ANA PAULA LOPES DE MORAES

# Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos

São Paulo
2013

**Universidade de São Paulo**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**

**ANA PAULA LOPES DE MORAES**

# Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos

**São Paulo**

**2013**

ANA PAULA LOPES DE MORAES

# Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:
Profa Dra Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
4/6/13

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO**

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2792
FMVZ

Moraes, Ana Paula Lopes de
Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos / Ana Paula Lopes de Moraes. -- 2013.
130 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Plasma rico em plaquetas. 2. Equinos. 3. Articulação. 4. Ultrassonografia. 5. Condroitim sulfato. I. Título.

# CERTIFICADO BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação clínica e ultrassonográfica do uso de plasma rico em plaquetas em articulações de equinos sadios", protocolado sob o nº 2264/2011, utilizando 6 (seis) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Clinical and ultrasound evaluation of the use of platelet rich plasma in horses healthy joints", protocol number 2264/2011, utilizing 6 (six) horses, under the responsibility Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MORAES, Ana Paula Lopes

Título: **Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___ / ___ / ___

Banca examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

**Epígrafe**

A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.

A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...

TUDO BEM!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...
é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.

Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.

*Chico Xavier*

**Agradecimentos**

... aos meus pais, Paulo e Graciete, por permitirem que eu realize meus sonhos e cumpra meus objetivos, se dedicarem tanto aos filhos, batalharem pelo nosso futuro e apoiarem meus estudos e meu trabalho;

... à minha professora e orientadora Raquel Baccarin por esses oito anos de ensinamento, paciência e companheirismo;

... aos meus irmãos, por dividirem meus momentos de angústias e desespero e partilharem de momentos alegres, à minha cunhada Larissa pela ajuda na correção;

... ao Tiago, por ter uma paciência imensurável, palavras de incentivo e carinho nos meus momentos de desespero, companheirismo e compreensão;

... ao Neco e a Nidi, por me fazerem adentrar ao mundo da veterinária;

... à FMVZ-USP pela oportunidade de realização desse trabalho;

... à Juliana e Dayane, pela amizade e ajuda na execução desse trabalho, palavras de incentivo e companheirismo;

... às meninas do laboratório Maria Helena, Samantha, Mau, Dinha, Carmen, Clara, por toda ajuda e boas conversas;

... aos colegas e amigos da pós-graduação, por toda ajuda na realização desse trabalho;

... aos enfermeiros Cícero e Marquinhos, aos tratadores Gervásio e Rosendo, aos residentes e estagiários da FMVZ-USP pela contribuição com meu trabalho;

... à Thaís, Dra Yara, prof Cristina Massoco pela atuação direta no experimento, auxiliando nos momentos de dúvida e na realização deste;

... às minhas amigas hipiatras, Sakê e Manguaça, que me fizeram insistir na realização desse sonho;

... a querida Tamie, pela ajuda na execução do trabalho, e pela diversão garantida;

... ao professor Wilson, pelas palavras de conforto e incentivo;

... ao professor Stefano e ao Cazé pelo companheirismo e por me apresentarem à ultrassonografia;

... a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização dessa dissertação;

... aos cavalos que participaram desse projeto, em especial ao Rudolph e à Tiffany, bondosas almas que tornaram a realização desse trabalho muito mais prazerosa!

# RESUMO

MORAES, A. P. L. **Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos.** [Responses to intrarticular platelet-rich plasma use in normal horses: clinical, laboratorial and ultrasonographic findings]. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os hemoderivados estão recebendo grande enfoque no tratamento de doenças articulares em equinos. O uso de plasma rico em plaquetas (PRP) é suportado pela grande quantidade de fatores de crescimento liberados. Esses fatores de crescimento são liberados quando as plaquetas são ativadas e os grânulos α sofrem degranulação. Além dos grânulos α, as plaquetas também liberam fatores de coagulação e outras glicoproteínas que interferem nos processos inflamatórios, aumentando as quantidades de interleucina e quimiocinas; grânulos densos liberam adenosina difostato, adenosina trifosfato, cálcio, histamina, serotonina e dopamina, que participam da homeostase tecidual; grânulos lambda possuem proteínas lisossomais. O PRP também possui componentes do plasma, incluindo hormônios, eletrólitos, e centenas de outras proteínas. Previamente à avaliação dos efeitos do PRP em articulações lesionadas de equinos, faz-se necessário avaliar seus efeitos em articulações hígidas, uma vez que a presença de todos esses componentes podem afetar os resultados. O objetivo desse trabalho é a obtenção de PRP asséptico e então a avaliação clínica, laboratorial e ultrassonográfica da aplicação intra-articular dessa substância em articulações hígidas. PRP (4 mL) foi injetado na articulação metacarpofalangeana de oito cavalos em um primeiro experimento e em seis cavalos no segundo experimento, enquanto na articulação contralateral foi administrado solução fisiológica (0,9%), 15 dias depois. No primeiro experimento foram utilizadas três aplicações com intervalos de sete dias entre elas, simulando o tratamento clínico comumente preconizado, enquanto no segundo experimento, foi realizada uma única injeção da substância, com intervalos curtos de avaliação, para verificar os efeitos inflamatórios agudos. Presença de dor, calor, efusão e claudicação foram avaliados, bem como análise física do líquido sinovial (LS), contagem de células nucleares, mensuração de prostaglandina $E_2$ ($PGE_2$), interleucina 1β (IL-1β), antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra), fator de necrose tumoral α (TNF- α), AH (AH) e condroitim sulfato (CS). Os valores de ureia no LS foram utilizados como fator de correção. Todas as alterações descritas a seguir foram em comparação ao grupo SF. Após administração de PRP, observou-se turbidez do LS às 6 horas, piora na qualidade de mucina às 3 horas, aumento na contagem celular às 3, 6, 24 e

48 horas, maiores valores de $PGE_2$ às 3 e 6 horas no grupo PRP em relação ao grupo SF. Todos os valores foram normalizados em 7 dias. As concentrações de CS, AH, IL-1β, IL-1ra e TNF-α não diferiram significativamente. Após três aplicações de PRP, com intervalo de sete dias, não foram observadas alterações articulares clínicas ou laboratoriais. Contudo, o exame ultrassonográfico mostrou aumento na vascularização da membrana sinovial no 14° dia de avaliação no grupo que recebeu PRP, sugerindo neovascularização induzida pelos fatores de crescimento. Esses achados sugerem que o PRP possui ação proinflamatória leve e transitória que não culmina com catabolismo da cartilagem.

Palavras chave: Plasma rico em plaquetas. Equinos. Articulação. Ultrassonografia. Condroitim sulfato.

## ABSTRACT

MORAES, A. P. L. **Responses to intrarticular platelet-rich plasma use in normal horses: clinical, laboratorial and ultrasonographic findings.** [Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos]. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Blood derived products are being on foccus in articular disease treatment in horses. The rationale support for the use of platelet-rich plasma (PRP) lies in the concept that PRP provides many growth factors. These growth factors are released when platelets are activated and α-granules degranulated. Beyond α-granules, platelets also release coagulation factors and others glycoproteins that influence inflammation processes by increasing the number of interleukins and chemokines; dense granules release adenosine diphosphate, adenosine triphosphate, calcium, histamine, serotonin and dopamine, that are active in tissue homeostasis; lambda granules release lysosomal proteins. PRP also contains plasma components, including hormones, electrolytes, and hundreds of other proteins. Previously to the evaluation PRP effects on articular diseases of horses, it is necessary to evaluate its effects on healthy joint, because the presence of all these components may affect the results. The aim of the present study is obtain aseptic PRP and than to investigate the clinical, laboratorial and ultrasonographic effects of PRP administration in healthy equine´s joints. PRP (4 mL) was administered to metacarpophalangeal joint of eight horses in the first experiment and in six horses in the second experiment, while in the contralateral joint was administered saline (0,9 %), with 15 days later. In the first experiment, the administration were made with seven days interval between them, simulating clinical treatments commonly recommended, for the second experiment only one injection was administered, on a short evaluation interval, in order to verify the acute inflammatory effects. Pain, heat, effusion and lameness were evaluated, as so as physical analysis of sinovial fluid, score of nucleated cells, prostaglandin $E_2$ ($PGE_2$) measurement , interleukin 1β (IL-1β), receptor antagonist of interleukin 1 (IL-1ra), tumor necrosis factor-α (TNF-α), hialurônico acid (HA) and condroitim sulphate (CS). Urea values in the fluid were also measured and used as a correct factor. All changesmentioned are considered relative to saline control. After PRP administration, turbidity was observed at 6 hours, poor quality of mucin at 3 hours, number of nucleated cells increased at 3, 6, 24 and 48 hours, $PGE_2$ values increased at 3 and 6 hours. All values were normalized in seven days. The concentration of CS, HA, IL-1β, IL-1ra and TNF-α did not significantly vary. After three applications of PRP with seven days intervals, articular changes were not observed in clinical

or laboratorial findings. However, in PRP group, ultrasonographic examination showed vascular increase of synovial membrane on the 14° day of evalution, suggesting neovascularization induced by growth factors. These findings suggest that PRP had a transitory and low pro-inflammatory action that did not lead to cartilage catabolism.

Key-words: Platelet-rich plasma. Equine. Joint. Ultrasonographic. Condroitim sulphate.

## LISTA DE TABELAS


Tabela 1 - Concentração plaquetária obtida após protocolo de obtenção do PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-8) – São Paulo - 2011-2012..... 62

Tabela 2 - Quantidade leucocitátia ($x10^3$/µL) e média da quantidade, presente no PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-8) – São Paulo - 2011-2012..... 63

Tabela 3 - Coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 64

Tabela 4 - Aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 65

Tabela 5 - Viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , sendo < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima – São Paulo - 2011-2012..... 66

Tabela 6- Teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular, sendo 1-bom, 2-regular, 3-ruim – São Paulo - 2011-2012..... 68

Tabela 7 - Contagem celular (células/µL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 69

Tabela 8 - Porcentagem de células mononuclueares do LS (%) obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 70

Tabela 9 - Porcentagem de células polimorfonucleares do LS (%) obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 71

Tabela 10 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de ureia (mg/dL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 72

Tabela 11 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 73

Tabela 12 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 74

Tabela 13 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL1ra (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 75

Tabela 14 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 75

Tabela 15 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 76

Tabela 16 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de $PGE_2$ (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 77

Tabela 17 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 78

Tabela 18 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 79

Tabela 19 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação AH/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 80

Tabela 20 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 81

Tabela 21 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 82

Tabela 22 - Concentração plaquetária obtida após protocolo de obtenção do PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-6) – São Paulo - 2011-2012..... 91

Tabela 23 - Quantidade leucocitária ($x10^3$/µL) presente no PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-6) – São Paulo - 2011-2012..... 91

Tabela 24 - Coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 92

Tabela 25 - Aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 93

Tabela 26 - Viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , sendo < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima – São Paulo - 2011-2012..... 94

Tabela 27 - Teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular, sendo 1-bom, 2-regular, 3-ruim – São Paulo - 2011-2012..... 96

Tabela 28 - Contagem celular (células/µL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 97

Tabela 29 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de ureia (mg/dL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 98

Tabela 30 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana de seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 99

Tabela 31 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 99

Tabela 32 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1ra (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 100

Tabela 33 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL1-ra/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana de seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 101

Tabela 34 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP, intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 102

Tabela 35 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 103

Tabela 36 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de $PGE_2$ (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 104

Tabela 37 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 104

Tabela 38 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular –São Paulo-2011-2012..... 106

Tabela 39 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação AH/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 106

Tabela 40 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 107

Tabela 41 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP (PRP) intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 108

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fatores de crescimento derivados de plaquetas..... 37

Quadro 2 - Sistema de gradação de claudicação..... 51

Quadro 3 - Protocolo de centrifugação com variação da força centrífuga relativa (g) e variação do tempo em minutos (min.). São Paulo - 2011-2012..... 52

Quadro 4 - Classificação das alterações articulares, visibilizadas ao exame ultrassonográfico das articulações metacarpofalangeanas – São Paulo - 2011-2012..... 59

## LISTA DE FIGURAS


Figura 1 - Média da concentração plaquetária obtida após protocolo de centrifugação para obtenção do PRP de cada cavalo (1-8), e a média final da concentração plaquetária obtida entre todos os cavalos – São Paulo - 2011-2012..... 62

Figura 2 - Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 64

Figura 3 - Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injeto PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 65

Figura 4 - Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 65

Figura 5 - Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 66

Figura 6 - Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF – São Paulo - 2011-2012..... 67

Figura 7 - Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP – São Paulo - 2011-2012..... 67

Figura 8 - Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 68

Figura 9 - Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 69

Figura 10 - Contagem média e desvio padrão de células nucleadas do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 70

Figura 11 - Porcentual médio e desvio padrão de células mononucleares do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 71

Figura 12 - Porcentual médio e desvio padrão de células polomorfonucleares do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 72

Figura 13 - Valores, média e desvio padrão, de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 73

Figura 14 - Valores, média e desvio padrão, de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 74

Figura 15 - Valores, média e desvio padrão, de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 76

Figura 16 - Valores, média e desvio padrão, de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 77

Figura 17 - Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$ (pg/mL) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 78

Figura 18 - Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP e SF – São Paulo - 2011-2012..... 79

Figura 19 - Valores, média e desvio padrão, de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 80

Figura 20 - Valores de AH/ureia do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 81

Figura 21 - Valores de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 82

Figura 22 - Valores de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 83

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose de GAGs de LS de articulação hígida, após injeção de SF. P1: mistura padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5µg cada; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo, 2011-2012..... 83

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose de GAGs de LS de articulação hígida, após injeção de PRP. P1: mistura padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5µg cada; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo, 2011-2012..... 84

Figura 25 - Imagens ultrassonográficas do recesso medial com líquido anecóico e material amorfo – São Paulo - 2011-2012..... 85

Figura 26 - Imagens ultrassonográficas do recesso medial com líquido anecóico e material amorfo, e avaliação em *Color Doppler* – São Paulo, 2011-2012..... 86

Figura 27 - Número de animais de acordo com o aspecto do LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP – São Paulo - 2011-2012..... 87

Figura 28 - Número de animais de acordo com o aspecto do LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado SF – São Paulo - 2011-2012..... 87

Figura 29 - Número de animais de acordo com a quantidade de LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP – São Paulo - 2011-2012..... 88

Figura 30 - Número de animais de acordo com a quantidade de LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado SF – São Paulo - 2011-2012..... 88

Figura 31 - Número de animais de acordo com a vascularização da membrana sinovial observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado – São Paulo - 2011-2012..... 89

Figura 32 - Número de animais de acordo com a vascularização da membrana sinovial observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado SF – São Paulo - 2011-2012..... 89

Figura 33 - Média da concentração plaquetária obtida após protocolo de centrifugação para obtenção do PRP de cada cavalo (1-6), e a média final da concentração plaquetária obtida entre todos os cavalos – São Paulo - 2011-2012..... 90

Figura 34 - Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 92

Figura 35 - Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injeto PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 92

Figura 36 - Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 93

Figura 37 - Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 94

Figura 38 - Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF – São Paulo - 2011-2012..... 95

Figura 39 - Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP – São Paulo - 2011-2012..... 95

Figura 40 - Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 96

Figura 41 - Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 96

Figura 42 - Contagem média e desvio padrão de células nucleadas do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 97

Figura 43 - Valores, média e desvio padrão, de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 99

Figura 44 - Valores, média e desvio padrão, de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 100

Figura 45 - Valores, média e desvio padrão, de IL-1ra (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 101

Figura 46 - Valores, média e desvio padrão, de IL-1ra/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da rticulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 101

Figura 47 - Valores, média e desvio padrão, de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 102

Figura 48 - Valores, média e desvio padrão, de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 103

Figura 49 - Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$ (pg/mL) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 104

Figura 50 - Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP e SF – São Paulo - 2011-2012..... 105

Figura 51 - Valores, média e desvio padrão, de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 106

Figura 52 - Valores de AH/ureia do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 107

Figura 53 - Valores de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 108

Figura 54 - Valores de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012..... 108

