única, assim como demonstrado por Silva (2012).

O aumento das plaquetas e a manutenção dos valores do MPV indicam que o CAP pode ser empregado como uma fonte segura de fatores de crescimento e citocinas que auxiliam no controle do processo inflamatório e influenciam a evolução da OA. O CAP não produz efeito deletério quando aplicado corretamente, é seguro, diminuindo assim, os riscos que traz a aplicação de medicamentos para o controle do processo degenerativo (Clark, 2006; Lees et al., 2004).

5.7 Concentração do TGF-β1 e do PDGF no plasma

Os resultados da determinação dos fatores de crescimento TGF-β1 e PDGF nos momentos M1, M2 e M3 para ambos os grupos são apresentados nas tabelas 20 e 21. A figura 13 mostra as concentrações plasmáticas do TGF-β1 e a figura 14 as concentrações plasmáticas do PDGF. Duas amostras de cada grupo apresentaram hemólise, motivo pelo qual não foram consideradas no momento das análises.

Houve aumento progressivo discreto dos níveis do TGF-β1 em ambos os grupos, ligeiramente mais acentuado nos animais do grupo controle (Fig. 13). Este resultado pode estar relacionado com a resposta inflamatória presente em ambos os grupos.

No grupo controle foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas concentrações do TGF-β1 entre M1 e M2 e entre M1 e M3 (Fig. 13), porém não houve diferença significativa entre M2 e M3 (Tab. 20). No grupo CAP, entretanto, não se verificou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos momentos avaliados.

Quando comparados os grupos, também não se verificou diferença estatisticamente significativa nas concentrações do TGF-β1 (Tab. 20). Aparentemente a injeção intra-articular de CAP não tem influência nas concentrações de TGF-β1 no plasma.

As concentrações do PDGF nos diferentes tempos avaliados, não mostraram diferença estatisticamente significativa no grupo controle (Tab. 21). Entretanto no grupo CAP, ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas concentrações deste fator de crescimento entre M1 e M3, sem diferença significativa entre M1 e M2 e entre M2 e M3 (Fig. 14).

Na comparação entre os grupos, verificou-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na concentração do PDGF no M3 (Tab. 21).

Os níveis do PDGF no grupo CAP mostraram aumento progressivo até o M3 (Tab. 21). Este aumento pode ser devido à liberação deste fator de crescimento pelas plaquetas presentes no CAP após sua ativação.

Tabela 20. Valores da média e do desvio padrão dos níveis de TGF-β1 no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

Concentração plasmática do TGF-β1		
	Grupo controle	Grupo CAP
M1	153,66 (±20,88) ^{aa}	157,95 (±12,08) ^{aa}
M2	187,44 (±24,31) ^{ba}	158,12 (±21,59) ^{aa}
M3	196,31 (±16,18) ^{ba}	177,22 (±34,41) ^{aa}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{ab}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 21. Valores da média e desvio padrão dos níveis de PDGF no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3.

Concentração plasmática do PDGF		
	Grupo controle	Grupo CAP
M1	74,98 (\pm 43,07) ^{aA}	78,76 (\pm 15,83) ^{aA}
M2	81,17 (\pm 34,33) ^{aA}	124,26 (\pm 28,30) ^{abA}
M3	93,39 (\pm 26,60) ^{aA}	146,69 (\pm 47,38) ^{bb}

M1: momento 1; M2: momento 2; M3: momento 3; CAP: concentrado autólogo de plaquetas

^{a,b}: Letras minúsculas diferentes nas colunas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

^{A,B}: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

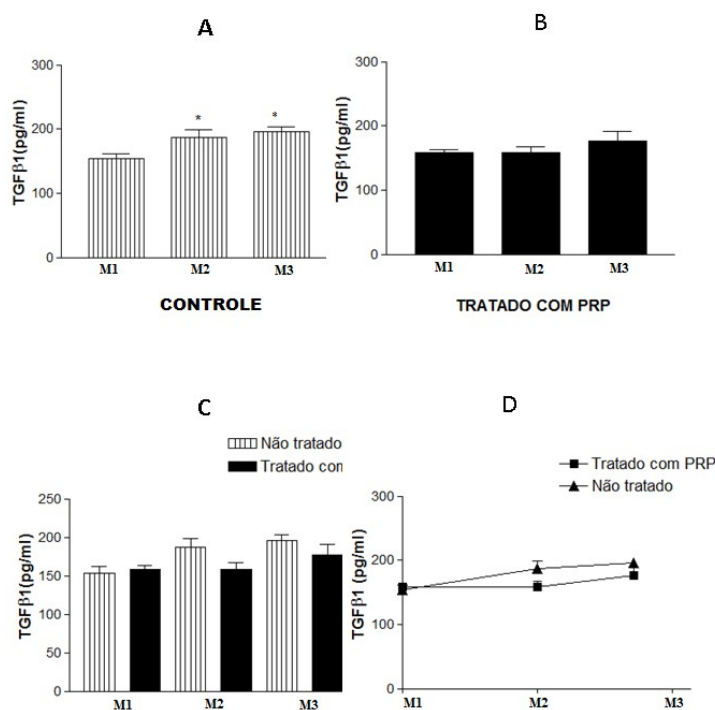


Figura 13. Concentração de TGF-β1 no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3. * $p < 0,05$ em relação ao M1. A: Valores médios da concentração do TGF-β1 no grupo controle. B: Valores médios da concentração do TGF-β1 no grupo CAP. C: Comparação das médias da concentração do TGF-β1 nos coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3. D: Comparação da variação das médias do TGF-β1 no M1, M2 e M3.

Acredita-se que a aplicação de CAP intra-articular induz aumento da concentração do PDGF no plasma devido ao estímulo bioquímico dos fatores de crescimento sobre as células locais e a degranulação plaquetária.

Os fatores de crescimento são proteínas pequenas secretadas no espaço intercelular e exercem papel fundamental como mediadores biológicos na regulação da migração, diferenciação, proliferação celular e equilíbrio da MEC (Sanchez et al., 2003; Kang e Kang, 1999; Pelletier et al., 1991). Eles se unem a receptores específicos de superfície das células para posteriormente ativar um segundo mensageiro que induz uma determinada resposta no núcleo (Garcia-Denche, 2006).