Figura 55 - Eletroforese em gel de agarose de GAGs de LS de articulação hígida, após injeção de PRP. CS: CS padrão,5µg ; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo, 2011-2012..... 109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| µL | microlitros |
| AChE | acetilcolinesterase |
| ADP | adenosina difostato |
| ATP | adenosina trifosfato |
| AH | ácido hialurônico |
| CCL 5 | citocina pró-inflamatória 5 |
| CS | condroitim sulfato |
| DP | desvio padrão |
| EGF | fator de crescimento endotelial |
| FCR | força relativa de centrifugação |
| GAG | glicosaminoglicano |
| IGF1 | fator de crescimento tipo insulina 1 |
| IgG | imunoglobulina G |
| IL | interleucina |
| IL-1β | interleucina 1β |
| IL-10 | interleucina 10 |
| IL-6 | interleucina 6 |
| IL-4 | interleucina 4 |
| IL-13 | interleucina 13 |
| IL-1ra | antagonista do receptor de interleucina 1 |
| LS | líquido sinovial |
| M | molar |
| MEC | matriz extracelular cartilagínea |
| mg | miligrama |
| MHz | megahertz |
| mL | mililitros |
| MMP | metaloproteinase |
| nm | nanômetro |
| OA | osteoartrite |
| PDA | tampão 1,3-diaminopropanoacetato |
| PDAF | fator de angiogênese derivado de plaqueta |

| | |
|---|---|
| PDEGF | fator de crescimento endotelial derivado de plaqueta |
| PDGF | fator de crescimento derivado de plaqueta |
| PF4 | fator plaquetário 4 |
| pg | picograma |
| $PGE_2$ | prostaglandina $E_2$ |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| PPP | plasma pobre em plaquetas |
| PRP | plasma rico em plaquetas |
| SF | solução fisiológica 0,9% |
| TGF-β | fator de crescimento transformador β |
| TIMPs | inibidores teciduais de metaloproteinases |
| TNF-α | fator de necrose tumoral α |
| VEGF | fator de crescimento endotelial |

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| % | porcentagem |
| α | alfa |
| β | beta |
| ® | marca registrada |
| < | menor |
| > | maior |
| / | por |
| ° | grau |
| ºC | graus Celsius |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO**.....26
**2 REVISÃO DE LITERATURA**.....27
2.1 OSTEOARTRITE.....27
**2.1.1 Etiopatogenia**.....28
**2.1.2 Patogenia**.....28
2.2 CICATRIZAÇÃO TECIDUAL.....31
2.3 ULTRASSONOGRAFIA ARTICULAR.....32
2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....35
**2.4.1 Plaquetas**.....35
**2.4.2 Obtenção do PRP**.....38
**2.4.3 Presença de leucócitos**.....40
**2.4.4 Ativação do PRP**.....41
**2.4.5 Uso do PRP intra-articular**.....42
2.5 UTILIZAÇÃO DO PRP NA MEDICINA ESPORTIVA.....45
**3 OBJETIVOS**.....47
3.1 OBJETIVO GERAL.....47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....47
**4 JUSTIFICATIVA**.....48
**5 MATERIAIS E MÉTODOS**.....49
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....49
5.2 ANIMAIS.....49
**5.2.1 Avaliação física**.....51
5.3 PREPARO DO PRP.....51
5.4 COLETA DE LS.....52
**5.4.1 Análise física do LS**.....53
**5.4.2 Teste do precipitado de mucina**.....53
**5.4.3 Contagem total e diferencial de células no LS**.....53
**5.4.4 Determinação de ureia no LS**.....54
**5.4.5 Determinação de IL-1β no LS**.....54
**5.4.6 Determinação de IL-1ra no LS**.....55
**5.4.7 Determinação de TNF-α no LS**.....55
**5.4.8 Determinação de $PGE_2$ no LS**.....56
**5.4.9 Determinação de GAGs do LS**.....56

5.5 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO ..... 57
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 60
**6 RESULTADOS** ..... 61
6.1 EXPERIMENTO 1 ..... 61
**6.1.1 Exame físico** ..... 61
**6.1.2 PRP** ..... 61
**6.1.3 LS** ..... 64
6.1.3.1 Análise física do LS ..... 64
6.1.3.2 Teste do precipitado de mucina ..... 67
6.1.3.3 Contagem total de células no LS ..... 69
6.1.3.4 Determinação de ureia no LS ..... 72
6.1.3.5 Determinação de IL-1β, IL1ra, TNF-α e $PGE_2$ no LS ..... 73
6.1.3.6 Determinação de GAGs do LS ..... 79
6.1.4 Exame ultrassonográfico ..... 84
6.2 EXPERIMENTO 2 ..... 90
**6.2.1 Exame físico** ..... 90
**6.2.2 PRP** ..... 90
**6.2.3 LS** ..... 91
6.2.3.1 Análise física do LS ..... 91
6.2.3.2 Teste do precipitado de mucina ..... 95
6.2.3.3 Contagem total de células no LS ..... 97
6.2.3.4 Determinação de ureia no LS ..... 97
6.2.3.5 Determinação de IL-1β, IL1ra, TNF-α e $PGE_2$ no LS ..... 98
6.2.3.6 Determinação de GAGs do LS ..... 105
**7 DISCUSSÃO** ..... 110
**8 CONCLUSÃO** ..... 118
**REFERÊNCIAS** ..... 119

# 1 INTRODUÇÃO

O retorno pleno à função, no menor espaço de tempo, é uma das principais preocupações atuais da medicina equina, particularmente em animais de elevado desempenho esportivo. Dentre as afecções dos membros locomotores que demandam maior atenção destaca-se a osteoartrite (OA), por ser uma das mais prevalentes e debilitantes, frequentemente associada à queda de desempenho ou ao afastamento da atividade praticada.

O ambiente articular tem efeito autodestrutivo quando a inflamação torna-se presente, uma vez que a ação de citocinas inflamatórias provoca fragmentação da cartilagem articular, que serve de estímulo para liberação de novas citocinas e aumento da degeneração cartilagínea.

Estudos recentes estão focados na manutenção da homeostasia ou bloqueio dos efeitos deletérios ao ambiente articular a fim de evitar procedimentos invasivos, aumentando assim a sobrevida da articulação. A inflamação aguda é necessária para início do processo de reparação, porém a regulação inadequada desse processo pode ocasionar danos teciduais excessivos ou inflamação crônica. Para tanto, é crescente a utilização de produtos derivados do sangue autólogo, como plasma ou soro condicionado, plasma rico em plaquetas (PRP) e produtos que contenham proteína antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1ra) (IRAP®), a fim de prover mediadores celulares e humorais para o ambiente lesionado.

Embora os mecanismos de ação do PRP ainda não estejam totalmente elucidados, acredita-se que ele possua efeitos anabólicos sobre os condrócitos, sinoviócitos e células mesenquimais do osso subcondral, resultando em aumento da síntese de matriz extracelular (MEC) e diminuição de moléculas pró-inflamatórias, auxiliando no tratamento de injúrias da cartilagem e dor articular.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 OSTEOARTRITE

A articulação sinovial é constituída pela superfície articular de pelo menos dois ossos, recobertos por cartilagem hialina, além de cápsula articular e ligamentos que envolvem e estabilizam a articulação. Esta cavidade é preenchida pelo líquido sinovial (LS), que é o meio pelo qual os nutrientes alcançam a cartilagem articular (TODHUNTER, 1996). De todos os tecidos que compõe a articulação sinovial, a cartilagem articular é a mais estudada, provavelmente seguida do osso subcondral, tecido que não está em contato com a cavidade sinovial mas que fica exposto quando há presença de OA (WEEREN; GRAUW, 2010).

OA é o termo comumente utilizado para descrever as degenerações articulares. São sinônimos os termos doença articular degenerativa e osteoartrose (CALDEIRA et al., 2002).

A OA é uma desordem progressiva caracterizada pela destruição da cartilagem articular e osso subcondral e por mudanças sinoviais. Sinovite é um fenômeno frequentemente observado na OA e contribui para a patogenia da doença através da liberação de vários mediadores catabólicos e pró-inflamatórios, alterando o balanço entre degradação e reparação da MEC (SUTTON et al., 2009). As alterações estruturais da cartilagem articular ocorrem quando sua capacidade de adaptação é suplantada.

A deterioração da cartilagem articular é caracterizada por fragmentações da mesma, que podem ocasionar efusão sinovial e sinovite, dor e disfunção articular (MCILWRAITH, 2002). Levando em consideração que a cartilagem articular é avascular e não possui inervação, pode-se concluir que quando o processo degenerativo provoca dor e disfunção articular, principais sinais clínicos da OA (MCILWRAITH; TROTTER, 1996), já tenha atingido certa profundidade no tecido.

### 2.1.1 Etiopatogenia

Em equinos, a maioria das lesões articulares é provavelmente induzida por trauma agudo, carga repetitiva ou sobrecarga (MCILWRAITH, 2005).

A teoria mais aceita sobre a etiologia da OA em equinos baseia-se na atuação de forças mecânicas, como a sobrecarga, sobre uma cartilagem saudável. Essas forças podem resultar em injúria matricial ou celular, causando alterações metabólicas nos condrócitos e levando à liberação de enzimas proteolíticas que provocam fragmentação da cartilagem articular. O microtrauma repetitivo é o fator patogênico mais comum na OA equina (CARON, 2011).

Outras duas teorias propostas por Caron (2011), baseiam-se em uma cartilagem articular de propriedades biomecânicas deficitárias ou em mudanças físicas do osso subcondral, que ocorrem quando estresse mecânico normal e recorrente, resulta em microfraturas do osso subcondral, sem que haja tempo para cicatrização e remodelamento do osso subcondral.

### 2.1.2 Patogenia

Na doença articular, ocorre desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos. Moléculas da MEC após sofrerem ação de enzimas, são liberadas no LS (MCILWRAITH, 2005). Essas moléculas podem ser usadas como biomarcadores, na tentativa de detectar alterações articulares em estágio inicial, prover informações sobre o avanço e predizer o futuro das lesões (MCILWRAITH, 2005), bem como serem indicadoras do sucesso da terapia preconizada (FRISBIE et al., 2008).

A injúria da membrana sinovial é importante por ser fonte potencial de liberação direta de enzimas lisossomais, como as metaloproteinases (MMPs) neutras, de prostaglandina E2 ($PGE_2$), de espécies reativas de oxigênio e de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e a interleucina 1 (IL-1). Acredita-se que a sinovite contribui significativamente para o desenvolvimento de dor, inflamação articular e degradação da cartilagem vista na OA (SUTTON et al., 2009). Certos neuropeptídeos, como a substância P, também são mediadores da inflamação e contribuem para a transmissão da dor (SUTTON et al., 2009).

É sabido que a substância P aumenta a liberação de $PGE_2$ pelos condrócitos, induz a expressão de $PGE_2$ e colagenase pelos sinoviócitos, e ativa o *burst* oxidativo dos neutrófilos (SUTTON et al., 2009). A $PGE_2$ provoca inflamação da membrana sinovial e pode contribuir para a depleção da MEC e erosão tanto do osso subcondral como da própria cartilagem (CARON, 2011).

Citocinas são pequenas proteínas regulatórias produzidas por diversas células do organismo (CARON, 2011). Numerosas citocinas estão envolvidas no metabolismo articular, sendo que as mais importantes na OA são as citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1, TNF-α (CARON, 2011) e interleucina 6 (IL-6) (BERTONE et al., 2001). A interação dessas três principais citocinas está comumente associada à degradação da MEC (BERTONE et al., 2001). Na OA também há um aumento das citocinas anti-inflamatórias e das antagonistas de citocinas, como interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) e o IL-1ra (SUTTON et al., 2009).

Em estudo feito por Bertone et al. (2001), concluiu-se que as citocinas IL-1 e TNF-α estão muito aumentadas em doenças articulares agudas, enquanto a $PGE_2$ aumenta em diversas doenças articulares, ou seja, a $PGE_2$ sendo um bom marcador da lesão não determina seu grau ou tempo de evolução. A IL-6 somente encontra-se presente no ambiente articular que está sofrendo lesão, e sua produção relaciona-se diretamente à liberação de IL-1 (BERTONE et al., 2001).

A principal função das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF-α na patogenia da doença articular é estimular numerosas células, incluindo os condrócitos, a secretar metaloproteinases, como colagenase e estromelisina (JOUGLIN et al., 2000). A IL-1 parece ter um efeito mais potente do que o TNF- α, porém quando associados, eles têm o efeito potencializado (CARON et al., 2011).

O TNF-α está aumentado não somente em lesões agudas, como durante a progressão da doença de moderada à severa (KAMM et al., 2010). Essa citocina estimula a síntese de enzimas que degradam a MEC e inibe a síntese de proteoglicanos e colágeno pelos condrócitos (CARON, 2011).

Além do estímulo de catabolismo articular, a IL-1 suprime a expressão de colágeno tipo II (KAMM et al., 2010; CARON, 2011) e de proteoglicanos e induz a síntese e secreção de enzimas proteolíticas que degradam as macromoléculas da MEC (CARON, 2011). O catabolismo também é promovido pelo bloqueio da ação das proteínas inibidoras teciduais de metaloproteinases (TIMPs). IL-1 estimula a síntese de $PGE_2$ e óxido nítrico (CARON, 2011).

As MMPs são endopeptidases envolvidas na reciclagem da matriz extracelular. Elas podem ser divididas em três grupos: colagenases (MMP 1 e 8), colagenase tipo IV ou gelatinases (MMP 2 e 9) e estromelisina ou proteoglicanase (MMP 3 e 10) (CLEGG et al., 1997). A degradação mecânica e enzimática da cartilagem articular implica em degradação do colágeno e perda de proteoglicanos, sendo as colagenases 1, 2 e 3 responsáveis pela quebra do colágeno e a estromelisina e agrecanase (proteoglicanase) pela degradação de proteoglicanos. Há forte evidência que a IL-1 dirige o processo catabólico, por estimular a liberação de MMPs, agrecanase e $PGE_2$ (MCILWRAITH, 2005). A liberação de $PGE_2$ induzida pela IL-1 ou pelo TNF-α, pode ser detectada após 30 minutos e até 5 horas da estimulação por IL-1 (GODFREY et al., 1988).

Na cartilagem sadia, a atividade proteolítica das metaloproteinases é controlada principalmente pela presença de proteínas inibitórias específicas, as TIMPs, produzidas pelos sinoviócitos, condrócitos e células endoteliais (CARON, 2011), sendo o equilíbrio entre a síntese de MMPs e TIMPs crucial para o controle da degradação da MEC (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Em doenças articulares, o TNF-α e a MMP 13, mediada pelo próprio TNF-α, ficam aumentados na cartilagem e na sinóvia, acarretando danos a essas estruturas e aumentado a síntese de citocinas pela sinóvia (KAMM et al., 2010).

Em estudo de artrite induzida por colagenase, conduzido por Fukushima et al. (2010), observou-se que o aumento de MMP 3 ocorre a partir do 30º dia e permanece até o 50º dia, já o TNF-α, está aumentado em torno do 10°-20º dia, a IL-6 e a IL-10 em torno do 30º dia.

O óxido nítrico é outro mediador presente na OA, ele inibe a síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II pelos condrócitos, aumenta síntese de MMPs e inibe a IL-1ra (CARON, 2011). Sua síntese é estimulada pela IL-1 e pelo TNF-α (CARON, 2011).

Há numerosos fatores de crescimento envolvidos na patogênese da OA, em especial o TGF-β (fator de crescimento transformador β) e o IGF-1 (fator de crescimento tipo insulina 1) (TODHUNTER, 1996). O TGF-β, induz a proliferação de sinoviócitos e de células mais maduras, que possuem crescimento mais lento, produzem mais colágeno e menos proteases (SUTTON et al., 2009). Estudos em ratos mostraram que o TGF-β reduz a liberação de MMPs pela IL-1 (HARVEY et al., 1991).

Em contrapartida, alguns estudos obtiveram como resultado uma maior liberação de citocinas proinflamatórias em articulações com grande quantidade de TGF-β (HULTH et al., 1996), portanto seu papel ainda não está totalmente elucidado. Já o IGF-1 possui efeitos anabólicos na articulação, através do aumento da síntese de proteoglicanos e inibição da

produção de MMPs induzida pela IL-1 (IM et al., 2003), porém por aumentar a proliferação de sinoviócitos, condrócitos e osteoblastos, o IGF-1 possui papel importante na formação de osteófitos no desenvolvimento da OA (OKASAKI et al., 1999).

## 2.2 CICATRIZAÇÃO TECIDUAL

A cicatrização tecidual segue um processo que se inicia com inflamação e que demora alguns dias. Ele continua com a proliferação celular e de matriz por semanas, sendo seguidas pela formação tecidual e maturação que demora meses. O término desse processo dá-se pela remodelação tecidual, o que leva anos (WERNER; GROSE, 2003).

Na fase de inflamação, a lesão requer aporte sanguíneo adequado que irá atrair macrófagos e formar um agregado de fibrina para posterior adesão plaquetária. As plaquetas agregadas irão suprir a área com fatores de crescimento, que também são derivados do soro e células locais (ARNOCZKY; DELOS; RODEO, 2011).

A proliferação celular e de matriz é crítica porque as células presentes é que irão gerar o reparo tecidual. Essas células são pluripotentes, originadas de tecidos adjacentes (VIDRIERO, 2010). Elas são atraídas para a área lesionada por uma variedade de fatores de crescimento, que têm função quimiotática e mitogênica, que estimulam crescimento celular e proliferação vascular (WERNER; GROSE, 2003). Nesta fase o uso de estimulantes externos, como o PRP, pode auxiliar na cicatrização final.