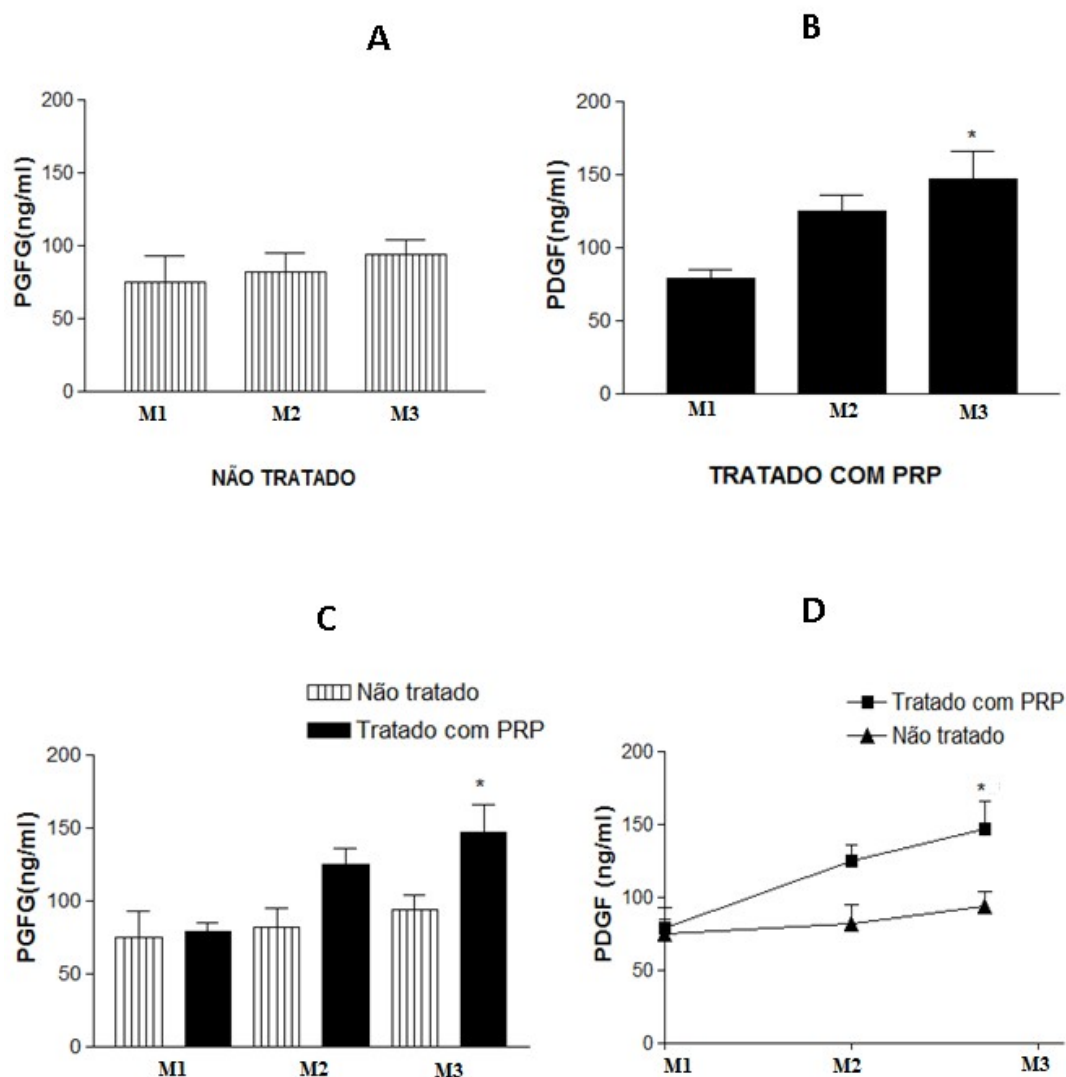


Figura 14. Concentração de PDGF no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3. * $p < 0,05$ em relação ao M1. A: Concentração média do PDGF no plasma de coelhos do grupo controle. B: Concentração média do PDGF no plasma de coelhos do grupo CAP. C: Comparação da concentração média do PDGF no plasma de coelhos de ambos os grupos no M1, M2 e M3. D: Comparação da variação das médias do PDGF no M1, M2 e M3.

A regeneração dos tecidos moles, de feridas e de ossos dependem da ação de diferentes componentes sanguíneos como a fibrina, a fibronectina, os fatores de crescimento, dentre outros e a presença dos fatores de crescimento em níveis elevados pode alterar ou acelerar esse processo (Schwartz et al., 2011; Hakimi et al., 2010; Broughton II et al., 2006b). Existem diferentes fatores de crescimento com ampla variedade de funções, dentre as quais se podem citar a angiogênese, a mitogênese e a remodelação da MEC (Schwartz et al., 2011; Bennett e Schultz, 1993; Basilico e Moscatelli, 1992). Portanto, espera-se algum efeito benéfico no controle das lesões articulares.

Os grânulos α das plaquetas contêm proteínas que influenciam a cicatrização das feridas (Flores et al., 2012) e tem sido proposto o uso de CAP para acelerar o processo de cicatrização retardada, reduzir o processo inflamatório, estimular a capacidade de regeneração tecidual e diminuir a atividade fibroblástica, minimizando a produção de tecido cicatricial não funcional (Lynch et al., 1987). As plaquetas têm um papel fundamental no processo de reparação tecidual devido à liberação de grande quantidade de fatores de crescimento que induzem angiogênese, a proliferação e diferenciação celular, a deposição de matriz extracelular e aumentam a quimiotaxia (Carmona e Lopez., 2011; Lynch et al., 1989).

Os fatores de crescimento, dentre eles TGF- β 1 e o PDGF apresentam diversas funções biológicas e influenciam o meio onde são aplicados estimulando a neovascularização e a diferenciação celular (Anitua et al., 2012; Carmona et al., 2011; Smith e Roukis, 2009; Riedel et al., 2007; Carmona, 2006). Assim, o aumento do PDGF no grupo CAP pode ter favorecido um processo inflamatório menos acentuado propiciando maior apoio do membro operado, bem-estar e conforto.

Segundo Marx (2004) a liberação dos fatores de crescimento pelas plaquetas inicia-se uma hora depois da ativação e segundo Lee et al (2012) alcança sua máxima intensidade 12 horas após, com liberação de aproximadamente 47% da totalidade desses fatores. O autor relata ainda que a liberação dos fatores de crescimento é mantida por aproximadamente sete dias após iniciada a ativação plaquetária. Estas afirmações conduzem a questionar o protocolo de aplicação quinzenal

Patel et al., (2013) e Milano et al., (2010) descreveram o efeito benéfico do CAP sobre as estruturas articulares, que resultou em melhor uso do membro e maior amplitude do movimento articular em animais acometidos pelo processo articular degenerativo.

Neste estudo o CAP foi uma fonte efetiva e segura de fatores de crescimento, conforme o relatado por Saito et al (2009), demonstrando mais uma vez suas vantagens sobre outras terapias por ser um produto autólogo e não produzir resposta imunológica ou efeito colateral indesejado.

O PDGF e o TGF- β 1 são os principais fatores de crescimento presentes no CAP e regulam o equilíbrio entre as citocinas e os fatores de crescimento para favorecer a recuperação dos tecidos lesionados (Kim et al., 2008; Niu e Rosen, 2005; Bourque et al, 1993). Os fatores de crescimento são produzidos também por outras células como os macrófagos e os linfócitos para

estimular a epitelialização e a angiogênese (Lawrence e Diegelmann, 1994). Petrigliano et al., (2006) recomenda estabelecer a concentração ideal e a quantidade de CAP a ser aplicada para se obter um resultado clinicamente aceitável.

No M3, no grupo controle, o processo degenerativo se mostrou clinicamente mais acentuado. A presença do TGF- β 1 em alto nível em articulações com artrite sugere que este fator de crescimento isolado ou em associação com outras citocinas têm importante papel como biomarcador da progressão de doenças articulares. Embora este fator de crescimento tenha propriedades anti-inflamatórias ele pode também promover inflamação articular (Cheon et al., 2002), caso haja um estímulo para isto.

Algumas pesquisas têm encontrado que o TGF- β 1 pode modular a expressão e liberação de citocinas inflamatórias (Sohn et al., 2012) como o FNT- α e a IL-1 e pode acelerar a hipertrofia sinovial, pois esse fator de crescimento induz proliferação dos fibroblastos (Derynck e Choy, 1998). A produção e atividade das metaloproteinasas são reguladas pelo TGF- β 1 (Hui et al., 2000; Johansson et al., 2000). Associando as informações clínicas obtidas e os níveis desse fator de crescimento no plasma pode-se explicar as alterações clínicas mais acentuadas nos coelhos do grupo controle no M3.

Estimuladas pelos sinoviócitos e os condrócitos (Rezende e Campos, 2013), as citocinas podem influenciar o resultado da resposta inflamatória perpetuando o processo inflamatório através das metaloproteinasas liberadas pelas células (Coughlan et al., 1998a; Coughlan et al., 1998b; Bonnet e Walsh, 2005). Algumas citocinas têm papel fundamental na inflamação articular e na degradação da cartilagem. Em pacientes com ruptura do LCCr ocorre um desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e as citocinas anti-inflamatórias que ocasiona lesão da cartilagem e conduz á AO (Doom et al., 2008; Cameron et al., 1997).

Segundo o relatado por Baksh et al (2013) depois da ativação e aplicação do CAP há um aumento nos níveis dos fatores de crescimento no local afetado. Nesta pesquisa observou-se no grupo CAP valores plasmáticos significativamente maiores do PDGF e valores não significativos do TGF- β 1 no M3.