Plaquetas têm como função hemostasia, inflamação, defesa antimicrobiana, angiogênese e cicatrização de feridas. As plaquetas também abrigam proteínas, incluindo fatores de crescimento, mensageiros do sistema imune, enzimas, e outros componentes bioativadores, envolvidos no reparo tecidual. Não é só a presença dos fatores de crescimento no PRP que afeta o nível de cicatrização tecidual como também a habilidade de as células alvo utilizaram esses fatores (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011).

As proteínas presentes no plasma também são conhecidas por serem componentes críticos na cicatrização de feridas, além de conter fibrinogênio e outros fatores de agregação (MANN, 1999).

A fase de formação e maturação tecidual depende das células presentes e do ambiente da lesão (WERNER; GROSE, 2003). O remodelamento tecidual demora anos para ocorrer. Na formação de cartilagem ou na diferenciação de condrócitos, o TGF-β induz a

condrogênese de células mesenquimais progenitoras e o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) auxilia os condrócitos a manter seu fenótipo e induz a proliferação e síntese de proteoglicanos (KON et al. 2011).

## 2.3 ULTRASSONOGRAFIA ARTICULAR

Apesar de a radiografia ser a modalidade imaginológica utilizada em primeiro lugar para auxílio ao diagnóstico de OA, este método confere informação reduzida quanto às lesões localizadas em tendões ou ligamentos, e também sobre a aparência das estruturas sinoviais (WHITCOMB, 2006). A ressonância magnética e a tomografia computadorizada permitem a visualização de estruturas ósseas e tecidos moles (VANDERPERREN et al., 2009a), porém necessitam de anestesia geral e demandam elevado custo operacional (WHITCOMB, 2006; VANDERPERREN et al., 2009b). Esses fatores fazem com que a ultrassonografia continue a ser a modalidade imaginológica mais eficiente e de maior uso para o diagnóstico de lesões em tecidos moles e estruturas articulares em equinos (WHITCOMB, 2006).

O principal benefício do exame ultrassonográfico quando comparado ao exame radiográfico é sua superioridade em demonstrar alterações nos tecidos moles como espessamento da sinóvia e cápsula articular e danos em ligamentos intra-articulares e periarticulares, além de ser possível avaliar acúmulos de LS e a característica desse líquido (CARON, 2011). A ultrassonografia parece ser mais sensível do que a radiografia na identificação de osteófitos e remodelamento periarticular nas fases iniciais da doença articular (DENOIX, 1996).

A área a ser examinada ultrassonograficamente tem que ter tricotomia, e ser lavada com água quente. Transdutores de alta resolução (7,5 – 13 MHz) são utilizados para estruturas superficiais, enquanto transdutores convexos de baixa frequência (2,5 – 5,0 MHz) são preferíveis para avaliação de estruturas profundas (DENOIX, 2011).

A localização precisa e o registro das anormalidades é importante para o diagnóstico e para permitir a comparação em um novo exame (WRIGLEY, 2006). Faz-se então necessário o conhecimento preciso da anatomia de toda a região articular, e um método sistemático de observação e avaliação da região afetada (DENOIX, 2011).

A articulação normal é forrada por uma fina membrana sinovial e cercada por uma fina cápsula articular. O LS normal é anecóico, e os vilos sinoviais salientes são observados no espaço articular (REEF, 2004).

Em articulações com OA, podem ser encontrados um ou vários dos seguintes achados ecográficos: cartilagem articular com espessura diminuída, contorno e ecogenicidade alterada (CARON, 2011), membrana sinovial espessada e hiperecogênica (PARK; WRIGLEY; STEYN, 2002; BRAUN; GOLD, 2012), aumento da vascularização da membrana sinovial (BRAUN; GOLD, 2012), aumento do LS com efusão articular, linhas de descontinuidade, e alterações de ecogenicidade, de forma e de espessura de ligamentos e tendões (SMITH, 2008).

Normalmente, a cápsula articular e o LS são difíceis de serem detectados por ultrassom (WRIGLEY, 2006). Porém, uma efusão articular excessiva é facilmente detectada, já que a cápsula articular está deslocada da superfície da cartilagem articular (DENOIX, 2011).

A visualização da cartilagem ao exame ultrassonográfico mostrou ser um indicador sensível da degeneração quimicamente induzida na OA (NIEMINEN et al., 2002; WRIGLEY, 2006). Alterações na cartilagem articular incluem adelgaçamento, perda do contorno, e mudanças na ecogenicidade (CARON, 2011).

O LS apresenta-se na ultrassonografia como um líquido totalmente anecogênico, quando normal, e a sua quantidade é limitada. Um líquido ecogênico anormal pode ser observado em artrite traumática, hemoartrose ou artrite séptica (WRIGLEY, 2006). As lesões osteoartríticas ocasionam aumento da quantidade de LS e alteração na sua ecogenicidade (DENOIX, 2009). Pode ser observado material ecogênico no LS, sendo que pequenos pontos hiperecogênicos podem representar fibrina ou detritos cartilaginosos, e materiais ecogênicos maiores são compatíveis com fragmentos articulares (DENOIX, 2011).

A membrana sinovial é fina, menos ecogênica e difícil de ser distinguida (WRIGLEY, 2006). Pode ser evidenciado um espessamento da membrana sinovial, zonas difusas hiperecogênicas que indicam fibrose da prega sinovial ou zonas hiperecogênicas com sombra acústica indicativas de calcificação (DENOIX, 1998). A sinovite encontrada no exame ultrassonográfico tem sido correlacionada a piora no exame radiográfico e ao aparecimento de marcadores do metabolismo articular (KUMM; TAMM; LINTROP, 2009).

O grupo de estudos de reumatologia humana (OMERACT – Outcome Measures in Rheumatology Clinical Trials) definiu hipertrofia sinovial como um “tecido intra-articular anormal hipoecoico que não se desloca e é fracamente compressível e pode exibir sinal

Doppler". Porém essa definição também pode ser utilizada em OA. O exame *Doppler* detecta, de maneira indireta, a inflamação da articulação, pela presença de vascularização da membrana sinovial (BRAUN; GOLD, 2012), e tem substituído o exame de ressonância magnética em pacientes humanos, já que permite a visualização de microvascularização na cavidade articular e tecidos periarticulares, fornecendo informações sobre o processo inflamatório (KANG et al., 2013).

Avaliando pacientes humanos com artrite reumatoide e OA na articulação coxofemoral, Walther et al. (2002), observaram uma forte correlação entre a avaliação qualitativa do exame de *Power Doppler* e a avaliação patológica, a correlação também foi percebida quando comparou-se avaliação quantitativa do sinal *Power Doppler* com a quantidade de fator VIII tecidual, permitindo aos autores concluírem que a ultrassonografia *Power Doppler* é uma excelente ferramenta para avaliar a perfusão sinovial.

Os ligamentos possuem uma ligeira ecogenicidade e a orientação das suas fibras varia em diferentes articulações. Caso porções dos ligamentos sejam lesionadas, instabilidade articular, subluxação ou luxação podem ocorrer (DENOIX, 2011). Ecogenicidade alterada é frequentemente observada em casos de tendinite e desmite. O acúmulo de líquido gerado pela inflamação aguda resulta em redução da ecogenicidade e, lesões crônicas, com formação de fibrose, resultam em aumento da ecogenicidade (WRIGLEY, 2006). Estas alterações são acompanhadas por lesões ósseas tais como irregularidade óssea, osteólise e entesófitos na zona de inserção ligamentar (DENOIX, 2008).

A silhueta óssea aparece como linha contínua, plana e lisa, permitindo fácil identificação de anormalidades, como erosões, osteófitos, entesófitos e irregularidades (KEEN; CONAGHAN, 2009). A presença de osteófitos, fragmentos ósseos e lise óssea são indicativos da presença de OA (DENOIX, 2009).

A cartilagem articular normal apresenta-se como uma linha regular e definida, hipoecogênica a anecogênica, localizada entre a membrana sinovial e osso subcondral (DENOIX, 2009), paralela a este (KEEN; CONAGHAN, 2009). Anormalidades vistas na OA incluem perda da definição das margens da cartilagem, heterogeneidade e espessura irregular (KEEN; CONAGHAN, 2009).

A avaliação da articulação metacarpofalangeana deve ser feita nos aspectos dorsal e palmar/plantar, dorsomedial e dorsolateral, lateral e medial (DENOIX, 2011).

Nos aspectos dorsal e palmar/plantar da articulação, pouca quantidade de LS anecóico é visualizada, e a cartilagem articular no aspecto dorsal, é fina, medindo cerca de 1 mm. O

tendão extensor digital longo e o ligamento anular também são avaliados nesses aspectos, respectivamente (REEF, 2004).

Os ligamentos colaterais medial e lateral, caracterizados pelos aspectos medial e lateral, respectivamente, tem ecogenicidade homogênea e fibras paralelas. Quando lesionados, apresentam-se com aumento de volume, hipoecoico, e comumente são observados entesófitos na origem ou inserção dos ligamentos (REEF, 2004).

Os aspectos dorsomedial e dorsolateral são utilizados para avaliação completa da margem articular. O achado mais comum encontrado é a presença de osteófitos (DENOIX, 2011).

A articulação metacarpofalangeana normal tem uma pequena quantidade de LS anecóico no recesso palmar. Distensões sinoviais, alterações de quantidade e ecogenicidade de LS, podem ser visibilizadas no aspecto palmar da articulação.

Com o intuito de comparar a utilidade do exame ultrassonográfico com o exame radiográfico para a detecção de fragmentos no aspecto dorsal das articulações metacarpofalangeanas e metatarsofalangeanas em equinos, Vanderperren et al. (2009b) analisaram 36 articulações com fragmentação articular. Os achados radiográficos e artroscópicos estiveram em concordância em relação ao número e localização dos fragmentos em 44% das articulações, enquanto que a relação entre o exame ultrassonográfico e artroscópico foi de 96%.

## 2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

### 2.4.1 Plaquetas

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos (WROBLEWSKI et al., 2010) e representam uma solução rica em fatores de crescimento e fatores angiogênicos bem como mediadores inflamatórios que podem promover ou atenuar respostas inflamatórias, colaborando para coordenar a reparação tecidual em tecidos lesados ou perpetuar a inflamação e a destruição tecidual (DUNKEL et al., 2011), por aumentar a síntese de interleucinas e citocinas (FORTIER; HACKETT; COLE, 2011).

A primeira descrição do desenvolvimento e uso do PRP aconteceu no início de 1990, quando a ciência estava focada no desenvolvimento de “colas biológicas” (VIDRIERO, 2010). Observou-se que estas preparações têm propriedades de formação óssea e efeitos anti-inflamatórios e antibióticos (BIELECKI et al., 2007). Esses efeitos são atribuídos principalmente às plaquetas (VIDRIERO, 2010). Quando as plaquetas sofrem lise, liberando os fatores de crescimento contidos nos grânulos α, efeitos anabólicos foram observados em modelos de lesão tecidual (TEXTOR, 2011).

PRP é descrito como “um volume de plasma que contém uma contagem de plaquetas acima da linha de base do sangue total” (MARX, 2001). Segundo Anitua et al. (2004), o PRP em humanos, deve ter ao menos 300.000 plaquetas/µL, e o mesmo valor pode ser utilizado para equinos (FOSTER et al., 2009; MCCARREL; FORTIER, 2009; CARMONA; LÓPEZ, 2011; YAMADA et al., 2012).

O efeito terapêutico do PRP decorre principalmente da degranulação dos grânulos α, com a liberação de uma série de fatores de crescimento (BOSCH et al., 2010), além da atuação das plaquetas na coagulação e hemostasia (VIDRIERO, 2010). Plaquetas também armazenam proteínas que tem ação bactericida e fungicida, fatores de coagulação e glicoproteínas de membrana que influenciam a inflamação (FORTIER; HACKETT; COLE, 2011). A degranulação dos grânulos α no sítio da lesão promove o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas, iniciando o processo inflamatório, promovendo angiogênese que resulta na neovascularização e formação de novo tecido conectivo (ZANDIM et al., 2012). Plaquetas também foram identificadas por terem propriedades analgésicas, por liberarem peptídeos ativadores de protease (ASFAHA et al., 2007).

Os fatores de crescimento, moléculas envolvidas na reparação tecidual (ANITUA et al., 2004) conhecidos no PRP são: PDGF, TGF- β, fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento epitelial (MARX, 2001; WROBLEWSKI et al., 2010), IGF-1 e fator plaquetário 4 (PF-4), PDEGF (fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas), PDAF (fator de angiogênese derivado de plaqueta), EGF (fator de crescimento endotelial) (WROBLEWSKI et al., 2010), sendo os predominantes o PDGF e TGF- β (TEXTOR, 2011). Esses fatores de crescimento possuem papel bastante importante na reparação tecidual, como descrito no Quadro 1. Outras moléculas presentes no PRP são as citocinas e glicoproteínas, como a IL-1, osteocalcina, osteonectina, trombospondina-1, fibrinogênio, fibronectina e vitronectina (WROBLEWSKI et al., 2010).

Quadro 1 – Fatores de crescimento derivados de plaquetas

| Fator de crescimento | Efeito |
|---|---|
| PDGF | Ativação de macrófagos e angiogênese<br>Quimiotaxia de fibroblastos e ativação proliferativa<br>Aumento da síntese de colágeno<br>Aumento da proliferação de células ósseas |
| TGF β | Aumenta a atividade proliferativa dos fibroblastos<br>Estimula a síntese de colágeno tipo 1 e fibronectina<br>Induz a deposição de matrix óssea<br>Inibe a formação de osteoclastos e reabsorção óssea |
| IGF-1 | Quimiotático para fibroblastos e estimula síntese proteica<br>Aumenta proliferação óssea pela proliferação e diferenciação de osteoblastos |
| PDEGF | Estimula proliferação de queratinócitos e fibroblastos da derme |
| PDAF | Induz vascularização por estimular as células endoteliais vasculares |
| PF-4 | Estimula o influxo inicial de neutrófilos para as feridas<br>Quimioatrativo para fibroblastos<br>Agente anti-heparina |
| EGF | Proliferação celular<br>Diferenciação de células epiteliais |
| VEGF | Angiogênese<br>Migração e mitose de células endoteliais<br>Criação de vasos sanguíneos<br>Desenvolve fenestrações<br>Quimiotático para macrófagos e granulócitos<br>Vasodilatação |

Fonte: Wroblewski et al. (2010).

Além dos fatores de crescimento liberados pelos grânulos α, as plaquetas também possuem grânulos densos, que contém adenosina, serotonina, histamina e cálcio, que possuem efeitos nos diferentes estágios da reparação tecidual (WROBLEWSKI et al., 2010).

A adenosina atua como agente citoprotetor que evita o dano tecidual; a serotonina aumenta a permeabilidade de capilares e suprime a produção de interferon-γ; histamina é um potente ativador de macrófagos, atua como vasodilatador e aumenta a permeabilidade de capilares (WROBLEWSKI et al., 2010). Porém, estudo realizado por Woodal et al. (2008), comprovou que o PRP reduz a proliferação de macrófagos e produção de interleucinas nas primeiras 72 horas após aplicação.

Além da liberação dos grânulos α, plaquetas quando ativadas sintetizam proteínas (ZIMMERMAN; WEYRICH, 2008) por até dois dias após a coagulação (WEYRICH et al., 1998). Apesar disto ainda não ter sido comprovado para os fatores de crescimento, estudo feito por Textor, Norris e Tablin (2011) concluiu que a soma de PDGF presente na porção coagulada e no soro sobrenadante de PRP de equinos, é o dobro da quantidade presente em

plaquetas em repouso do mesmo indivíduo, sugerindo que há uma nova síntese de fatores de crescimento após ativação plaquetária.

Para que o efeito terapêutico do PRP seja maximizado, é necessário estimular a liberação de produtos com efeitos benéficos e minimizar a liberação de agentes mediadores danosos (MONTEIRO; LEPAGE; THEORET, 2009). O PRP aumenta a neovascularização tecidual e não somente libera fatores de crescimento para o local como também induz a produção endógena dessas substâncias (TEXTOR, 2011). Estudo conduzido por Xie et al. (2013)[1], utilizando a análise da expressão de genes relacionados observou que o PRP aumenta a neovascularização e a reinervação de enxertos ligamentares em cirurgias de ruptura de ligamento cruzado cranial em cães. A concentração plaquetária obtida nesse experimento foi de 669 x $10^6$/µL.

### 2.4.2 Obtenção do PRP

Embora a definição de PRP indique apenas uma pura mistura de plasma com plaquetas, o termo "PRP" engloba uma variedade de produtos, que variam na quantidade final de plaquetas e na quantidade de células sanguíneas da linhagem vermelha ou branca (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011). Isso afeta a indicação, potência e eficácia do produto final (EHRENFEST; RASMUSSON; ALBREKTSSON, 2009). O termo PRP não define se as plaquetas estão em repouso ou se sofreram ativação para facilitar a liberação de fatores de crescimento (TEXTOR, 2011).

Diferentes técnicas são utilizadas para obtenção do PRP, resultando em grandes variações na concentração de plaquetas do produto final e na disponibilidade dos fatores de crescimento presentes (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011). A diferença entre as técnicas está relacionada ao protocolo de preparo, uso de anticoagulantes, inclusão de leucócitos e o uso de ativadores (VIDRIERO et al., 2010; TEXTOR, 2011). Entender essas diferenças é um ponto crítico para analisar resultados já publicados e decidir qual protocolo utilizar (VIDRIERO et al., 2010).

---

[1] XIE, X.; ZHAO, S.; WU, H.; XIE, G.; HUANGFU, X.; HE, Y.; ZHAO, J. Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. **Journal of Surgical Research**, E1-E9, 2013.

O processo fundamental para obtenção do PRP é a separação seletiva dos componentes sólidos e líquidos do sangue total através de uma técnica chamada plasmaferese (WEIBRICH, 2001). Baseado no princípio físico descrito pela lei de Stoke, a velocidade das partículas em um ambiente líquido em resposta a uma força gravitacional, é relativa ao diâmetro dessas partículas, sendo assim, as plaquetas, que possuem diâmetro menor que as células das séries vermelha e branca, terão uma velocidade mais baixa em resposta à mesma força gravitacional, o que permite que as plaquetas fiquem suspensas no líquido enquanto os outros componentes sólidos do sangue se precipitam (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011).

Para produção do PRP, o sangue total é coletado em frascos com anticoagulante, que quelam o cálcio e previnem a agregação plaquetária pela inibição da conversão de protrombina em trombina. Embora existam inúmeros anticoagulantes, apenas dois deles suportam o metabolismo necessário das plaquetas e permitem a separação sem prejuízo das mesmas: ácido citrato dextrose-A e fosfato citrato dextrose (MARX, 2001).

Após o sangue total coletado, este é submetido a duas centrifugações com diferentes forças gravitacionais. Na primeira centrifugação, o plasma com as plaquetas em suspensão é separado das células brancas e vermelhas. Na segunda centrifugação, com maior força gravitacional, é separada a parte pobre em plaquetas (sobrenadante) da parte rica em plaquetas (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011).

A diferença nas forças gravitacionais e nos *kits* utilizados na obtenção do PRP podem causar variações de até 50% na concentração plaquetária final, que pode ser a explicação para os resultados clínicos conflitantes no uso do PRP (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011). Um sistema que gera um maior número absoluto de plaquetas não é necessariamente o melhor (VIDRIERO et al., 2010).

Comparando as concentrações de TGFβ-1 e a incorporação de radiomarcadores em meios de cultura de cartilagem entre protocolos com diferentes concentrações plaquetárias, Kisiday et al. (2012) concluíram que a concentração plaquetária alta não gera maior estímulo a biossíntese meniscal e cartilagínea que PRP com menor concentração plaquetária. Foram utilizados três protocolos de obtenção de PRP, um com método de tubos com uma centrifugação, e dois com kits, sendo um com uma centrifugação e outro com duas centrifugações, onde se obteve 317.000 plaquetas/µL, 276.000 plaquetas/µL e 725.000 plaquetas/µL, respectivamente. Com relação aos leucócitos, a concentração foi de 40 leucócitos/µL, 30 leucócitos/µL e 14800 leucócitos/µL, respectivamente.

A recomendação de que o concentrado de plaquetas deve conter de 3 a 5 vezes a quantidade de plaquetas do sangue total (MARX 2001; SMITH et al., 2006) é extrapolada da Medicina (MCLELLAN; PLEVIN, 2011). Como os tecidos podem ter diferentes requerimentos torna-se inapropriado aplicar a mesma concentração de plaquetas para tecidos distintos (MCLELLAN; PLEVIN, 2011).

Piccione et al. (2010) estudaram os efeitos do armazenamento do PRP em diferentes temperaturas (22°C, 8°C e de -20 a -40°C) para avaliar a coagulação plaquetária e sua viabilidade, concluindo que o tempo e a temperatura de armazenamento influenciam na coagulação, sendo preferível armazená-lo por poucas horas a temperatura ambiente ou mantê-lo refrigerado.

### 2.4.3 Presença de leucócitos

Grande diferença no preparo do PRP é a presença de leucócitos no produto final (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011). Estudos são controversos quando da indicação de manter ou não os leucócitos no concentrado de plaquetas. Ao mesmo tempo em que os neutrófilos liberam citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF-α, IL-6, MMP 8 e 9 e espécies reativas de oxigênio que podem exacerbar o dano inicial (ANITUA et al., 2007; ZANDIM et al., 2012), as células brancas também aumentam a concentração de fatores de crescimento no concentrado de plaquetas (ZIMMERAMNN et al., 2008) e podem ter um efeito antibiótico, com benefício terapêutico (MOOJEN et al., 2008; CIESLIK-BIELECKA et al., 2009).

Pontos positivos foram evidenciados quando da presença de leucócitos, como a inibição efetiva do crescimento bacteriano (ARNOCKZY; DELOS; RODEO et al., 2011) e a cicatrização mais rápida de feridas contaminadas (CIESLIK-BIELECKA et al., 2009). Estudos *in vitro* comprovaram a existência de citocinas inflamatórias IL-1, TNF-α, IL-6 e IL-8 (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995). Outros estudos sugerem que o PRP com leucócitos causa mais dor local que o PRP puro (ARNOCKZY; DELOS; RODEO, 2011). Kisiday et al. (2012), ao estudar a concentração de MMPs em dois protocolos de obtenção de PRP, sendo um com uma centrifugação e baixa concentração de leucócitos, e outro com duas centrifugações e alta concentração de leucócitos, concluíram que os leucócitos presentes no PRP podem ser pro-inflamatórios para a cartilagem.

Também foi observada uma adesão plaquetária aos leucócitos em PRP ativado com trombina bovina, e uma baixa adesão quando puro (ZANDIM et al., 2012).

### 2.4.4 Ativação do PRP

Para as plaquetas sofrerem degranulação e liberarem os fatores de crescimento, é necessário que elas sejam ativadas (WROBLEWSKI et al., 2010), que pode ser por estímulo exógeno ou endógeno (TEXTOR, 2011). Porém, a necessidade de ativação do PRP é outro ponto controverso com poucas evidências na literatura (MCLELLAN; PLEVIN, 2011).

Trombina pode causar reações imunomediadas (MARX, 2001) e rápida agregação; produtos derivados do cálcio podem reduzir a liberação de fatores de crescimento (ZIMMERMANN; ARNOLD, 2003); e colágeno tipo 1, presente em tecido lesionado (SMITH et al., 2006; SCHNABLE et al., 2008), induz liberação lenta dos fatores de crescimento, o que traz benefício terapêutico (FOSTER et al., 2009). Porém, estudo feito por McCarrel e Fortier (2009) demonstrou que há uma pequena degranulação plaquetária e liberação de fatores de crescimento das plaquetas com apenas o estímulo do tecido lesado.

Uma vez ativado, o PRP deve ser aplicado imediatamente, já que a degranulação ocorrerá rapidamente (WROBLEWSKI et al., 2010). Entretanto, a adição de trombina ou cálcio para ativar as plaquetas, produz um gel que não poderá ser aplicado sem o uso de agulha de grosso calibre, limitando o uso em certos procedimentos (WROBLEWSKI et al., 2010). O uso de colágeno tipo 1 para ativação plaquetária leva a um tempo maior na degranulação e uma menor agregação, permitindo o uso de agulhas de menor calibre para sua aplicação, sendo útil em muitos procedimentos (FUFA et al., 2008).

Textor, Norris e Tablin (2011) avaliaram a força de centrifugação, a passagem do PRP pela agulha e a exposição ao colágeno sobre a liberação de PDGF, TGF-β e IGF-1 em amostras de PRP, *in vitro*, concluindo que há uma maior liberação de PDGF em PRP tratado exposto ao colágeno, e não há diferença na liberação de TGF-β e IGF-1.

Dunkel et al. (2011), analisaram a liberação de fatores de crescimento PDGF e TGF1-β e da citocina proinflamatória 5 (CCL5) de PRP ativado ou não ativado de pôneis. A concentração plaquetária obtida foi de 145 x $10^{6}$/µL. A ativação foi feita com trombina, quitosana ou TNF-α recombinante equino. O resultado obtido foi que não há diferença

significativa na liberação de PDGF e TGF1- β por amostras coaguladas, com e sem estímulo, e que ela é mais baixa em amostras não coaguladas (incubadas com citrato de sódio). Já a liberação de CCL5 não foi associada à coagulação e foi maior em amostras ativadas com maiores concentrações de TNF-α.

Trabalho semelhante foi realizado por Han et al. (2009) para comparar o efeito da ativação plaquetária. Os autores compararam a osteogênese e a condrogênese, além dos fatores de crescimento presentes no meio, em cultivos de matriz óssea suplementada com PRP ativado e não ativado com trombina, implantados em camundongos *nude*. O resultado mostra que a liberação de TGF-β1 foi maior no PRP ativado, entretanto, a osteogênese e a condrogênese só foram vistas no grupo com PRP não ativado, sugerindo que a ativação plaquetária não deve ser feita em matriz óssea desmineralizada.

O estudo mais recente publicado sobre ativação ou não de plaquetas de equinos por Zandim et al., 2012, comparou a porcentagem de plaquetas totalmente ativadas, com ativação incerta, em repouso ou com dano irreversível em amostras de PRP puro, PRP ativado com $CaCl_2$ (10%) ou ativado com trombina bovina. Nesse estudo, concluiu-se que no PRP ativado com $CaCl_2$ existe a maior quantidade de plaquetas ativadas (24%) em relação ao PRP puro (9%), e nas amostras tratadas com trombina, houve grande porcentagem de plaquetas com dano irreversível. Os autores recomendam a utilização de PRP puro quando se faz necessário utilizá-lo na forma líquida, uma vez que além de apresentar adequada porcentagem de plaquetas ativadas, ele também possui grande porcentagem de plaquetas em repouso (41%), que podem ser ativadas por substâncias do tecido lesionado, como o colágeno, a adrenalina e a serotonina. Em estudo conduzido por Leme et al. (2006) em laminite induzida de equinos, observou-se ativação plaquetária de PRP puro quando utilizados em equinos endotoxêmicos.

### 2.4.5 Uso do PRP intra-articular

Em cavalos, o PRP é usado com maior frequência em lesões ligamentares e tendíneas (TEXTOR, 2011). Poucos estudos têm avaliado seu efeito na cartilagem articular e nos meniscos (KISIDAY et al., 2012), tornando o uso intra-articular com menor embasamento científico (TEXTOR, 2011).

O PRP quando utilizado intra-articular, estimula a proliferação celular e a produção de matriz cartilagínea pelos condrócitos e osso subcondral, além de aumentar a produção de

ácido hialurônico (AH) pelos sinoviócitos (SAITO et al., 2009; FORTIER; HACKETT; COLE, 2011). Além disso, fatores de crescimento presentes no PRP diminuem a ação catabólica de citocinas como a IL-1 e o TNF-α. Dados de estudos *in vitro* suportam o potencial terapêutico do PRP no ambiente articular com efeitos anabólicos na cartilagem, células mesenquimais e LS (FORTIER; HACKETT; COLE, 2011).

Kruger et al. (2011) demonstraram que o PRP humano sem ativação, estimula a migração e a diferenciação dos condrócitos das células mesenquimais progenitoras, induzindo a formação de matriz cartilagínea rica em proteoglicanos e colágeno tipo II, além disso, induziu a expressão de marcadores genéticos da condrogênese, como colágeno tipo II e IX e agrecam.

Estudos *in vitro* demonstraram que condrócitos aumentam a proliferação celular, a síntese de glicosaminoglicanos (GAGs) e colágeno tipo II quando estimulados com PRP ativado com carbonato de cálcio (AKEDA et al., 2006). Sinoviócitos retirados de pacientes com OA cultivados com 20% de PRP ativado com cloreto de cálcio sem leucócitos produziram mais AH que sinoviócitos em 20% de PRP. A melhora na secreção de AH também foi notada em sinoviócitos tratados com IL-1β, sugerindo que o PRP puro pode induzir condroproteção e lubrificação articular depois de injeção intra-articular mesmo na presença de inflamação (ANITUA et al., 2007).

Estudos *in vivo* foram conduzidos para avaliação do uso de PRP intra-articular. Em pesquisa feita por Brhem et al. (2006), concluiu-se que a utilização de PRP puro em lesões osteocondrais induzidas em ovelhas não acarreta em resultado positivo quando comparada à técnica de colocação de *flap* periosteal, porém não foi realizada contagem plaquetária do PRP obtido.

Estudo conduzido por Kon et al. (2011) para tratamento das mesmas lesões em ovelhas, concluiu que a utilização de microfratura com PRP ativado foi melhor do que microfratura sem PRP, em relação a cicatrização da cartilagem. Já um estudo conduzido por Sun et al. (2010), utilizando defeitos osteocondrais induzidos em coelhos, obteve que no grupo tratado com PRP e ácido polilaticoglicólico como carreador, houve maior neocondrogênese, aumento da produção de GAGs e formação óssea mais semelhante ao osso normal quando vistos na tomografia computadorizada, quando comparados aos grupos com ácido polilaticoglicólico e sem tratamento com PRP.

Em lesões induzidas do ligamento cruzado cranial em coelhos, obteve-se que a utilização de PRP em microesferas de gelatina, duas vezes por semana, por três semanas, reduziu significativamente a progressão histológica e morfológica da OA quando comparado

a utilização de plasma pobre em plaquetas (PPP) nas mesmas microesferas (SAITO et al., 2009). Um estudo realizado em lesões meniscais de ratos demonstrou que o uso de PRP melhora o reparo meniscal tanto *in vitro* como *in vivo* na 12° semana de tratamento (ISHIDA et al., 2007).

Carmona e López (2011) relataram o uso de três aplicações via intra-articular de PRP ($450 \pm 35 \times 10^6$ plaquetas e $9,3 \pm 1,5$ leucócitos por mL), ativado com gluconato de cálcio (1:10) na articulação escapuloumeral de uma égua com fratura de escápula e úmero, lesão do tendão bíceps braquial e distensão da bursa, sendo o intervalo entre aplicações de duas semanas. Houve melhora no quadro clínico nas 48 horas após a primeira aplicação e a recuperação do animal em 10 semanas, sendo o esperado entre 18-24 semanas. Os autores concluíram que a melhora foi decorrente da concentração suprafisiológica de TGF-β1, fatores de crescimento derivados de plaquetas, fator de crescimento endotelial, e fator de crescimento do hepatócito, que contribuíram para o efeito anti-inflamatório e analgésico do PRP.

Estudo feito em equinos com OA em diferentes graus, avaliados clínico e radiograficamente, concluiu que duas ou três aplicações de PRP intra-articular melhoraram o quadro do animal (ABELLANET; PRADES, 2009).

Tratamento de laminite crônica em égua com doença de Cushing foi realizado com três aplicações de PRP, injetados nas quatro bandas coronárias, com intervalos de 10 dias entre as aplicações (CARMONA et al., 2013). O PRP obtido teve como valor médio $430 \times 10^6$ plaquetas e 8,6 leucócitos/mL, obtido por protocolo utilizando duas centrifugações (120G por cinco minutos e 240G por cinco minutos). Depois da segunda aplicação, o PRP produziu crescimento do casco e redução significativa da dor. Após duas semanas do término das aplicações, a égua já podia ser montada, provando que o PRP pode ser um adjuvante do tratamento de laminite crônica.

Yamada et al. (2012) administrou PRP intra-articular em lesões osteocondrais induzidas. A aplicação foi realizada no 30º dia após cirurgia com PRP ativado com cálcio e trombina e três vezes depois, com PRP não ativado, com intervalos de 15 dias entre as aplicações. A concentração plaquetária média do PRP foi de 362.350 plaquetas/µL. Houve redução dos sinais clínicos da inflamação articular, aumento da quantidade de linfócitos e menor quantidade de neutrófilos, valores mais altos de $PGE_2$, e melhor tecido cicatricial em articulações tratadas com PRP.

## 2.5 UTILIZAÇÃO DO PRP NA MEDICINA ESPORTIVA

Espera-se que o uso de PRP na Medicina permita aos pacientes boa recuperação em curto espaço de tempo, volta à atividade esportiva mais rapidamente, cicatrização tecidual mais potente, e, provavelmente, menos dor durante a recuperação. Acredita-se que com o uso do PRP, além de obter uma cicatrização mais rápida, esta também será mais eficaz, melhorando a qualidade do tecido lesionado (WROBLEWSKI et al., 2010).