Os AINES tem sido usados frequentemente em pacientes com OA, porém têm se mostrado ineficientes para tratar a doença articular degenerativa (Rezende e Gobbi, 2009). O CAP é indicado como alternativa terapêutica para lesões musculoesqueléticas em animais de companhia (Gobbi e Vitale, 2012; Civinini et al., 2011; Grageda, 2004; Bolander, 1992) devido ao estímulo da regeneração tecidual (Huang et al., 2008) e, como observado neste estudo, existe ação benéfica sobre a articulação traduzida pelo melhor desempenho clínico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O CAP tem ação benéfica sobre a doença articular degenerativa minimizando seus efeitos clínicos logo após a primeira aplicação.
- As técnicas diagnósticas de imagem são ferramentas auxiliares na identificação e caracterização da intensidade das lesões articulares e permitiram observar as alterações causadas pela OA.
- A dosagem dos fatores de crescimento PDGF e TGF- β 1, pode ser usada como marcadores biológicos para avaliar o processo degenerativo.
- O CAP tem efeito benéfico sobre as articulações acometidas pela OA, propicia a melhora da função do membro e pode ser indicado como terapia co-adjuvante ao tratamento da ruptura do LCCr.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANITUA, S.; PRADO, R.; SANCHEZ, M. *et al.* Platelet-rich plasma: preparation and formulation. *Oper Techn Orthopaedic*, v. 22, p. 25-32. 2012.
- 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. 81, p. 237-245. 2006.
- AYRAL, X. PICKERING, E.H.; WOODWORTH, T.G. *et al.* Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis e results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthr Cartilage*, v. 13, p. 361-367. 2005.
- BAKSH, N.; HANNON, C.P.; MURAWSKI, C.D. *et al.* Platelet-rich plasma in tendon models: a systematic review of basic science literature. *Arthroscopy*, v. 29, n. 3, p. 596-607. 2013.
- BAINES, S. Histopathological changes in synovial membrane in cranial cruciate ligament rupture. In: BSAVA Congress, n. 1, 1994, Birmingham, UK, p. 146.
- BARAÚNA Jr, D.; ROEHSIG, C.; ROCHA, L.B. *et al.* Técnica de interligação extracapsular fêmoro-fabelo-tibial na ruptura do ligamento cruzado cranial em cães: achados clínicos e radiográficos. *Cienc Rural*, v. 37, n. 3, p. 769-776. 2007.
- BASILICO, C.; MOSCATELLI D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*, v. 59, p. 115-165, 1992.
- BECKWEE, D.; VAES, P.; CNUUDE, M. *et al.* Osteoarthritis of the knee: Why does exercise work? A qualitative study of the literature. *Ageing Res Rev*, v. 12, n. 1, p. 226-236. 2013.
- BEHNKE, O.; FORER, A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eirr J Haematol*, v. 60, p. 3-24, 1998.
- BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am. J. Surg*, v. 165, n. 6, p. 728-737. 1993.
- BENNETT, D.; TENNANT, B.; LEWIS, D.G. *et al.* A reappraisal of anterior cruciate ligament disease in the dog. *J Small Anim Pract*, v. 29, n. 5, p. 275-297. 1988.
- BERNABÉ, P.A.; CATTELAN, J.W.; CADIOLI, F.A. *et al.* Características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial da bainha tendínea digital de equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 57, n. 3, p. 288-294. 2005.
- BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, v. 23, n. 4, p. 177-189. 2009.

- BLOM, A.B.; VAN LENT, P.L.; LIBREGTS, S. *et al.* Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum*, v. 56, n. 1, p. 147-157. 2007.
- BOLANDER, M.E. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 200, n. 2, p. 165-170. 1992.
- BOLON, B.; CAMPAGNUOLO, G.; ZHU, L. *et al.* Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha produce distinct, time-dependent patterns of acute arthritis in the rat knee. *Vet Pathol*, v. 41, n. 3, p. 235-243. 2004.
- BONNET, C.S.; WALSH, D.A. Osteoarthritis, angiogenesis, and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*, v. 44, n. 1, p. 7-16. 2005.
- BORGES, A.P.B; REZENDE, C.M.F; ASSIS, C.B. *et al.* Composição do líquido sinovial de cães com ruptura do ligamento cruzado cranial. *Cienc rural*, v. 29, n. 2, p. 285-289. 1999.
- BOSWELL, S.G.; COLE, B.J.; SUNDMAN, E.A. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*, v.28, n. 3, p. 429-439. 2012.
- BOURQUE, W.T.; GROSS, M.T.; HALL, B.K. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol*, v. 37, n. 4, p. 573-579. 1993.
- BRANDT, K.D. Pain, synovitis, and articular cartilage changes in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*, v.18, n.4, supl.2, p. 77-80. 1989.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*, v. 117, 7 Supl, p. 12S-32S. 2006a.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound Healing: An Overview. *Plas Reconstr Surg*, v. 117, 7 Supl, p. 1e-S-32e-S. 2006b.
- BUQUERA, L.E.; CANOLA, J.C.; PADILHA, J.G. *et al.* Radiografia e macroscopia do joelho após estabilização extra-articular utilizando fascia lata, fio de poliéster trançado ou fio de poliamida para correção da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães. *Cienc rural*, v. 32, n. 1, p. 73-78. 2002.
- CAMERON, M.; BUCHGRABER, A.; PASSLER, H. *et al.* The natural history of the anterior cruciate ligament-deficient knee. Changes in synovial fluid cytokine and keratan sulfate concentrations. *Am. J. Sports Med*, v. 25, n. 6, p. 751-754. 1997.
- CANAPP, D.A. Treating Canine Osteoarthritis. *Clinician's Brief*, p. 21-23. 2013.
- CANAPP Jr, S. O. The canine stifle. *Clin Tech Small Anim Pract*, v. 22, n. 4, p. 195-205. 2007.

- CARMONA, J.U. *Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse*. 2006, 100 f. Tese (Doutorado)_Faculdade de Medicina Veterinária, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Espanha.
- CARMONA, J.U.; 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, n. 4, p. 167-170. 2007.
- CARMONA, J.U.; LOPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. case report. *J Equine Vet Sci*, v. 31, n. 9, p. 506-510. 2011.
- CARMONA, J.U.; LOPEZ, C.; GIRALDO, C.E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermidades crônicas del aparato musculoesquelético equino. *Arch Med Vet*, v.43, n. 1, p. 1-10. 2011.
- CARRASCO, J. BONETE, D. GOMAR, R. Plasma rico en plaquetas vs. plasma rico em factores de crecimiento. *Rev Esp de Cir Ost*, v. 46, n. 239, p. 127-140. 2009.
- CARTER, S.D.; BARNES, A.; GILMORE, W.H. Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 69, p. 201-214. 1999.
- CHEON, H.; YU, S.J.; YOO, D.H. *et al.* Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF- β 1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clin Exp Immunol*, v. 127, n. 3, p. 547-552. 2002.
- CISNEROS, L.E. *Avaliação ultra-sonográfica da articulação do joelho em equinos da raça quarto de milha*. 2008, 39 f. Dissertação (Mestrado)_ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.
- CIVININI, R.; MACERA, A.; NISTRÌ, L. *et al.* The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*, v. 8, n.1, p. 25-31, 2011.
- CLARK, R.A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*, v.306, n. 1, p. 42-48,1993.
- CLARK, T.P. The clinical pharmacology of ciclooxigenase-2-selective and dual inhibitors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v. 36, n. 5, p. 1061-1085. 2006.
- CONCEIÇÃO, R.T.; RAHAL, S.C.; AGOSTINHO, F.S. *et al.* Goniometria dos membros torácicos e pélvicos de ovinos em duas faixas etárias. *Pesq. Vet. Bras*, v. 32, n. 8, p. 812-816. 2012.
- COUGHLAN, A.R.; ROBERTSON, D.H.L.; BENNETT, D.*et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis. *Vet Rec*, v. 143, n. 8, p. 219-223. 1998a.