Em decorrência de sua origem autógena, fácil preparação e excelente segurança, o advento do PRP abriu um novo campo na terapia da medicina esportiva (VIDRIERO et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que culturas de tenócitos com uma preparação de fatores de crescimento aumentam a proliferação e secreção de VEGF e fator de crescimento hepatócito, que melhoram a angiogênese e diminuem a fibrose (VIDRIERO et al., 2010). Um estudo realizado por Sanches et al. (2008) comparou a cicatrização de lesões no tendão de Aquiles de pessoas tratadas com procedimento cirúrgico, sendo um grupo com injeção de PRP e outro apenas com a cirurgia, obtendo como resultado cicatrização mais rápida no grupo com PRP.

Bons resultados têm sido vistos com o tratamento de PRP em defeitos de cartilagem, osteocondrite e OA (VIDRIERO et al., 2010).

Em OA do joelho, Sanchez et al. (2008) usando a injeção intra-articular de PRP, obtiveram redução significante da dor e melhora na qualidade de vida e sinais clínicos, quando comparada com a injeção intra-articular de AH. Este resultado pode ser explicado pelo efeito do PRP em restaurar a concentração de AH e balancear a angiogênese articular (ANITUA et al., 2007).

Estudo semelhante foi feito por Kon et al. (2011) onde foram comparados os efeitos de três aplicações com intervalo de 14 dias de PRP ativado por carbonato de cálcio *versus* AH (alto e baixo peso molecular) na articulação do joelho de pacientes com OA, onde a injeção de PRP mostrou melhor e mais longa eficácia que o AH em reduzir dor e sintomas e melhorar a função articular. Além disso melhores resultados foram vistos em pessoas jovens com grau de lesão leve.

Filardo et al. (2012), avaliaram a melhora no grau de OA em joelhos de 144 pacientes, onde foram comparados dois protocolos diferentes para obtenção de concentrado de plaquetas, sendo um obtido com apenas uma centrifugação (1,5 vezes a concentração basal) e outro com duas centrifugações (4,7 vezes a concentração basal). O resultado foi melhora

significativa nos dois grupos, sendo que os melhores resultados foram vistos em pacientes jovens com grau leve de degeneração da cartilagem. Reação de dor e aumento de volume articular foram vistas no grupo tratado com PRP obtido com duas centrifugações, e os autores relacionaram esses achados à presença de leucócitos, uma vez que eles não estavam presentes no produto final obtido com uma centrifugação.

Um estudo realizado por Mishra e Pavelko (2006), relatou que em indivíduos com lesão no ombro pela prática de tênis, o uso de PRP intralesional mostrou melhora em 60% da dor em apenas oito semanas após o procedimento, enquanto os indivíduos que receberam bupivacaína (grupo controle) apresentaram melhora de apenas 16%.

A medicina esportiva equina necessita de novas terapias que visem à recuperação mais rápida de atletas, com menores efeitos colaterais. O uso do PRP para tratar injúrias articulares é baseado no conceito que o PRP contém fatores de crescimento, que são importantes reguladores da cicatrização tecidual.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e avaliar os efeitos da utilização de PRP autólogo em articulações hígidas de equinos, por meio do exame físico, ultrassonográfico e análise de LS. A hipótese é que a utilização de PRP não provoque efeitos inflamatórios.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtenção do PRP autólogo de maneira asséptica.
2. Identificar as alterações provocadas pelo uso do PRP em articulações hígidas, por meio das seguintes avaliações:
   - exame físico;
   - análise física do LS;
   - quantificação de citocinas inflamatórias no LS (IL-1, IL-1ra, $PGE_2$, TNF-α);
   - quantificação de GAGs no LS;
   - avaliação da quantidade e qualidade do LS e vascularização da membrana sinovial pelo exame ultrassonográfico.

# 4 JUSTIFICATIVA

Várias pesquisas foram conduzidas utilizando PRP em tendões e ligamentos, contudo pouco se sabe a respeito da sua utilização em articulações sinoviais. A administração de PRP em articulações hígidas forneceria informações básicas para o entendimento de seus efeitos na fisiologia articular, ampliando as perspectivas terapêuticas e justificando sua utilização nas diferentes artropatias.

# 5 MATERIAIS E MÉTODOS

## 5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1 – Avaliar os efeitos inflamatórios da aplicação semanal intra-articular do PRP autólogo em articulações hígidas de equinos, por meio do exame físico, exame ultrassonográfico e análise do LS.

Experimento 2 – Avaliar os efeitos inflamatórios agudos do PRP autólogo em articulações hígidas de equinos, por meio do exame físico e análise do LS.

## 5.2 ANIMAIS

Foram selecionados oito equinos sadios para o experimento 1, machos ou fêmeas, com idade entre seis e oito anos, que obrigatoriamente permaneciam em repouso em baias localizadas no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica da Universidade de São Paulo – USP. Dentre esses oito cavalos, seis foram selecionados para o experimento 2.

Esses animais ficaram alojados, sobre o mesmo regime alimentar, ou seja, um quilograma de concentrado duas vezes ao dia e feno de *coast-cross* também duas vezes ao dia, e água *ad libitum*.

Os animais foram avaliados clínica, radiográfica e ultrassonograficamente no início do experimento (dia 0), para identificação de lesões nas articulações metacarpofalangeanas, sendo utilizados apenas equinos sem histórico de claudicação e sem alterações ao exame radiográfico.

Para o exame radiográfico o animal permaneceu em posição quadrupedal obtendo-se imagens de ambos os membros nas projeções lateromedial e dorsopalmar, assim como as oblíquas dorsolateral-palmaromedial e dorsomedial-palmarolateral. Para realização dos exames foi utilizado o aparelho RX Poskom PXP 20 HF e as imagens computadorizadas foram reveladas por um *scanner* da marca Fuji®.

O exame ultrassonográfico foi realizado com aparelho de alta frequência e modo B e *Collor Doppler*. O equipamento utilizado foi o ultrassom ESAOTE MyLab 30 VET GOLD, com transdutor linear de 7,5 a 12 MHz, utilizando-se a frequência de 12 MHz. Durante exame ultrassonográfico, o animal permaneceu em posição quadrupedal em tronco de contenção próprio para equinos.

No experimento 1, o mesmo animal foi submetido a dois tratamentos, com intervalo de 15 dias entre eles: três infiltrações articulares com solução fisiológica 0,9 % (SF) (controle) em uma das articulações metacarpofalangeana e três infiltrações de PRP (tratamento) na contralateral.

Os animais foram divididos em dois grupos, aleatoriamente, a fim de que um grupo iniciasse com a injeção de SF e o outro grupo, com a injeção de PRP. A infiltração intra-articular foi realizada nos dias 0, 7 e 14, e coletado LS, sempre previamente à injeção, nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, conforme esquema abaixo.

| **Dia 0** | **Dia 7** | **Dia 14** | **Dia 21** | **Dia 28** |
|---|---|---|---|---|
| Coleta | Coleta | Coleta | Coleta | Coleta |
| Aplicação | Aplicação | Aplicação | | |

Após 30 dias do término do experimento 1, seis animais iniciaram o experimento 2, que consistiu da mesma maneira, em dois tratamentos, com intervalo de 15 dias entre eles: infiltração articular com SF (controle) em uma das articulações metacarpofalangeana e uma infiltração de PRP (tratamento) na contralateral.

Os animais foram divididos em dois grupos, aleatoriamente, a fim de que um grupo iniciasse com a injeção de SF e o outro grupo, com a injeção de PRP. A infiltração intra-articular foi realizada no momento 0, e o LS coletado em intervalos de 3, 6, 24, 48 e 168 horas (sete dias) após aplicação, conforme esquema.

| **0h** | **3h** | **6h** | **24h** | **48h** | **168h** |
|---|---|---|---|---|---|
| Coleta | Coleta | Coleta | Coleta | Coleta | Coleta |
| Aplicação | | | | | |

### 5.2.1 Avaliação física

Foi realizado exame físico com enfoque nas articulações metacarpofalangeanas avaliando-se:

A. inspeção (aumento de volume, postura antálgica em estação);

B. palpação (calor, dor, consistência);

C. dinâmica (presença de claudicação): realizada com o animal ao passo e ao trote, com e sem flexão da articulação metacarpofalangeana em estudo.

No experimento 1, o exame de claudicação foi realizado nos dias 0, 7, 14, 21, 28, sempre previamente à nova punção articular.

No experimento 2, o exame de claudicação foi realizado anteriormente à aplicação de SF ou PRP e 3, 6, 24 e 168 horas após aplicação intra-articular.

O grau de claudicação foi classificado de 0 a 5, conforme citado por Stashak (2006) (Quadro 2).

Quadro 2 – Sistema de gradação de claudicação,

| Grau | Descrição |
|---|---|
| **0** | Claudicação imperceptível sob qualquer circunstância |
| **1** | Claudicação de difícil observação; não evidente de forma consistente independentemente das circunstâncias |
| **2** | Claudicação de difícil observação ao passo ou ao trote em linha reta; evidente de forma consistente em algumas situações |
| **3** | Claudicação consistentemente observada ao trote em todas as situações |
| **4** | Claudicação óbvia; acentuada inclinação de cabeça, passada presa e/ou encurtada |
| **5** | Claudicação óbvia; mínima sustentação de peso na movimentação ou repouso; inabilidade de locomoção |

Fonte: Stashak (2006)

## 5.3 PREPARO DO PRP

Após prévia preparação asséptica da veia jugular, as amostras de sangue venoso foram coletadas em nove tubos de 4,5 mL com anticoagulante citrato de sódio, utilizando o primeiro tubo coletado para submeter a amostra sanguínea à contagem do número de plaquetas e células sanguíneas totais (hemograma), em aparelho de contagem automática[2].

[2] Contador hematológico automático modelo BS 2800 VET, Mindray

Após coleta e homogeneização dos tubos, o sangue foi centrifugado em duas etapas, cada uma com uma diferente força de centrifugação relativa (FCR), durante cinco minutos (Quadro 3). Todo o protocolo foi realizado em uma câmara de fluxo para preservar a esterilidade.

Quadro 3 – Protocolo de centrifugação com variação da força centrífuga relativa (g) e variação do tempo em minutos (min.) - São Paulo - 2011-2012.

| Protocolo | Força (g) | Tempo (min.) | Temperatura |
|---|---|---|---|
| **1° centrifugação** | 150 | 5 min | 24°C |
| **2° centrifugação** | 800 | 5 min | 24°C |

Após primeira centrifugação, todo o plasma foi coletado com uma pipeta Pasteur estéril, e este foi depositado em dois tubos Falcon estéreis com capacidade de 15 mL. Ao término da segunda centrifugação, o plasma sobrenadante, também conhecido como plasma pobre em plaquetas (PPP) foi coletado e descartado, resultando em um volume final de 5 ml, 2,5 ml pra cada Falcon utilizado.

O plasma remanescente ficou em repouso durante uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos permaneceram durante mais uma hora no homogeneizador de tubos.

Finalmente, 0,5 ml do designado PRP foram coletados de cada Falcon e depositados em micro tubo de 1,5 mL, para contagem do número de plaquetas e células sanguíneas quantificadas pelo mesmo aparelho de contagem automática. O restante foi mantido nos tubos Falcon estéreis, para aplicação na articulação.

Considerou-se PRP, a quantidade mínima de 300.000 plaquetas/µL (YAMADA et al., 2013; ANITUA et al., 2004).

## 5.4 COLETA DE LS

Para realização de artrocentese e injeção intra-articular de PRP ou SF 0,9%, o local de punção foi tricotomizado e realizada anti-sepsia com o uso de iodopovidona degermante e álcool 70%. Foi utilizada agulha hipodérmica 30x0,8 para coleta e injeção no local, e seringa de 10 mL para coleta do LS. O acesso escolhido para a artrocentese foi através do ligamento sesamoideano colateral lateral, segundo técnica descrita por Misheff e Stover (1991).

O LS coletado foi parcialmente utilizado para avaliações *in natura*, como avaliação física, teste do precipitado de mucina e contagem total de células, e o restante foi acondicionado em microtubos sem anticoagulante, centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C, força relativa de 1960g durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e colocado em novos microtubos e armazenado no freezer -80°C para posteriores dosagens.

### 5.4.1 Análise física do LS

O LS *in natura* foi avaliado quanto à coloração (palha, ouro ou avermelhado), quanto ao aspecto (límpido, semi-turvo ou turvo) e quanto à viscosidade (graduado de 2 a 5, sendo menor que 2 classificada como ruim, 2 a 5 boa e maior que 5 classificada como ótima).

Para realização da análise estatística, foram atribuídos escores para as avaliações coloração (1, 2 e 3, respectivamente) e aspecto (1, 2 e 3, respectivamente).

### 5.4.2 Teste do precipitado de mucina

Após prévia centrifugação em microtubos, sem anticoagulante, em centrífuga refrigerada a 4°C, por 15 minutos a 1960g, o LS foi avaliado quanto ao teste do precipitado de mucina. Para isso, 50 µL do LS centrifugado foi adicionado à 1,5 mL de solução de ácido acético a 2%. O grumo formado foi classificado como bom (1), regular (2), ruim (3) ou muito ruim (4) (Van Pelt, 1974).

### 5.4.3 Contagem total e diferencial de células no LS

Para a contagem total de células nucleadas presentes no LS, 5 µL foram pipetados com pipeta automática para a montagem da câmara de Neubauer[3], e posterior contagem com a

[3] Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor

utilização de microscópio eletrônico, em um aumento de 40x. Em amostras com alta contaminação sanguínea, o LS foi previamente diluído em proporção de 10 µL de LS em 90µL de SF, e então colocado na câmara de Neubauer para contagem celular.

No experimento 1, foi realizado diferencial celular, onde 50 µl de LS *in natura* foram diluídos em 50 µl de SF, homogeneizados e centrifugados[4] a 4°C e 150 g durante 10 minutos. Foram descartados 50 µl de sobrenadante e o botão celular foi ressuspendido nos 50 µl restantes. Em seguida foram confeccionados os esfregaços, corados com Rosenfeld.

### 5.4.4 Determinação de ureia no LS

Para correção dos valores de citocinas e GAGs no LS, foi realizada a dosagem de ureia das amostras, a fim de corrigir a diluição do LS. Para tanto, uma alíquota da amostra coletada foi descongelada e a concentração de ureia no LS foi mensurada em analisador bioquímico automático[5].

### 5.4.5 Determinação de IL-1β no LS

Para a quantificação da IL-1β utilizou-se 100µL de LS acondicionado em micro tubos sem anticoagulante, à temperatura de -80°C. O método utilizado para dosagem foi o ELISA *sandwich* (Uscn Life Science®) para equinos.

Foram adicionados 100µL de padrão, branco e das amostras em duplicata aos poços da placa, já sensibilizada com o anticorpo específico para IL-1β de equino, e esta foi incubada por duas horas a 37°C. Após incubação, o líquido foi removido e então adicionados 100µL de reagente de detecção (avidina com peroxidase) em cada poço. Após incubação por uma hora a 37°C, o líquido foi aspirado e a placa lavada por três vezes com solução de lavagem diluída em água ultra-filtrada. Adicionou-se 100µL de outro reagente de detecção e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. A placa então foi lavada por cinco vezes e adicionou-se 90µL de solução de substrato a cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 20 minutos,

[4] Centrifuge 5417R - Eppendorf®
[5] Randox RX Daytona

protegida da luz. Adicionou-se 50µL de solução de ácido sulfúrico para parar a reação entre enzima-substrato e a absorbância foi lida em 450nm em leitor de ELISA[6] correlacionada à concentração pelo uso de curva padrão com variação de 15.6 a 1.000 pg/mL. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

### 5.4.6 Determinação de IL-1ra no LS

Para quantificação de IL-1ra no LS de equinos, foi utilizado método ELISA *sandwich*, com o *kit* Quantikine ® da R&D Systems (EUA). A placa, já sensibilizada com anticorpo específico para IL1-RA de camundongo, recebeu amostras padrão, controle e amostras a serem analisadas. A placa foi incubada por duas horas em um agitador de placas e então o líquido foi aspirado e a placa lavada cinco vezes. Após esse procedimento, 100µL de IL-1ra conjugada foi adicionado a cada poço. Após duas horas de incubação no agitador e lavagem da placa, 100µL de solução substrato foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação, protegida da luz, os poços receberam 100µL de solução para parar a reação e a placa foi lida em 450nm em leitor de ELISA correlacionada à concentração, pelo uso de uma curva padrão com variação de 31.2 a 2.000 pg/mL. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

### 5.4.7 Determinação de TNF-α no LS

O método utilizado para quantificar TNF-α no LS foi o ELISA *sandwich*, com o *kit Equine TNF alfa duo set* obtido da R&D systems®.

A placa foi sensibilizada com anticorpo anti-TNF-α equino e incubada *over night* em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes e recebeu solução para bloquear a reação. Após incubação por uma hora à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada e adicionou-se 100µL das amostras padrão e das amostras a serem analisadas. A placa foi novamente incubada por duas horas à temperatura ambiente e lavada

[6] Leitor de Elisa

três vezes. Adicionou-se então 100µL de anticorpo de detecção em cada poço. Após incubação por duas horas, a placa foi novamente lavada e 100µL de estreptavidina peroxidase foram adicionados em cada poço. Após incubação por 20 minutos, protegida da luz, adicionou-se solução substrato e após 20 minutos, a solução para parar a reação. A placa foi lida a 450nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 15.6 a 1000 pg/mL. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

### 5.4.8 Determinação de $PGE_2$ no LS

Para quantificação de $PGE_2$ no LS, foi realizado método ELISA, com o *kit* adquirido da empresa Cayman Chemical Company (EUA). O LS utilizado estava acondicionado em microtubos sem anticoagulante, à temperatura de -80°C. O método utilizado foi um ensaio baseado na competição entre $PGE_2$ e $PGE_2$ acetilcolinesterase (AChE) já sensibilizada com anticorpo policlonal anti-IgG (imunoglobulina G), recebeu em cada poço, a acetilcolinesterase ligada ao $PGE_2$ e o anticorpo específico para $PGE_2$. Nos poços foram colocados também as amostras padrão e as amostras a serem analisadas. A placa foi lavada com reagente *Ellman´s*, que contém substrato para AChE. A absorbância da reação foi lida à 412nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 7.8 a 1000 pg/mL. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

### 5.4.9 Determinação de GAGs do LS

Para determinação de GAGs no LS, 50µL da amostra acondicionada em microtubos sem anticoagulante, a -80°C, foi incubada com 100µL de protease alcalina P126 maxatase (4mg/mL Tris HCl 0,05M), *overnight* em banho-maria a 50°C.

A amostra foi então submetida à fervura, por 15 minutos. Em seguida, resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação e o sobrenadante foi coletado e seco a vácuo

em uma centrífuga à vácuo[7] por duas horas a 45°C. As amostras foram ressuspendidas em 25µl de água destilada.

Estas alíquotas (25 µl) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M, pH 9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora, como descrito por Jaques et al. (1997) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976).

Uma mistura padrão de GAGs (5µL), contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato e heparam sulfato, na concentração de 1mg/mL cada, e uma amostra de 5µL com concentração conhecida de AH foram adicionadas à lâmina. O corante vermelho de cresol foi utilizado como indicador da distância percorrida pelos GAGs. Na eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, os GAGs são separados pela capacidade de interação com a diamina. Os compostos que menos interagem com 1,3-diaminopropano apresentam maior migração eletroforética.

Após a eletroforese, o AH e o CS foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1%, por 2 horas, no mínimo. A seguir o gel foi recoberto com papel de filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O CS foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela mesma solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Ato contínuo o AH foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

As lâminas foram escaneadas[8] e as imagens editadas[9] para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas[10].

## 5.5 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

No experimento 1, foi realizado exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, avaliando-se: a) o LS quanto ao seu aspecto e quantidade presente na articulação; b) cápsula articular com relação à espessura, inserção e aspecto; c) os ligamentos quanto ao aspecto e inserção; d) vascularização presente na membrana sinovial; e) cartilagem articular; f) presença de alterações no osso subcondral; g) presença de osteófitos. O exame

[7] Vacufuge vaccum concentrator - Eppendorf®
[8] Epson Expression 1680®
[9] Laund Silver Fast Epson IT8®
[10] Lauch VisionWorksLS®

ultrassonográfico foi realizado semanalmente nos dias 0 (controle), 7, 14, 21, 28, sempre previamente à nova punção articular.

O exame foi realizado com aparelho de alta frequência e modo B e *Color Doppler*. O equipamento utilizado foi o ultrassom ESAOTE MyLab 30 VET GOLD®, com transdutor linear de 7,5 a 12 MHz, utilizando-se a frequência de 12 MHz. Durante exame ultrassonográfico, o animal permaneceu em posição quadrupedal em tronco de contenção próprio para equinos. Para realização dos exames ultrassonográficos, a região da articulação metacarpofalagena foi tricotomizada e foi aplicado gel de contato, e então a mesma foi avaliada nos aspectos lateral, medial, dorsal e palmar. Após o exame em modo B, foi utilizado o *Color Doppler* para avaliação da presença de vascularização em membrana sinovial (Quadro 4).

Quadro 4 – Classificação das alterações articulares, visibilizadas ao exame ultrassonográfico das articulações metacarpofalangeanas – São Paulo – 2011 - 2012..

| Achados ultrassonográficos | Classificação |
|---|---|
| **Aspecto do LS** | |
| Anecóico | A |
| Efusão sinovial anecóica | B |
| Heterogêneo predominando líquido anecóico | C |
| Predomínio de material amorfo heterogêneo e líquido anecóico | D |
| Líquido com material denso e com focos hiperreflexivos em suspensão | E |
| **Quantidade** | |
| Sem alteração | F |
| Quantidade aumentada em até metade do volume fisiológico | G |
| Quantidade aumentada em até o dobro do volume fisiológico | H |
| Quantidade aumentada em mais que o dobro do volume fisiológico | I |
| Quantidade aumentada em três vezes ou mais do volume fisiológico | J |
| **Membrana sinovial - vascularização** | |
| Sem observação de fluxo articular | L |
| Vascularização visível, pontos coloridos esparsos e em pequena quantidade | M |
| Vascularização aumentada, pontos coloridos em blocos e em grande quantidade | N |
| **Cápsula articular** | |
| **Espessura** | |
| Sem alteração | O |
| Espessura aumentada em até duas vezes o esperado | P |
| Espessura aumentada em duas vezes ou mais que o esperado | Q |
| **Inserção** | |
| Lisa | R |
| Discreta irregularidade | S |
| Irregularidade evidente | T |
| **Aspecto** | |
| Homogêneo | U |
| Área hipoecogênica | V |
| Heterogênea com áreas hipo e hiperecogênicas | X |
| **Ligamentos - aspecto** | |
| Sem alteração | Z |
| Heterogêneo com áreas hipoecogênicas | A1 |
| Heterogêneo com áreas hiperecogênicas | B1 |
| **Ligamentos - inserção** | |
| Sem alteração- lisa | C1 |
| Presença de irregularidades | D1 |
| Proliferação óssea | E1 |
| **Cartilagem articular** | |
| Linha de cartilagem bem definida. Contínua, lisa e facilmente identificável | F1 |
| Linha de cartilagem de difícil identificação, porções observadas lisa e contínua | G1 |
| Linha de cartilagem de difícil identificação, porções observadas descontínua e rugosa | H1 |
| Ausência de linha de cartilagem e alteração difusa da superfície do osso subcondral | I1 |
| **Osso subcondral** | |
| Superfície lisa | J1 |
| Superfície irregular | L1 |
| **Osteófitos** | |
| Presença | M1 |
| Ausência | N1 |

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados pelo programa computacional Instat Graphpad 3 software. Após análise de variância (ANOVA), para os dados paramétricos (valores de GAGs do LS, TNF-α, IL-1β e IL1ra), utilizou-se o teste Turkey-Kramer para amostras não pareadas, para comparação entre os momentos de observação. Para os dados não paramétricos, foi aplicado teste Friedman, na identificação de diferenças no exame ultrassonográfico e análise física do LS.

Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste t não pareado.

O grau de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($P<0,05$).

# 6 RESULTADOS

## 6.1 EXPERIMENTO 1

### 6.1.1 Exame físico

Ao exame físico, não foram observados aumento de volume articular, postura antálgica e alterações articulares palpáveis, como calor, dor e alteração de consistência em nenhum dos momentos de ambos os grupos.

Com relação à dinâmica, nos animais do grupo que recebeu PRP, o grau de claudicação foi zero em todos os momentos, já no grupo que recebeu SF, um dos animais apresentou claudicação grau 1, somente no trote após flexão, no 21° dia. No entanto, no 28° dia, a claudicação era ausente.

### 6.1.2 PRP

Para quantificação final de plaquetas utilizando o procedimento descrito no item 5.3, foi realizada a comparação entre a quantidade de plaquetas no sangue de cada animal com a quantidade de plaquetas contidas no PRP.

A média de concentração obtida foi de 2,2 vezes a quantidade presente no sangue (Figura 1). A média inicial de plaquetas dos oito cavalos foi de 196 x $10^3$ plaquetas/µL e a média obtida no PRP foi de 423 x $10^3$ plaquetas/µL. Notou-se também grande variação da quantidade de plaquetas de cada animal nos três diferentes momentos da coleta (Tabela 1).

Em apenas dois momentos, a concentração esperada não foi obtida (concentração menor que 300 x $10^3$ plaquetas/µL) (Tabela 1).

Figura 1 – Média da concentração plaquetária obtida após protocolo de centrifugação para obtenção do PRP de cada cavalo (1-8), e a média final da concentração plaquetária obtida entre todos os cavalos – São Paulo - 2011-2012

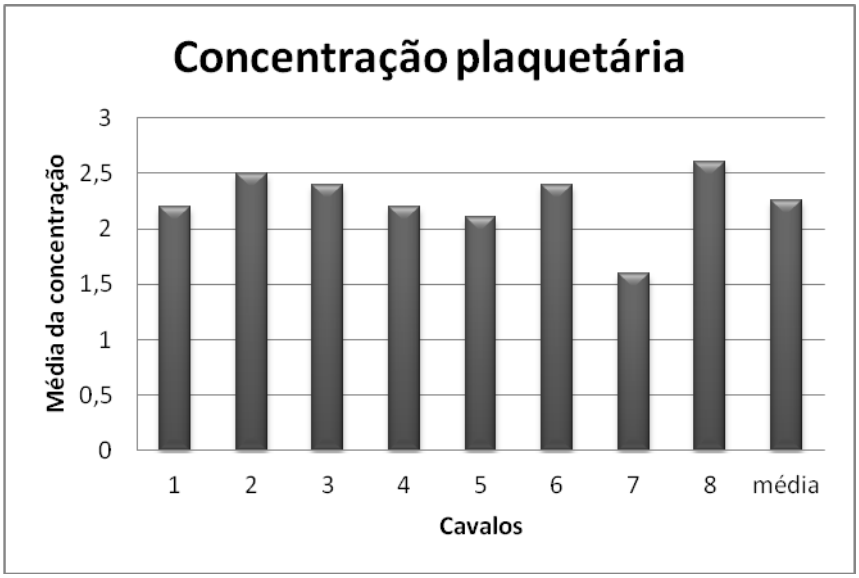



Tabela 1 – Concentração plaquetária obtida após protocolo de obtenção do PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-8) – São Paulo - 2011-2012

| Animal | Momento | Plaquetas Início ($x10^3$ µL) | Plaquetas Final ($x10^3$ µL) | Concentração |
|---|---|---|---|---|
| **1** | D0 | 192 | 521 | 2,71 |
| | D7 | **251** | **265** | 1,06 |
| | D14 | 208 | 591 | 2,84 |
| **2** | D0 | 112 | 333 | 2,97 |
| | D7 | 170 | 367 | 2,16 |
| | D14 | 145 | 341 | 2,35 |
| **3** | D0 | 162 | 445 | 2,75 |
| | D7 | 190 | 562 | 2,96 |
| | D14 | 250 | 400 | 1,6 |
| **4** | D0 | 197 | 406 | 2,06 |
| | D7 | 207 | 416 | 2,01 |
| | D14 | 150 | 366 | 2,44 |
| **5** | D0 | 165 | 488 | 2,96 |
| | D7 | 220 | 367 | 1,67 |
| | D14 | 257 | 446 | 1,74 |
| **6** | D0 | 137 | 388 | 2,83 |
| | D7 | 201 | 463 | 2,3 |
| | D14 | 198 | 402 | 2,03 |
| **7** | D0 | **228** | **230** | 1,01 |
| | D7 | 251 | 371 | 1,48 |
| | D14 | 186 | 425 | 2,28 |
| **8** | D0 | 178 | 558 | 3,13 |
| | D7 | 290 | 542 | 1,87 |
| | D14 | 176 | 482 | 2,74 |
| **Média** | | **196,7** | **423,9** | **2,24** |

A contagem de leucócitos, foi realizada em contador automático hematológico, e o valor final permaneceu nos mesmos padrões dos valores sanguíneos, não ocorrendo concentração (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidade leucocitátia ($x10^3/\mu L$) e média da quantidade, presente no PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-8) – São Paulo - 2011-2012

| Animal | Momento | Quantidade de leucócitos ($x\ 10^3/\mu L$) |
|---|---|---|
| **1** | D0 | 8,5 |
| | D7 | 7,4 |
| | D14 | 11,5 |
| **2** | D0 | 6,9 |
| | D7 | 10 |
| | D14 | 4,5 |
| **3** | D0 | 5,9 |
| | D7 | 6,2 |
| | D14 | 8,2 |
| **4** | D0 | 6,2 |
| | D7 | 6,3 |
| | D14 | 6 |
| **5** | D0 | 6,5 |
| | D7 | 3,6 |
| | D14 | 9,8 |
| **6** | D0 | 9,5 |
| | D7 | 10,8 |
| | D14 | 12,1 |
| **7** | D0 | 4,5 |
| | D7 | 6 |
| | D14 | 5,8 |
| **8** | D0 | 14,2 |
| | D7 | 23,2 |
| | D14 | 7,1 |
| **Média** | | **8,36** |

### 6.1.3 LS

#### 6.1.3.1 Análise física do LS

Os grupos não diferiram quanto à coloração e aspecto do LS nos diferentes momentos (P>0,05), havendo predomínio de coloração palha e aspecto límpido (Tabelas 3 e 4 e Figuras 2 a 5).

Tabela 3 – Coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | **PRP** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| **2** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **3** | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| **4** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **5** | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| **6** | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **7** | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| **8** | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| **Mediana** | **1** | **1,5** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1,5** | **1** | **1** |

Legenda: palha = 1; ouro = 2; avermelhado = 3; não houve diferença estatística entre grupos ou momentos(P>0,05).

Figura 2 – Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

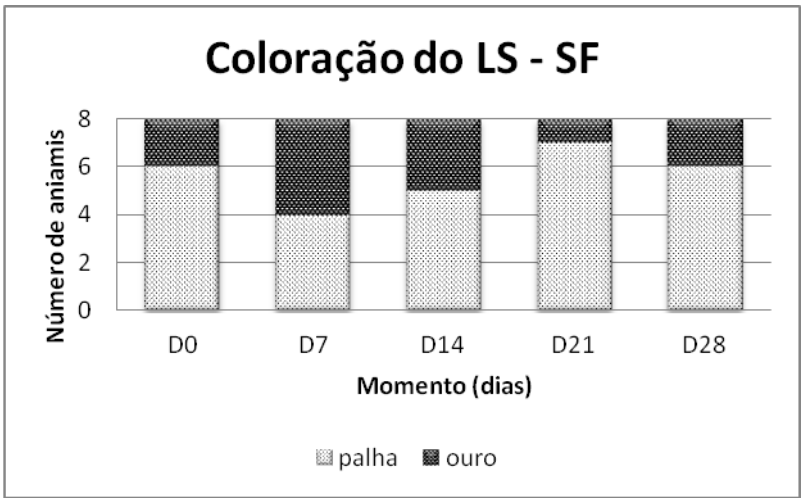


Figura 3 – Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injeto PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

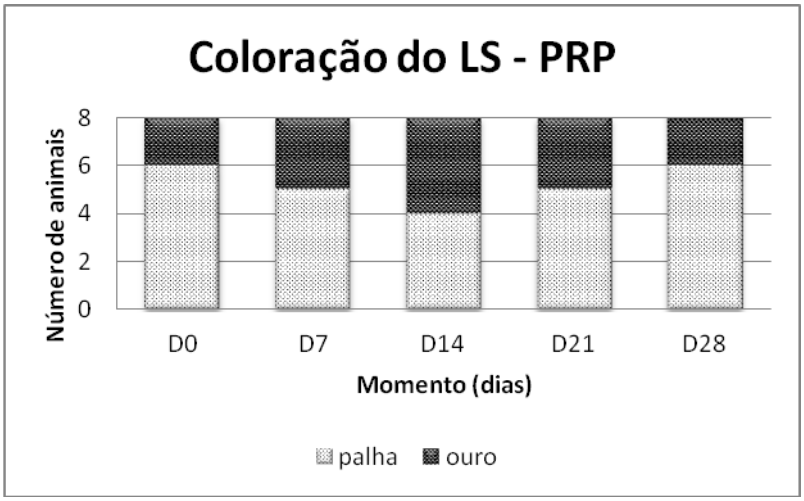



Tabela 4 – Aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| **2** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **3** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **4** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| **5** | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **6** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **7** | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **8** | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 |
| **Mediana** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |

Legenda: límpido=1; semi-turvo=2; turvo=3; não houve diferença estatística entre grupos ou momentos(P>0,05)