- COUGHLAN, A.R.; ROBERTSON, D.H.L., BURKE, R. *et al.* Isolation and identification of canine matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *Vet Rec*, v. 155, n. 3, p. 231-237. 1998b.
- DE BRUIN, T.; DE ROOSTER, H.; VAN BREE, H. *et al.* Interleukin-8 mRNA expression in synovial fluid of canine stifle joints with osteoarthritis. *Vet Immunol and Immunopathol*, v. 108, n. 3-4, p. 387-397. 2005.
- DENOIX, J.M. Ultrasonographic examination in the diagnosis of joint disease. In: *Joint disease in the horse*, Editores (Eds): C. MCILWRAITH, G. TROTTER, W.B. SAUNDERS. Philadelphia, 1996, p. 165-202.
- DERYNCK, R.; CHOY, L. Transforming growth factor-beta and its receptors. In: THOMSON, A. *The cytokine handbook*. 3rd edn San Diego: Academic Press; 1998, p. 593-636.
- DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, v. 9, p. 283-289. 2004.
- DIEPPE, P.; CUSHNAGHAN, J.; YOUNG, P. *et al.* Prediction of progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Ann Rheum Dis*, v. 52, n. 8, p. 557-563. 1993.
- DOOM, M.; De BRUIN, T.; De ROOSTER, H. *et al.* Immunopathological mechanisms in dogs with rupture of the cranial cruciate ligament. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 125, n. 1-2, p. 143-161. 2008.
- DUNLOP, D.D.; SEMANIK, P.; SONG, J. *et al.* Moving to maintain function in knee osteoarthritis: evidence from the osteoarthritis initiative. *Arch Phys Med Rehabil*, v. 91, n. 5, p. 714-721. 2010.
- 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, n. 3, p. 158-167. 2008.
- ELLISON, R. The cytologic examination of synovial fluid. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, v. 3, n. 2, p. 133-139. 1988.
- FLORES, J.R.; GALLEGO, M.A.P.; GARCÍA-DENCHE, J.T. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev esp Cir Oral Maxilofac*, v. 34, n. 1, p. 8-17. 2012.
- FLYNN, K.A.; WHITCOMB, M.B. Equine meniscal injuries: a retrospective study of 14 horses. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract*, v. 48, p. 249-254, 2002.
- FONSECA, F.A.; ZAMBRANO, R.S.; DIAS, G.M.B. *et al.* Características físicoquímicas e

citológicas do líquido sinovial da articulação temporomandibular em equinos. *Pesq. Vet. Bras*, v. 29, n. 10, p. 829-833. 2009.

FRANKLIN, S.P.; PARK, R.D.; EGGER, E.L. Metacarpophalangeal and metatarsophalangeal osteoarthritis in 49 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, v. 45, n. 3, p. 112-117. 2009.

FROUM, S.J.; WALLACE, S.S. TARNOW, D.P. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v. 22, n. 1, p. 45-54. 2002.

GALE, N.W.; YANCOPOULOS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*, v. 13, n. 9, p. 1055–1066. 1999.

GAO, J. SYMONS, A.L.; BARTOLD M.P. Expression of transforming growth factor β receptors types II and III within various cells in the rat periodontium. *J Periodont Res*, v. 34, n. 2, p. 113-122. 1999.

GARCIA-DENCHE, J.T. *Influencia del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea: estudio densitométrico y morfométrico en calota de conejas osteoporóticas*. 2006. 189 f. Tese (Doutorado en Medicina)_ Facultad de Medicina, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid.

GARDNER, D.L. Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat*, v. 184, Pt. 3, 1994.

GNUDI, G.; BERTONI, G. Echografic examination of the stifle joint affected by cranial cruciate ligament rupture in the dog. *Vet. Radiol. Ultrasound*, v. 42, n. 3, p. 266-270. 2001.

GOBBI, G.; VITALE, M. Platelet-rich plasma preparations for biological therapy: applications and limits. *Oper Tech Orthop*, v. 22, n. 1, p. 10-15. 2012.

GOVONI, V.M. *Avaliação das articulações dos membros pélvicos de ovinos*. Botucatu, 2011. 20f. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP.

GRAGEDA, E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*, v. 13, n. 4, p. 301-309. 2004.

GUERMAZI, A.; HAYASHI, D.; ROEMER, F.W. *et al.* Osteoarthritis: a review of strengths and weaknesses of different imaging options. *Rheum. Dis. Clin. N. Am*, v. 39, n. 3, p. 567-591. 2013.

GUILAK, F.; RATCLIFFE, A.; LANE, N. *et al.* Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res*, v. 12, n. 4, p. 474-484. 1994.

- HARDY, R.; WALLACE, L. Arthrocentesis and synovial membrane biopsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v. 4, n. 2, p. 449-462. 1974.
- HARRISON, P. Platelet function analysis. *Blood reviews*, v. 19, n. 2, p. 111-123. 2005.
- HAKIMI, M.; JUNGBLUTH, P.; SAGER, M. *et al.* Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury, Int. J. Care Injured*, v. 41, n. 7, p. 717-723. 2010.
- HELDIN, C.H.; WESTERMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, v. 79, n. 4, p. 1283-1316, 1999.
- HENROTIN, Y.; MARTEL-PELLETIER, J.; MSIKA, P. *et al.* Usefulness of specific OA biomarkers, Coll2-1 and Coll2-1NO2, in the anterior cruciate ligament OA canine model. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 20, n. 7, p. 787-790. 2012.
- HUI, W.; ROWAN, A.D.; CAWSTON, T. Transforming growth factor beta1 blocks the release of collagen fragments from bovine nasal cartilage stimulated by oncostatin M in combination with IL-1alpha. *Cytokine*, v. 12, n. 6, p. 765-769. 2000.
- HUANG, T.F.; CHEN, Y.T.; YANG, T.H. *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human anterior cruciate ligament. *Cytotherapy*, v. 10, n. 8, p. 806-814. 2008.
- IACOPETTI, I.; PERAZZI, A.; FERRARI, V. *et al.* Application of Platelet-Rich Gel to Enhance Wound Healing in the Horse: A Case Report. *J Equine Vet Sci*, v.32, n. 3, p. 123-128. 2012.
- INNES, J. F.; BACON, D.; LYNCH, C. *et al.* Long-term outcome of surgery for dogs with cranial cruciate ligament deficiency. *Vet rec*, v. 147, n. 12, p. 325-328. 2000.
- INNES, J.F.; COSTELLO, M. BARR, M.J. Radiographic progression of osteoarthritis of the canine stifle joint: a prospective study. *Vet Rad Ultrasound*, v. 45, n. 2, p. 143-148. 2004.
- INTINI, G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*, v. 30, n. 28, p. 4956-4966. 2009.
- IRIE, K.; UCHIYAMA, E.; IWASO, H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee*, v. 10, n. 1, p. 93-96. 2003.
- JENNINGS, L.K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost*, v. 102, n. 2, p. 248-257. 2009.
- JOHANSSON, N.; ALA-AHO, R.; UITTO, V. *et al.* Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci*, v. 113, pt. 2, p. 227-235. 2000.

- JOHNSON, J.M.; JOHNSON, A.L. Cranial cruciate ligament rupture: pathogenesis, diagnosis and postoperative rehabilitation. *Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract*, v. 23, n. 4, p. 717-733. 1993.
- JOHNSTON, S. Osteoarthritis. *Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract*, v. 27, n. 4, 1997.
- KANG, H.J.; KANG, E.S. Ideal concentration of growth factors in rabbit's flexor tendon culture. *Yonsei Med J*, v. 40, n. 1, p. 26-29. 1999.
- KIM, J.H; PARK, C.; PARK, H.M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol*, v.20, n. 2, p. 123-126. 2008.
- KONTTINEN, Y.T.; SILLAT, T. BARRETO, G. *et al.* Osteoarthritis as an autoinflammatory disease caused by chondrocyte-mediated inflammatory responses. *Arthritis Rheum*, v. 64, n. 3, p. 613-616. 2012.
- KON, E.; FILARDO, G.; Di MATTEO, B. *et al.* Platelet-rich plasma in sports medicine: new treatment for tendon and cartilage lesions. *Oper Tech Orthop*, v, 22, n. 2, p. 78-85. 2012.
- KORVICK, D.L.; PIJANOWSKI, G.J. Three-dimensional kinematics of the intact and cranial cruciate ligament deficient stifle of dogs. *J Biomech*, v. 27, n. 1, p. 77-87. 1994.
- LAGUNAS, J.G. Plasma rico en plaquetas. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*, v. 28, n. 2, p. 89-99. 2006.
- LAVIGNE, P.; BENDERDOUR, M.; LAJEUNESSE, D. *et al.* Subchondral and trabecular bone metabolism regulation in canine experimental knee osteoarthritis. *OsteoArthritis Cartilage*. v.13, n. 4, p. 310-317. 2005.
- LAWRENCE, W.; DIEGELMANN, R. Growth factors in wound healing. *Clin. Dermatol*, v. 12, n. 1, p. 157-169. 1994.
- LEE, A.J.; CHUNG, W.H.; KIM, D.H. *et al.* Anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model using canine small intestinal submucosa and autologous platelet-rich plasma. *J Surg Res*, v. 178, n. 1, p. 206-215. 2012.
- LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J. *et al.* Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J Vet Pharmacol Ther*, v. 27, n. 6, p. 479-490. 2004.
- LIU, W.; BURTON-WURSTER, N.; GLANT, T.T. Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels. *J Orthop Res*, v. 21, n. 4, p. 730-737. 2003.