Figura 4 – Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

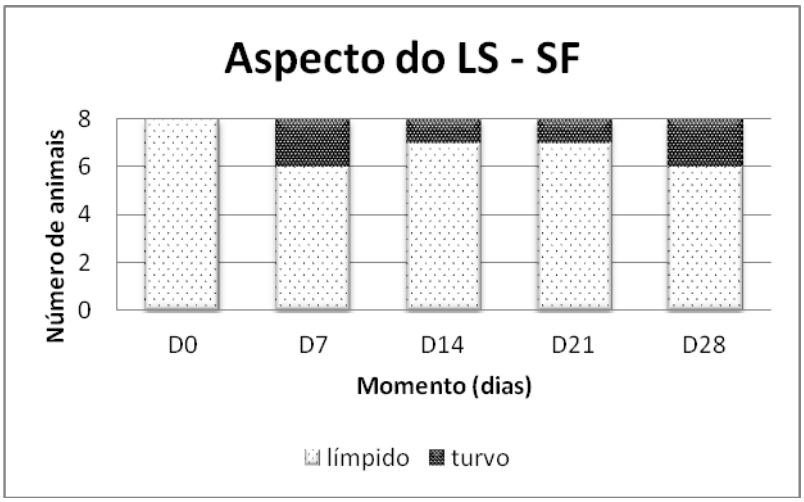
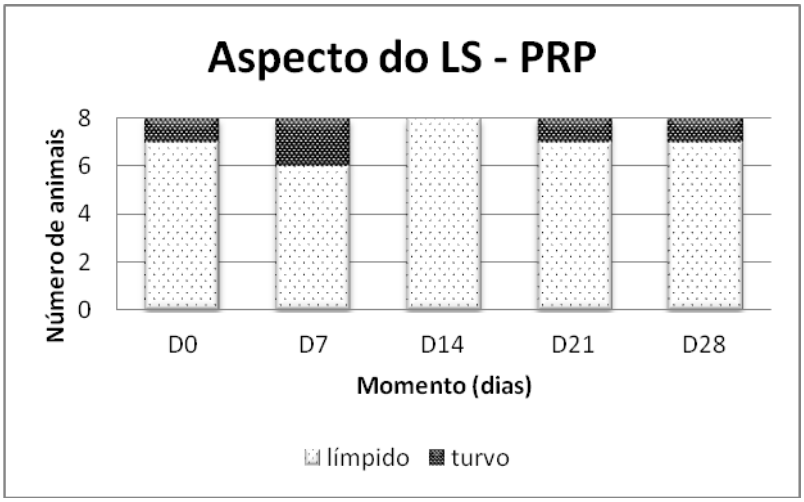


Figura 5 – Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012




Com relação à viscosidade, não houve diferença entre os grupos. Houve diferença entre os momentos 0 e 7; 0 e 21 dias no grupo que recebeu PRP, diminuindo a quantidade de animais com viscosidade ótima no 7° e no 21° dia (P<0,05) (Tabela 5 e Figuras 6 e 7).

Tabela 5 – Viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , sendo < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | **PRP** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **D0** | **D7** | **D14** | **D21** | **D28** | **D0** | **D7** | **D14** | **D21** | **D28** |
| **1** | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| **2** | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| **3** | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| **4** | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| **5** | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 |
| **6** | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| **7** | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| **8** | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 |
| **Mediana** | **3** | **3** | **3** | **3** | **3** | **3a** | **2b** | **2,5ab** | **2b** | **3ab** |

Legenda: <2 = 1; 2 a 5 = 2; >5 =3; letras minúsculas distintas diferem estatisticamente (P<0,05).

Figura 6 – Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF, sendo < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima – São Paulo - 2011-2012

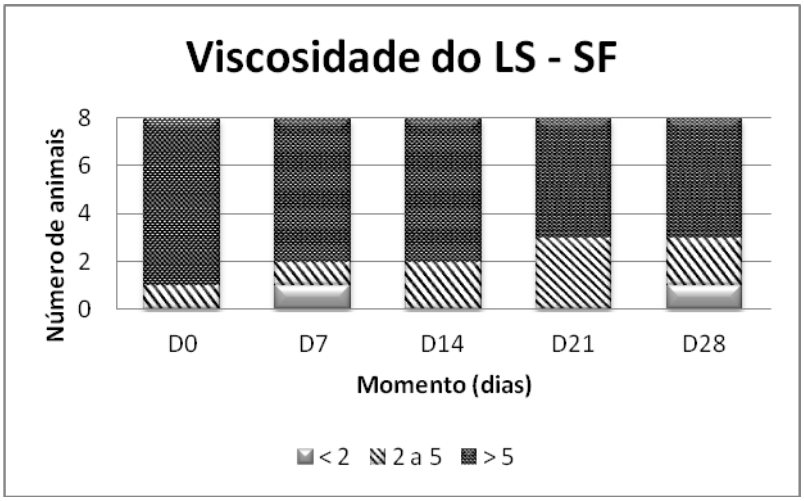
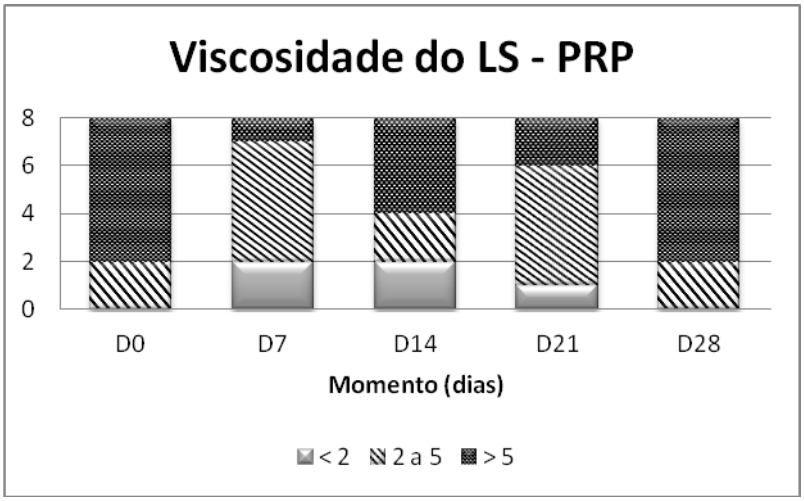



Figura 7 – Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP , sendo < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima – São Paulo - 2011-2012




6.1.3.2 Teste do precipitado de mucina

Não houve diferença entre os grupos em relação ao precipitado de mucina. Contudo, observa-se piora na qualidade da mucina entre os momentos 0 e 14 dias no grupo que recebeu PRP ($P < 0,05$) (Tabela 6 e Figuras 8 e 9).

Tabela 6 – Teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular, sendo 1-bom, 2-regular, 3-ruim – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | **PRP** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 |
| **2** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 |
| **3** | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| **4** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **5** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **6** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| **7** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| **8** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 |
| **Mediana** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1a | 1ab | 2b | 1ab | 1ab |

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença significativa (P>0,05). Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento (P>0,05).

Figura 8 – Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular, sendo 1-bom, 2-regular, 3-ruim – São Paulo - 2011-2012

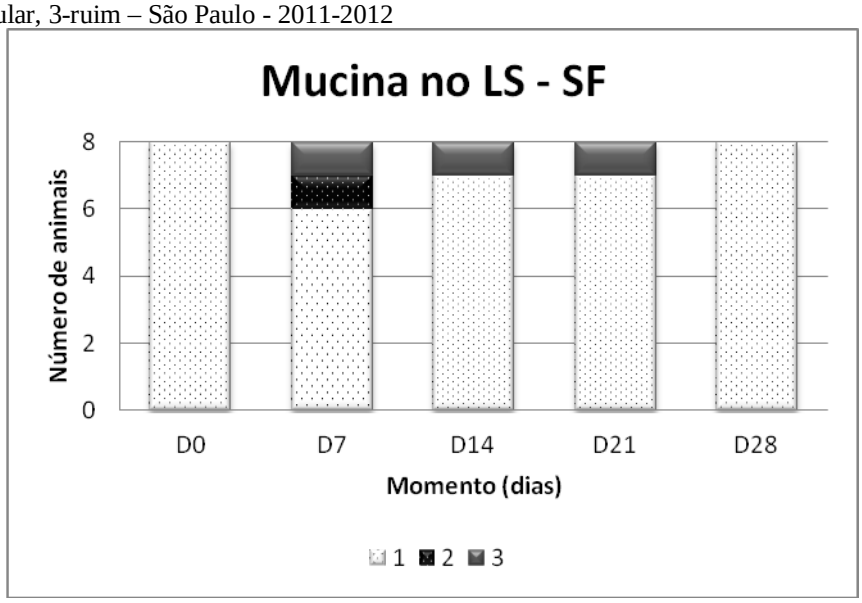
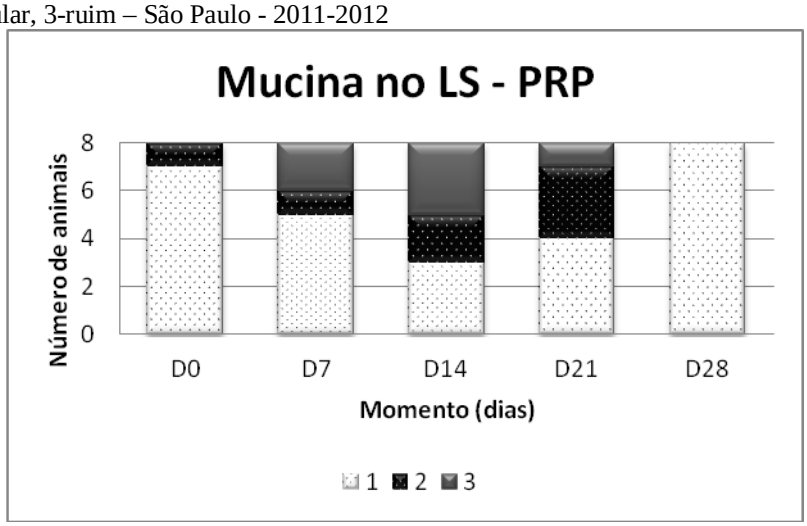


Figura 9 – Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular, sendo 1-bom, 2-regular, 3-ruim – São Paulo - 2011-2012




6.1.3.3 Contagem total de células no LS

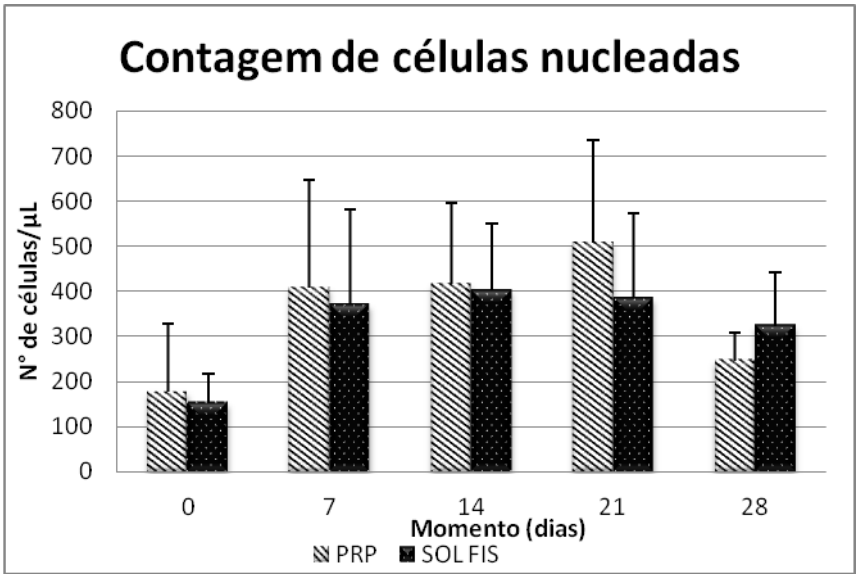
Não houve diferença no número de células nucleadas do LS entre os grupos, nos diferentes momentos. Quando comparados os diferentes momentos no mesmo grupo, notou-se aumento do número de células nos dias 7, 14 e 21 em relação ao dia 0 (P<0,05) no grupo PRP, bem como aumento celular nos momentos 7, 14, 21 e 28 dias em relação ao momento 0 no grupo que recebeu SF (P<0,05) (Tabela 7 e Figura 10).

Tabela 7 – Contagem celular (células/µL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | **PRP** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 165 | 800 | 297,5 | 730 | 440 | 437,5 | 667,5 | 450 | 442,5 | 177,5 |
| **2** | 155 | 425 | 450 | 300 | 370 | 75 | 127,5 | 450 | 450 | 200 |
| **3** | 77,5 | 300 | 600 | 490 | 447,5 | 77,5 | 500 | 317,5 | 950 | 287,5 |
| **4** | 65 | 197,5 | 277,5 | 172,5 | 130 | 100 | 280 | 375 | 205 | 200 |
| **5** | 197,5 | 345 | 202,5 | 167,5 | 280 | 350 | 632,5 | 390 | 635 | 240 |
| **6** | 105 | 375 | | 312,5 | 225 | 80 | 560 | 380 | 465 | 365 |
| **7** | 240 | 150 | 555 | 472,5 | 375 | 117,5 | 85 | 167,5 | 312,5 | 225 |
| **8** | 217,5 | | 435 | 435 | | | | 800 | 600 | 280 |
| **Média** | 152,81a | 370,36b | 402,50b | 385,00b | 323,92b | 176,78a | 407,50b | 416,25b | 507,50b | 246,88ab |
| **DP** | 65,03 | 212,77 | 148,45 | 187,14 | 117,47 | 151,09 | 241,07 | 179,23 | 226,62 | 61,45 |

Letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística dentro do mesmo grupo (P<0,05). Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento (P>0,05).

Figura 10 – Contagem média e desvio padrão de células nucleadas do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012




Não houve diferença na porcentagem de células mononucleares e polimorfonucleares do LS entre os grupos, nos diferentes momentos (Tabelas 8 e 9, Figuras 11 e 12).

Tabela 8 – Porcentagem de células mononuclueares do LS (%) obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 100 | 98 | 98 | 97 | 100 | 99 | 100 | 97 | 100 | 99 |
| **2** | 91 | 94 | 89 | 100 | 97 | 100 | 90 | 100 | 100 | 86 |
| **3** | 100 | 85 | 70 | 94 | 98 | 100 | 100 | 100 | 63 | 100 |
| **4** | 100 | 95 | 90 | 88 | 97 | 100 | 95 | 84 | 100 | 86 |
| **5** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96 | 98 | 100 | 100 | 95 |
| **6** | 97 | 99 | 100 | 98 | 100 | 100 | 98 | 100 | 100 | 97 |
| **7** | 93 | 100 | 95 | 95 | 95 | 90 | 93 | 100 | 100 | 97 |
| **8** | 100 | 70 | 86 | 100 | 100 | 100 | 67 | 74 | 80 | 96 |
| **Média** | 98 | 93 | 91 | 97 | 98 | 98 | 93 | 94 | 93 | 95 |
| **DP** | 4 | 10 | 10 | 4 | 2 | 4 | 11 | 10 | 14 | 5 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento e entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 11 – Porcentual médio e desvio padrão de células mononucleares do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

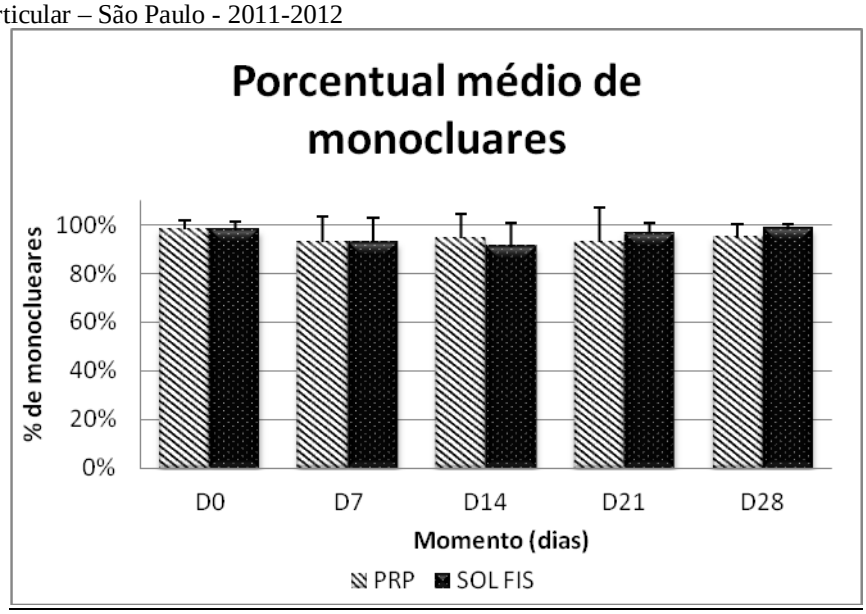
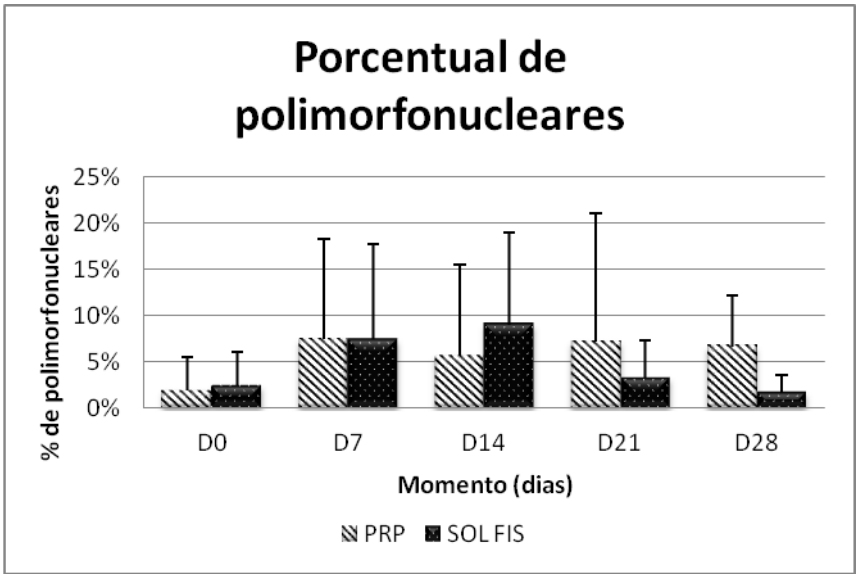