- LOUBOUTIN, H.; DEBARGE, R.; RICHO, J. *et al.* Osteoarthritis in patients with anterior cruciate ligament rupture: A review of risk factors. *Knee*, v. 16, n. 4, p. 239-244. 2009.
- LYNCH, S.E.; NIWON, J.C.; COLVIN, R.B. *et al.* Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc Nat Acad Sci USA*, v. 84, n. 21, p. 7696-7700. 1987.
- LYNCH, S.E.; WILLIAMS, R.C.; POLSON, A.M. *et al.* A combination of platelet derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*, v. 16, n. 8, p. 545-548. 1989.
- MaCWILLIAMS, P.S.; FRIEDRICH, K.R. Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. *Vet Clin North Am Small Anim*, v. 33, n. 1, p. 153-178. 2003.
- MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 62, n. 4, p. 489-496. 2004.
- MATEUS, F.J.V. *Ruptura do ligamento cruzado cranial no cão. Abordagem diagnóstica e resolução cirúrgica por osteotomia tripla da tíbia (TTO)*. 2010. 82f. Dissertação (Mestrado integrado em medicina veterinária)_ Escola de Veterinária. Escola Universitária Vasco da Gama. Coimbra.
- MATSUDA, N.; LIN, W.L.; KUMAR, N.M. *et al.* Mitogenic, chemostatic, synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol*, v. 63, n. 6, p. 515-25. 1992.
- MELO, E.G.; REZENDE, C.M.F.; GOMES, M.G. *et al.* Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa experimental em cães. Aspectos clínicos e radiológicos. *Arq Bras de Med Vet e Zootec*, v. 55, n. 1, p. 35-43. 2003.
- MENDONÇA, G.B.N. *Goniometria em cães de raça rottweiler*. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em ciência animal)_ Escola de Veterinária. Universidade Federal de Goiás. Goiás.
- MERCURI, L.G. Osteoarthritis, osteoarthrosis, and idiopathic condylar resorption. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am*, v. 20, n. 2, p. 169-183. 2008.
- MILANO, G.; SANNA PASSINO, E.; DERIU, L. *et al.* The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 18, n. 7, p. 971-980. 2010.
- MISHRA, A.; WOODALL, J.; VIEIRA, M. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med*, v. 28, n. 1, p. 113-125. 2009.
- MUZZI, L.A.L.; MUZZI, R.A.L., REZENDE, C.M.F. *et al.* Ultra-sonografia da articulação

fêmoro-tíbio-patelar em cães normais. *Cienc Animal*, v.11, p. 209. 2001.

MUZZI, L.A.L.; REZENDE, C.M.F.; MUZZI, R.A.L. Fisioterapia após substituição artroscópica do ligamento cruzado cranial em cães. I - avaliação clínica, radiográfica e ultrassonográfica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.61, n.4, p.805-814, 2009.

NIU, T.; ROSEN, C.J. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. **Gene.** v. 361, p. 38-56. 2005.

OLIVEIRA, R.R.; MAMPRIM, M.J.; RAHAL, S.C. *et al.* Radiografia e ultrassonografia no diagnóstico da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães. **Pesq. Vet. Bras.** v.29, n. 8, p. 661-665. 2009.

PATEL, S.; DHILLON, M.S.; AGGARWAL, S. *et al.* Treatment With Platelet-Rich plasma Is More Effective Than Placebo for Knee Osteoarthritis : A Prospective, Double-Blind, Randomized Trial. **The American Journal of Sports Medicine.** v. 41, n. 2, p. 356-364. 2013.

PELISSON, C. F.; TRAPP, S. M.; KEMPER, B. Estudo comparativo *in vitro* do movimento de gaveta em joelhos de caninos submetidos a duas técnicas extracapsulares de correção da instabilidade após ruptura do ligamento cruzado cranial. **Ciência Rural.** v. 40, n. 6, p. 1335-1340, 2010.

PELLETIER, J.P.; ROUGHLEY, P.J.; DiBATTISTA, J.A. *et al.* Are Cytokines Involved in Osteoarthritic Pathophysiology?. **Seminars in Arthdtis and Rheumatism.**v. 20, n. 6, Supl 2, p. 12-25. 1991.

PETRIGLIANO, F.P.; McALLISTER, D.R.; WU, B.M. Tissue engineering for anterior cruciate ligament reconstruction: A review of current strategies. **The Journal of Arthroscopic and Related Surgery.**v.22,n. 4,p. 441-451. 2006.

RATCLIFFE, A.; ISRAEL, H.A.; SAED-NEJAD, F. *et al.* Proteoglycans in the synovial fluid of the temporo-mandibular joint as an indicator of changes in cartilage metabolism during primary and secondary osteoarthritis. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 56, p. 204-208. 1998.

RAYWARD, R.M.; THOMSON, D.G.; DAVIES, J.V. Progression of osteoarthritis following TPLO surgery: a prospective radiographic study of 40 dogs. **Journal of Small Animal Practice.** v.45, p. 92-97. 2004.

REZENDE, C.M.F.; MELO, E. G.; MADUREIRA, N.G. *et al.* Artroscopia da articulação Fêmoro-tíbio-patelar de cão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 58, n. 5, p. 841-848, 2006.

REZENDE, M.Ud.; CAMPOS, G.Cd. A osteoartrite é uma doença mecânica ou inflamatória?. **Rev. Bras. Ortop.** v. 48, n. 6, p. 471-474. 2013.

REZENDE, U.M.; GOBBI, R.G. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho: drogas

modificadoras da doença. *Rev Bras Ortop*, v. 44, n. 1, p. 14-9, 2009.

RIBEIRO, A.S.C. *O uso de artroscopia no diagnóstico e tratamento da displasia do cotovelo canino*. 2011. 164f. Dissertação (Mestrado integrado em medicina veterinária)_ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

RIEDEL, K.; RIEDEL, F.; GOESSLER, U.R. *et al.* TGF-beta antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes in vitro. *Arch Med Res*, v. 38, n. 1, p. 45-51. 2007.

RYCHEL, J.K. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Top companion anim med*, v. 25, n. 1, p. 20-25. 2010.

SAITO, M.; TAKAHASHI, K.A.; ARAI, Y. *et al.* Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clin Exp Rheumatol*, v. 27, n. 2, p. 201-207. 2009.

SANCHEZ, M.; ANITUA, E.; ORIVE, G. *et al.* Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med*, v. 39, n. 5, p. 345-354. 2009.

SANCHEZ, M.; AZOFRA, J.; ANITUA, E. *et al.* Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*, v. 35, n. 10, p. 1648-1652. 2003.

SANZ, S.C.; BRUGES-ARMAS, J.; BEAUMONT-HERRERO, G. Importância do osso subcondral e da membrana sinovial na patogenia e no tratamento da osteoartrose. *Acta Reum. Port*, v. 31, p. 205-213. 2006.

SCHNAPPAUF, A.; MULLER, S.; GERWING, M. *et al.* Ultrasound of the canine stifle and its importance in cranial cruciate ligament rupture in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, v. 42, n. 4, p. 359-394. 2001.

SCHAWALDER, P.; GITTERLE, E. Eigene methoden zur operativen rekonstruktion bei rupturen des vorderen und hinteren kreuzbandes. *Kleintierpraxis*, v. 7, p. 323-330, 1989.

SCHWARTZ, A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; RE, L. Growth factors derived from platelet and its applications in regenerative medicine. Potential use of ozone as activator. *Rev Esp Ozonoter*, v. 1, n. 1, p. 54-73. 2011.

SILVA, R.F. *Caracterizações celular e ultra-estrutural do concentrado de plaquetas em cães e gatos e avaliação do seu efeito na osteoartrose em cães*. 2012. 88f. Tese (Doutorado em ciência animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SILVA, R.F.; ALVAREZ, M.E.; RIOS, D.L. *et al.* Evaluation of the effect of calcium gluconate and bovine thrombin on the temporal release of transforming growth factor beta 1 and platelet-

derived growth factor isoform BB from feline platelet concentrates. *BMC Vet Res*, v. 8, n. 212. 2012a.

SILVA, R.F.; CARMONA, J.U.; REZENDE, C.M.F. Comparison of the effect of calcium gluconate and batroxobin on the release of transforming growth factor beta 1 in canine platelet concentrates. *BMC Vet Res*, v. 8, n. 212, p. 121-127, 2012b.

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, n. 1, p. 95-98. 2011a.

SILVA, R.F; REZENDE, C.M.F; PAES-LEME, F.O. *et al.* Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular. *Arch Med Vet*, v. 43, n. 2, p. 187-190. 2011b.

SMITH, S.E.; ROUKIS, T.S. Bone and Wound Healing Augmentation with platelet-rich plasma. *Clin Podiatr Med Surg*, v. 26, n. 4, p. 559-588. 2009.

SOHN, D.H.; SOKOLOVE, J.; SHARPE, O. *et al.* Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor4. *Arthritis Res Ther*, v. 14, n. 1, p. R7. 2012.

STOCKWELL, R.A. Cartilage failure in osteoarthritis: relevance of normal structure and function. a review. *Clin Anat*, v. 4, n. 3, p. 161-191. 1991.

TASHMAN, S.; ANDERST, W.; KOLOWICH, P. *et al.* Kinematics of the ACL-deficient canine knee during gait: serial changes over two years. *J Orthop Res*, v. 22, n. 5, p. 931-941. 2004.

TATARUNAS, A.C. *Docentes da USP: estudo artroscópico das articulações do ombro e do joelho no cão.* 2004. 150 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de medicina veterinária y zootecnia, Universidad de São Paulo, São Paulo, SP.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. *et al.* Sinovite linfocítica plasmocítica associada à ruptura de ligamento cruzado cranial em um cão. *Cienc Rural*, v.36, n.1, p. 303-306. 2006.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; FRANCHINI, M.L. Análise de líquido sinovial em cães: revisão de literatura. *Rev. Educ. Contin. CRMV-SP*, v. 7, n. 1, p. 7-14. 2004.

TEXTOR, J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.27, n. 2, p. 275-298. 2011.

TIWARI, M.; BHARGAVA, R. Platelet rich plasma therapy: a comparative effective therapy with promising results in plantar fasciitis. *J Clin Orthop Trauma*, v. 4, n. 1, p. 31-35. 2013.

- VAGDATLI, E.; GOUNARI, E.; LAZARIDOU, E. *et al.* Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia*, v. 14, n. 1, p. 28-32, 2010.
- VIDOTTO, V.T.; Da ROCHA, R.T.; De PAIVA, C.L. *et al.* Estudo comparativo do uso de meloxicam por via intra-articular e sistêmica no controle da osteoartrite experimentalmente induzida em joelho de coelhos. *Rev Bras Ortop*, v. 48, n. 6, p. 524-531. 2013.
- VIRCHENKO, O.; ASPENBERG, P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop*, v. 77, n. 5, p. 806-812. 2006.
- WASTERLAIN, A.S.; BRAUN, H.J.; DRAGOO, J.L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop*, v. 22, n. 1, p. 33-42. 2012.
- WEIBRICH, G; HANSEN, T; KLEIS, W. *et al.* Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, v. 34, n. 4, p. 665-671. 2004.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.
- WESTACOTT, C.I.; SHARIF, M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?. *Semin Arthritis Rheum*, v. 25, n. 4, p. 254-272. 1996.
- WIDMER, W.R.; BUCKWALTER, K.A.; BRAUNSTEIN, E.M. *et al.* Radiographic and magnetic-resonance-imaging of the stifle joint in experimental osteoarthritis of dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, v. 35, n. 5, p. 371-383. 1994.
- XIE, X.; WU, H. ZHAO, S. *et al.* The effect of platelet-rich plasma on patterns of gene expression in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J Surg Res*, v. 180, n. 1, p.80-88. 2013a.
- XIE, X.; ZHAO, S.; WU, H. *et al.* Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J Surg Res*, v. 183, n. 1, p. 214-222. 2013b.
- YAMAGUCHI, R.; TERASHIMA, H.; YONEYAMA, S. Effects of Platelet-Rich Plasma on Intestinal Anastomotic Healing in Rats: PRP Concentration is a Key Factor. *J Surg Res*, v. 173, n. 2, p. 258-266. 2012.
- ZHU, Y.; YUAN, M.; MENG, H.Y. *et al.* Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 21, n. 1, p. 1627-1637. 2013.

8. ANEXOS

São listados a continuação os dados individuais de todas as avaliações nos três momentos dos coelhos do grupo controle e CAP.

8.1 Avaliação ortopédica

8.1.1 Apoio e posição do membro.

APOIO E POSIÇÃO DO MEMBRO OPERADO							
Coelhos CAP	M1	M2	M3	Coelhos controle	M1	M2	M3
Coelho 1	1	2	2	Coelho 1	1	2	3
Coelho 2	1	2	2	Coelho 2	1	2	3
Coelho 3	1	2	2	Coelho 3	1	2	4
Coelho 4	1	2	3	Coelho 4	1	2	3
Coelho 5	1	2	2	Coelho 5	1	2	2
Coelho 6	1	2	2	Coelho 6	1	2	4
Coelho 7	1	2	3	Coelho 7	1	2	3
Media	1	2	2,28	Media	1	2	3,14
D. padrão	0	0	0,48	D. padrão	0	0	0,69

8.1.2 Presença de crepitação.

PRESENÇA DE CREPITAÇÃO							
Coelhos CAP	M1	M2	M3	Coelhos controle	M1	M2	M3
Coelho 1	1	1	1	Coelho 1	1	1	1
Coelho 2	1	1	1	Coelho 2	1	2	3
Coelho 3	1	1	1	Coelho 3	1	1	1
Coelho 4	1	2	2	Coelho 4	1	1	1
Coelho 5	1	1	1	Coelho 5	1	1	1
Coelho 6	1	1	1	Coelho 6	1	1	1
Coelho 7	1	1	2	Coelho 7	1	1	2
Media	1	1,14	1,28	Media	1	1,14	1,71
D. padrão	0	0,37	0,48	D. padrão	0	0,48	0,89

8.1.3 Presença de sensibilidade dolorosa.

PRESENÇA DE SENSIBILIDADE DOLOROSA							
Coelhos CAP	M1	M2	M3	Coelhos controle	M1	M2	M3
Coelho 1	1	2	1	Coelho 1	1	2	3
Coelho 2	1	2	2	Coelho 2	1	2	3
Coelho 3	1	3	2	Coelho 3	1	2	3
Coelho 4	1	2	1	Coelho 4	1	3	3
Coelho 5	1	3	2	Coelho 5	1	2	3
Coelho 6	1	2	1	Coelho 6	1	2	2
Coelho 7	1	3	3	Coelho 7	1	3	3
Media	1	2,42	1,71	Media	1	2,28	2,85
D. padrão	0	0,53	0,75	D. padrão	0	0,48	0,37

8.1.4 Presença de efusão articular.

PRESENÇA DE EFUSÃO ARTICULAR							
Coelhos CAP	M1	M2	M3	Coelhos controle	M1	M2	M3
Coelho 1	0	1	1	Coelho 1	0	1	2
Coelho 2	0	1	1	Coelho 2	0	1	2
Coelho 3	0	1	1	Coelho 3	0	1	1
Coelho 4	0	1	1	Coelho 4	0	2	2
Coelho 5	0	2	1	Coelho 5	0	1	2
Coelho 6	0	1	1	Coelho 6	0	2	2
Coelho 7	0	2	1	Coelho 7	0	1	2
Media	0	1,28	1	Media	0	1,28	1,85
D. padrão	0	0,48	0	D. padrão	0	0,48	0,37

8.2 Avaliação goniométrica

8.2.1 Valores da goniometria nos coelhos do grupo CAP no M1, M2 e M3.

CAP	M1				M2				M3			
	MPD		MPE		MPD		MPE		MPD		MPE	
	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E
Coelho 1	40	144	38	150	36	145	32	154	35	133	43	153
Coelho 2	38	146	35	140	35	143	36	142	32	147	39	145
Coelho 3	40	149	37	158	36	142	39	156	32	146	42	141
Coelho 4	32	147	35	153	40	132	45	130	38	139	33	150
Coelho 5	37	158	40	144	42	161	36	156	44	165	34	158
Coelho 6	36	147	40	148	40	140	36	152	42	126	30	150
Coelho 7	35	146	29	154	38	165	35	158	42	155	33	155
Media	36,7	148,1	36,2	149,5	38,1	146,8	37,0	149,7	37,8	144,4	36,2	150,2
D. padrão	2,8	1,6	3,8	6,1	2,0	10,1	4,0	9,7	4,1	10,0	5,2	4,7

Controle	M1				M2				M3			
	MPD		MPE		MPD		MPE		MPD		MPE	
	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E
Coelho 1	36	150	42	145	38	146	39	152	40	142	36	150
Coelho 2	37	150	40	150	43	151	43	150	47	146	40	152
Coelho 3	36	149	35	151	39	151	32	150	42	139	36	142
Coelho 4	35	146	36	158	40	135	35	152	40	118	32	152
Coelho 5	36	145	40	144	39	140	38	148	37	133	32	149
Coelho 6	37	152	28	156	40	148	36	152	42	144	33	152
Coelho 7	36	150	34	145	38	145	35	150	42	140	41	158
Media	36,1	148,8	36,4	149,8	39,5	145,1	36,8	150,5	41,4	137,4	35,7	150,7
D. padrão	0,7	3,6	4,7	5,5	1,9	7,8	3,5	2,1	2,4	13,7	3,4	5,4

8.3 Avaliação radiográfica

8.3.1 Presença de osteófitos, efusão articular, esclerose subcondral e intensidade do processo degenerativo nos coelhos do grupo CAP no M2.

COELHOS CAP M2				
	OSTEÓFITOS	EFUSÃO ARTICULAR	ESCLEROSE SUBCONDAL	INTENSIDADE PROCESSO DEGENERATIVO
Coelho 1	3	1	0	1,33
Coelho 2	1	1	0	0,66
Coelho 3	1	1	0	0,66
Coelho 4	2	1	1	1,33
Coelho 5	1	1	1	1
Coelho 6	1	1	1	1
Coelho 7	1	1	0	0,66
Media	1,43	1	0,43	0,95
D. padrão	0,79	0,0	0,33	0,30

8.3.2 Presença de osteófitos, efusão articular, esclerose subcondral e intensidade do processo degenerativo nos coelhos do grupo controle no M2.

COELHOS CONTROLE M2				
	OSTEÓFITOS	EFUSÃO ARTICULAR	ESCLEROSE SUBCONDAL	INTENSIDADE PROCESSO DEGENERATIVO
Coelho 1	1	1	1	1
Coelho 2	2	1	0	1
Coelho 3	1	1	1	1
Coelho 4	2	1	1	1,33
Coelho 5	1	1	0	0,66
Coelho 6	2	1	1	1,33
Coelho 7	1	1	0	0,66
Media	1,43	1	0,57	1
D. padrão	0,53	0,0	0,53	0,27

8.3.3 Presença de osteófitos, efusão articular, esclerose subcondral e intensidade do processo degenerativo nos coelhos do grupo CAP no M3.

COELHOS CAP M3				
	OSTEÓFITOS	EFUSÃO ARTICULAR	ESCLEROSE SUBCONDAL	INTENSIDADE PROCESSO DEGENERATIVO
Coelho 1	3	1	1	1,66
Coelho 2	1	0	0	0,33
Coelho 3	3	1	1	1,66
Coelho 4	2	1	1	1,33
Coelho 5	1	1	1	1
Coelho 6	1	1	1	1
Coelho 7	1	1	0	0,66

Media	1,71	0,85	0,71	1,09
D. padrão	0,95	0,38	0,49	0,50

8.3.4 Presença de osteófitos, efusão articular, esclerose subcondral e intensidade do processo degenerativo nos coelhos do grupo controle no M3.

COELHOS CONTROLE M3				
	OSTEÓFITOS	EFUSÃO ARTICULAR	ESCLEROSE SUBCONDRA	INTENSIDADE PROCESSO DEGENERATIVO
Coelho 1	2	1	1	1,33
Coelho 2	3	1	1	1,66
Coelho 3	2	1	1	1,33
Coelho 4	3	1	1	1,66
Coelho 5	1	1	1	1
Coelho 6	3	1	1	1,66
Coelho 7	2	1	0	1
Media	2,29	1	0,86	1,38
D. padrão	0,76	0,0	0,38	0,30

8.4 Avaliação ultrassonográfica

8.4.1 Espessura em mm do espaço correspondente à cartilagem articular e ao líquido sinovial nos momentos M1, M2 e M3 nos grupos controle e CAP.

ESPESSURA DA CARTILAGEM ARTICULAR E DO ESPAÇO OCUPADO PELO LÍQUIDO SINOVIAL (mm) (média e desvio padrão)							
COELHOS CAP				COELHOS CONTROLE			
	M1	M2	M3		M1	M2	M3
Coelho 1	0,6	0,6	0,3	Coelho 1	0,7	0,5	0,6
Coelho 2	0,5	0,5	0,5	Coelho 2	0,5	1	0,6
Coelho 3	0,6	0,8	0,6	Coelho 3	0,6	0,6	0,4
Coelho 4	0,5	0,9	0,5	Coelho 4	0,4	1,1	0,6
Coelho 5	0,5	0,6	0,6	Coelho 5	0,2	0,3	0,3
Coelho 6	0,5	0,4	0,4	Coelho 6	0,6	0,6	0,7
Coelho 7	0,5	0,5	0,5	Coelho 7	0,4	0,5	0,6
Media	0,52	0,61	0,48	Media	0,48	0,65	0,54
D. padrão	0,04	0,17	0,10	D. padrão	0,16	0,28	0,13

8.4.2 Espessura em mm do ligamento patelar nos momentos M1, M2 e M3 nos grupos controle e CAP.

ESPESSURA DO LIGAMENTO PATELAR (mm) (média e desvio padrão)							
COELHOS CAP				COELHOS CONTROLE			
	M1	M2	M3		M1	M2	M3
Coelho 1	0,8	1,1	1	Coelho 1	0,9	1,6	1,1
Coelho 2	1,4	1,4	1,1	Coelho 2	0,9	1,9	1,7
Coelho 3	1,5	1,8	1,6	Coelho 3	1,2	1,2	1,1
Coelho 4	0,8	1,5	1,7	Coelho 4	1,4	1,8	1,2
Coelho 5	0,8	1,5	1,5	Coelho 5	1,1	1,1	1,5
Coelho 6	1,4	1,6	1	Coelho 6	1,1	1,1	1
Coelho 7	1,5	1,2	1,4	Coelho 7	1,4	1,4	1,5
Media	1,17	1,44	1,32	Media	1,14	1,44	1,3
D. padrão	0,34	0,23	0,29	D. padrão	0,20	0,33	0,26

8.5 Avaliação do líquido sinovial

8.5.1 Valores da contagem total e diferencial nos coelhos do grupo controle no M2 e no M3.

CONTAGEM CELULAR TOTAL E DIFERENCIAL GRUPO CONTROLE								
	Contagem total (células/μl)		Contagem diferencial (%)					
	M2	M3	M2			M3		
			Neutrófilo	Macrófago	Sinoviócito	Neutrófilo	Macrófago	Sinoviócito
Coelho 1	1875	2000	10	85	5	10	80	10
Coelho 2	1675	500	10	80	10	10	80	10
Coelho 3	650	---	15	80	5	---	---	---
Coelho 4	250	1900	5	85	10	15	80	5
Coelho 5	1325	2700	15	80	5	15	75	10
Coelho 6	1675	2000	5	80	10	10	80	10
Coelho 7	350	1800	10	90	0	15	85	0
Média	1114,28	1816,66	10	82,85	6,42	12,5	80	7,5
D. padrão	682,95	719,49	4,08	3,93	3,77	2,73	2,88	4,18

8.5.2 Valores da contagem total e diferencial nos coelhos do grupo CAP no M2 e no M3.

CONTAGEM CELULAR TOTAL E DIFERENCIAL GRUPO CAP								
	Contagem total (células/ μ l)		Contagem diferencial (%)					
	M2	M3	M2			M3		
			Neutrófilo	Macrófago	Sinoviócito	Neutrófilo	Macrófago	Sinoviócito
Coelho 1	250	150	5	85	10	5	85	10
Coelho 2	100	150	10	80	10	10	80	10
Coelho 3	1500	1000	5	80	15	15	80	5
Coelho 4	1375	1275	10	80	10	5	80	15
Coelho 5	275	3000	10	85	5	10	85	5
Coelho 6	385	1200	15	80	5	10	85	5
Coelho 7	275	1355	10	80	10	15	80	5
Média	594,28	1161,42	9,28	81,42	9,28	10	82,14	7,85
D. padrão	583,14	957,70	3,45	2,43	3,45	4,08	2,67	3,93

8.6 Avaliação hematológica e do CAP

8.6.1 Contagem hematológica no sangue total e no CAP de coelhos portadores de OA da articulação FTP aos 21 dias após a ruptura do LCCr (M2).

VALORES BASAIS NO SANGUE TOTAL DE COELHOS TRATADOS COM CAP, M2									
	WBC	RBC	HGB	PLT	MCV	MPV	%LYM	%MI	%GR
Coelho 1	4,47	6,02	11,40	246,00	57,00	6,30	55,60	4,00	40,40
Coelho 2	5,73	6,50	12,70	222,00	59,00	6,30	51,70	13,30	35,00
Coelho 3	6,76	5,72	12,00	100,00	59,00	6,30	71,80	1,40	26,80
Coelho 4	7,22	4,50	5,70	141,00	65,00	6,20	72,00	3,50	24,50
Coelho 5	8,46	5,20	10,70	178,00	58,00	5,20	27,90	6,10	66,00
Coelho 6	6,40	4,96	6,70	185,00	56,00	5,30	0,80	5,50	93,70
Coelho 7	4,08	4,09	7,20	117,00	56,00	5,40	28,00	7,80	64,30
Média	6,16	5,28	9,48	169,85	58,57	5,85	43,97	5,94	50,10
D. padrão	1,53	0,85	2,86	53,72	3,10	0,52	26,24	3,83	25,41

VALORES CELULARES NO CAP, M2									
	WBC	RBC	HGB	PLT	MCV	MPV	%LYM	%MI	%GR
Coelho 1	0,35	0,02	0,10	379,00	61,00	6,20	***	***	***
Coelho 2	0,13	0,01	0,10	385,00	62,00	5,80	***	***	***
Coelho 3	0,67	0,04	0,10	217,00	63,00	6,20	***	***	***
Coelho 4	0,56	0,05	0,10	241,00	65,00	6,20	***	***	***
Coelho 5	0,54	0,04	0,20	393,33	65,33	5,53	***	***	***
Coelho 6	0,04	0,02	0,01	338,33	56,00	5,50	***	***	***
Coelho 7	0,50	0,053	0,16	236,33	57,66	5,73	***	***	***

Média	0,39	0,03	0,11	312,85	61,42	5,88	***	***	***
D. padrão	0,23	0,01	0,05	78,43	3,52	0,31	***	***	***

8.6.3 Contagem hematológica no sangue total e no CAP de coelhos portadores de OA da articulação FTP aos 15 dias após a substituição do LCCr (M3).

VALORES BASAIS NO SANGUE TOTAL DE COELHOS TRATADOS COM CAP M3									
	WBC	RBC	HGB	PLT	MCV	MPV	%LYM	%MI	%GR
Coelho 1	1,65	3,35	5,80	120,00	58,00	5,90	64,40	8,50	27,10
Coelho 2	4,03	5,32	4,90	280,00	61,00	5,80	40,70	8,00	50,30
Coelho 3	4,06	5,10	6,10	189,00	64,00	6,10	78,00	4,00	18,00
Coelho 4	8,83	4,76	9,20	217,00	60,00	5,50	55,80	3,80	40,50
Coelho 5	7,54	5,78	9,60	198,00	61,00	6,00	42,50	4,50	53,00
Coelho 6	5,99	5,10	8,20	176,00	53,00	5,20	17,40	7,60	75,00
Coelho 7	11,80	4,20	6,30	337,00	50,00	4,30	0,10	10,00	89,90
Média	6,27	4,80	7,15	216,71	58,14	5,54	42,70	6,62	50,54
D. padrão	3,41	0,80	1,82	71,41	4,94	0,62	26,91	2,48	25,37

VALORES CELULARES NO CAP, M3									
	WBC	RBC	HGB	PLT	MCV	MPV	%LYM	%MI	%GR
Coelho 1	0,22	0,02	0,10	185,00	59,00	6,00	***	***	***
Coelho 2	0,11	0,01	0,10	557,00	55,00	5,90	***	***	***
Coelho 3	0,25	0,03	0,20	317,00	67,00	6,70	***	***	***
Coelho 4	0,95	0,13	0,30	509,00	59,00	5,80	***	***	***
Coelho 5	0,45	0,03	0,10	395,40	64,90	6,10	***	***	***
Coelho 6	0,1	0,01	0,10	332,00	57,00	5,50	***	***	***
Coelho 7	0,03	0,03	0,10	516,00	46,00	5,80	***	***	***
Média	0,30	0,03	0,14	401,62	58,27	5,97	***	***	***
D. padrão	0,31	0,04	0,07	133,99	6,88	0,40	***	***	***

8.7 Avaliação fatores de crescimento

8.7.1 Valores dos níveis de TGF- β 1 no plasma de coelhos do grupo CAP e controle nos momentos M1, M2 e M3.

	GRUPO CAP				GRUPO CONTROLE		
	M1	M2	M3		M1	M2	M3
Coelho 1	164,79	177,50	191,63	Coelho 1	152,93	190,78	222,41
Coelho 2	154,06	164,51	118,47	Coelho 2	157,45	216,77	201,51
Coelho 3	172,70	137,11	206,88	Coelho 3	137,11	158,01	184,85
Coelho 4	157,73	178,07	177,78	Coelho 4	186,54	203,49	184,00
Coelho 5	140,50	133,44	191,34	Coelho 5	134,29	168,18	188,80
Média	157,96	158,13	177,22	Média	153,66	187,45	196,31
D. padrão	12,08	21,59	34,41	D. padrão	20,88	24,31	16,18

8.7.2 Valores dos níveis de PDGF no plasma de coelhos do grupo CAP controle nos momentos M1, M2 e M3.

	GRUPO CAP			Coelho	GRUPO CONTROLE		
	M1	M2	M3		M1	M2	M3
Coelho 1	93,47	142,91	122,41	Coelho 1	35,59	38,81	110,76
Coelho 2	60,11	116,79	144,92	Coelho 2	42,02	58,90	99,90
Coelho 3	78,60	163,41	101,91	Coelho 3	113,97	101,51	73,78
Coelho 4	66,14	100,31	226,12	Coelho 4	54,89	126,03	123,62
Coelho 5	95,48	97,89	138,09	Coelho 5	128,44	80,61	58,90
Média	78,76	124,26	146,69	Média	74,98	81,17	93,39
D. padrão	15,83	28,30	47,38	D. padrão	43,07	34,33	26,60