Tabela 9 – Porcentagem de células polimorfonucleares do LS (%) obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 0 | 2 | 2 | 3 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 10 |
| **2** | 9 | 6 | 11 | 0 | 3 | 0 | 10 | 0 | 0 | 14 |
| **3** | 0 | 15 | 30 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 37 | 0 |
| **4** | 0 | 5 | 10 | 12 | 3 | 0 | 5 | 16 | 0 | 14 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 0 | 0 | 5 |
| **6** | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| **7** | 7 | 0 | 5 | 5 | 5 | 10 | 7 | 0 | 0 | 3 |
| **8** | 0 | 30 | 14 | 0 | 0 | 0 | 33 | 26 | 20 | 4 |
| **Média** | 2 | 7 | 9 | 3 | 2 | 2 | 7 | 6 | 7 | 7 |
| **DP** | 4 | 10 | 10 | 4 | 2 | 4 | 11 | 10 | 14 | 5 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento e entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 12 – Porcentual médio e desvio padrão de células polomorfonucleares do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012




6.1.3.4 Determinação de ureia do LS

A quantidade de ureia (mg/dL) foi obtida e utilizada para corrigir os valores de GAGs e citocinas no LS (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de ureia (mg/dL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | **PRP** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 34,5 | 40,2 | 31 | 37,2 | 32,5 | 29,2 | 37,4 | 33,9 | 40,7 | 33,3 |
| **2** | 43,4 | 44,8 | 43 | 36,6 | 36,9 | 47,9 | 42,1 | 43,2 | 42,4 | 36,6 |
| **3** | 41,4 | 37,7 | 40,3 | 41,4 | 44,2 | 41 | 38,4 | 32,1 | 40,2 | 42,5 |
| **4** | 55 | 43,3 | 48 | 47,5 | 38,1 | 48,4 | 44,6 | 49,8 | 49,4 | 50 |
| **5** | 36,7 | 40,1 | 41,1 | 40,1 | 39,5 | 36,8 | 38,1 | 46,4 | 40,7 | 42 |
| **6** | 39,7 | 31,7 | 30,7 | 28,1 | 25,9 | 40,1 | 29,6 | 31,7 | 34,4 | 34,3 |
| **7** | 49,4 | 28,6 | 36,8 | 37,3 | 41,9 | 34,4 | 38,7 | 34,3 | 35,9 | 35,6 |
| **8** | 38,5 | 35,6 | 36,1 | 38,7 | 38,4 | 39,7 | 38,4 | 38,4 | 42 | 37 |
| **Média** | 42,3 | 37,8 | 38,4 | 38,4 | 37,2 | 39,7 | 38,4 | 38,7 | 40,7 | 38,9 |
| **DP** | 6,8 | 5,6 | 5,9 | 5,4 | 5,7 | 6,5 | 4,3 | 6,9 | 4,5 | 5,6 |

Não foi observada diferença estatística entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

### 6.1.3.5 Determinação de IL-1β, IL1ra, TNF-α e $PGE_2$ do LS

Não houve diferença nos valores de IL-1β, IL-1ra, TNF-α e $PGE_2$ entre os grupos e entre os momentos dentro do mesmo grupo (Tabelas 11 a 17 e Figuras 13 a 18).

Com relação a IL-1 β, valores baixos foram encontrados no grupo PRP, enquanto no grupo SF, os valores da amostra ficaram abaixo da curva padrão do *kit* utilizado.

Tabela 11 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | **PRP** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,00 | 0 | 0,70 | 0,41 | 0 |
| **2** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8,80 | 0 | 0 | 0 |
| **3** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,41 | 0 | 4,25 | 0 | 0,41 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,23 | 0 | 1,12 | 0 | 0 |
| **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **7** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,41 | 0,23 | 3,19 | 5,25 | 5,55 |
| **8** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Média** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,51 | 1,13 | 1,16 | 0,71 | 0,75 |
| **DP** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,7 | 3,1 | 1,6 | 1,8 | 1,9 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 13 – Valores, média e desvio padrão, de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

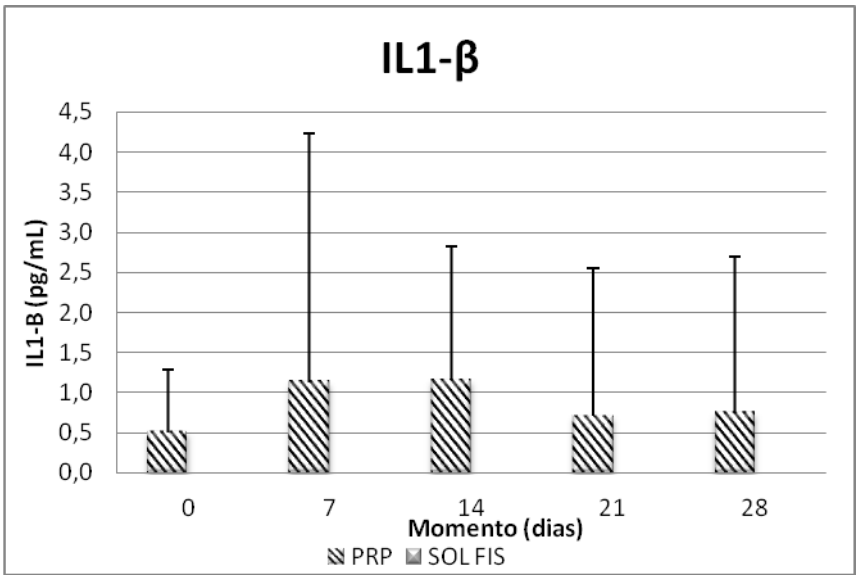


Tabela 12 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6,88 | 0 | 2,09 | 1,01 | 0 |
| **2** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20,91 | 0 | 0 | 0 |
| **3** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,93 | 0 | 8,54 | 0 | 0,83 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,64 | 0 | 2,42 | 0 | 0 |
| **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **7** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,20 | 0,61 | 9,30 | 14,65 | 15,60 |
| **8** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Média** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,46 | 2,69 | 2,79 | 1,96 | 2,05 |
| **DP** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,4 | 7,4 | 3,9 | 5,1 | 5,5 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 14 – Valores, média e desvio padrão, de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

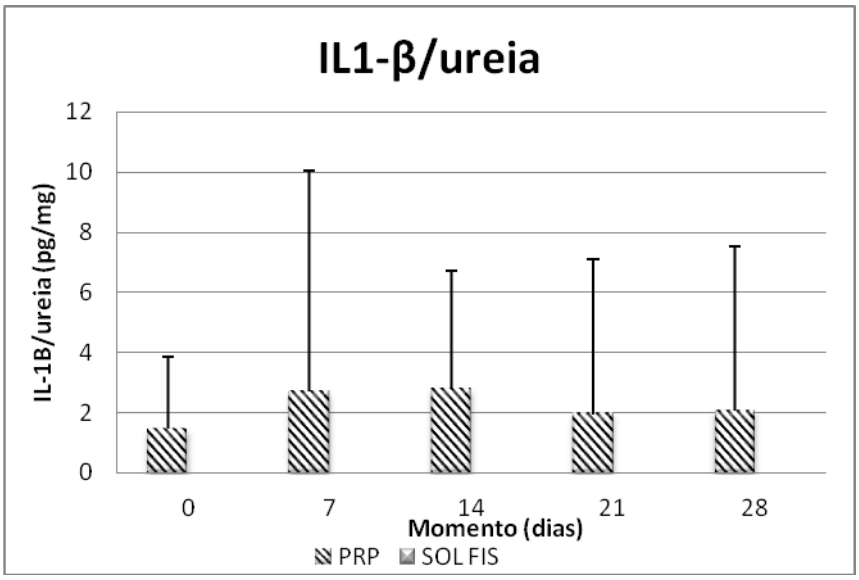


Tabela 13 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL1-ra (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **2** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **3** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **7** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **8** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Média** | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **DP** | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Tabela 14 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **2** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **3** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **7** | 351,04 | 166,23 | 291,66 | 375,12 | 672,17 | 288,92 | 214,17 | 171,37 | 314,79 | 231,51 |
| **8** | 2,95 | | 0 | | 3,19 | 87,24 | | 1,33 | | 0 |
| **Média** | 44,25 | 23,75 | 36,46 | 53,59 | 84,42 | 47,02 | 30,60 | 21,59 | 44,97 | 28,94 |
| **DP** | 123,9 | 62,8 | 103,1 | 141,7 | 237,4 | 102,4 | 80,9 | 60,5 | 118,9 | 81,8 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 15 – Valores, média e desvio padrão, de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

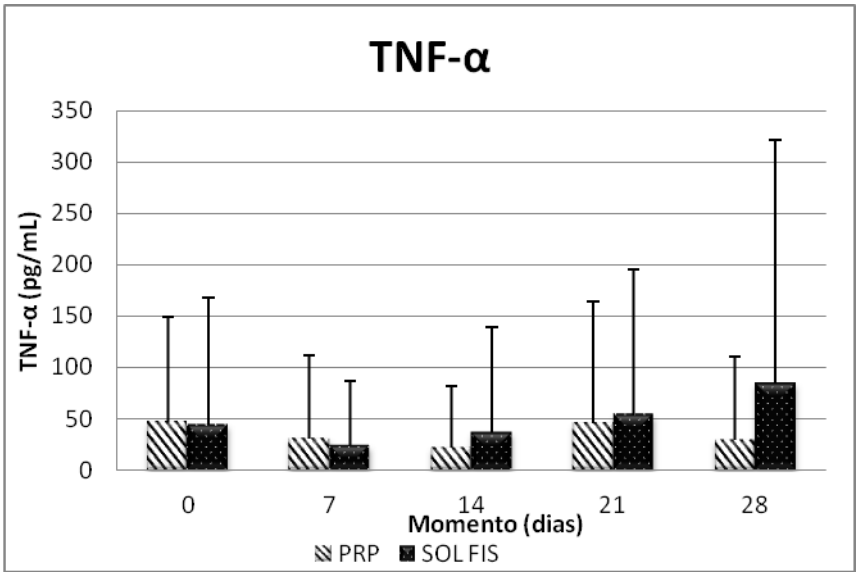



Tabela 15 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **2** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **3** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **7** | 710,63 | 581,24 | 792,56 | 1005,71 | 1604,24 | 839,89 | 553,41 | 499,62 | 876,87 | 650,33 |
| **8** | 7,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 8,31 | 219,75 | 0,00 | 3,49 | 0,00 | 0,00 |
| **Média** | 89,79 | 72,66 | 99,07 | 125,71 | 201,57 | 132,46 | 69,18 | 62,89 | 109,61 | 81,29 |
| **DP** | 250,87 | 205,50 | 280,21 | 355,57 | 566,77 | 296,01 | 195,66 | 176,47 | 310,02 | 229,93 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 16 – Valores, média e desvio padrão, de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

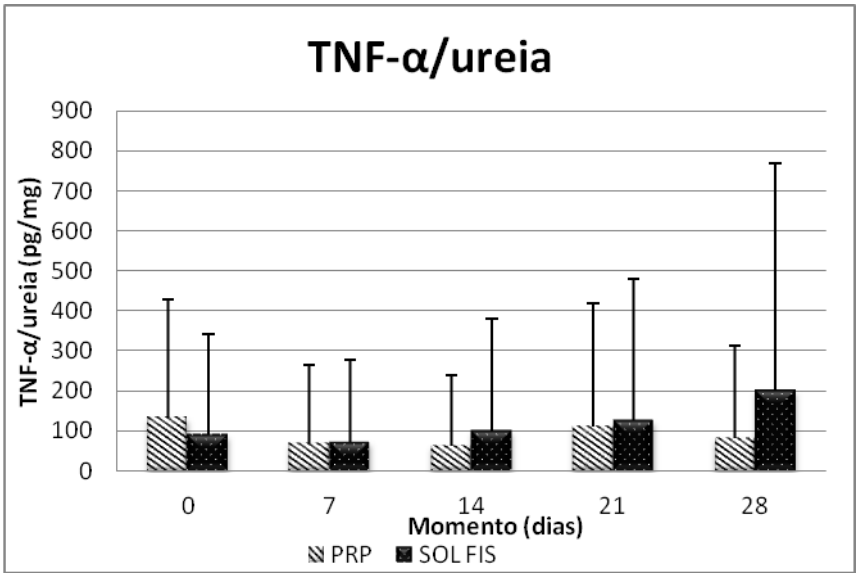



Tabela 16 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de $PGE_2$ (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 3,5 | 25,06 | 34,42 | 59,97 | 35,63 | 17,72 | 32,65 | 100,59 | 30,84 | 21,6 |
| **2** | 2,14 | 6,67 | 19,05 | 5,85 | 9,35 | 3,01 | 7,54 | 11,41 | 15,65 | 6,23 |
| **3** | 5,21 | 149,9 | 37,99 | 17,17 | 23,19 | 13,42 | 48,6 | 35,51 | 104,78 | 14,5 |
| **4** | 15,31 | 16,15 | 17,4 | 18,08 | 20,07 | 11,1 | 5,81 | 18,83 | 16 | 22,96 |
| **5** | 24,51 | 11,71 | 15,18 | 19,21 | 16,95 | 19,12 | 23,11 | 21,6 | 18,35 | 50,08 |
| **6** | 3,92 | 5,67 | 10,72 | 33,5 | 41,95 | 7,12 | 25,8 | 15,28 | 17,68 | 28,45 |
| **7** | 23,57 | 11,87 | 13,72 | 19,52 | 19,05 | 7,3 | 17,05 | 13,81 | 11,16 | 16,32 |
| **8** | 16,79 | 17,8 | 10,52 | 6,39 | 22,17 | 66,94 | 34,52 | 51,95 | 25,06 | 2,7 |
| **Média** | 11,87 | 30,60 | 19,88 | 22,46 | 23,55 | 18,22 | 24,39 | 33,62 | 29,94 | 20,36 |
| **DP** | 9,3 | 48,6 | 10,5 | 17,4 | 10,4 | 20,4 | 14,3 | 30,2 | 30,8 | 14,7 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 17 – Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$ (pg/mL) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

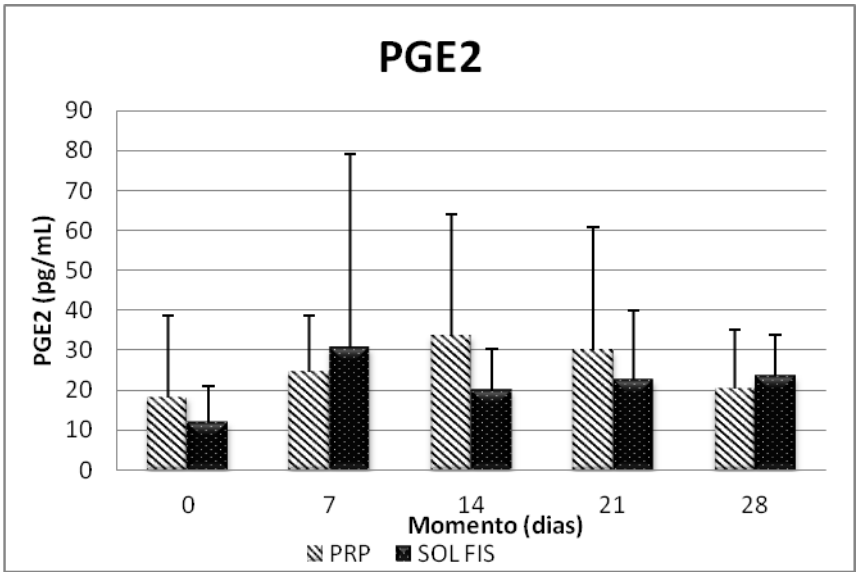
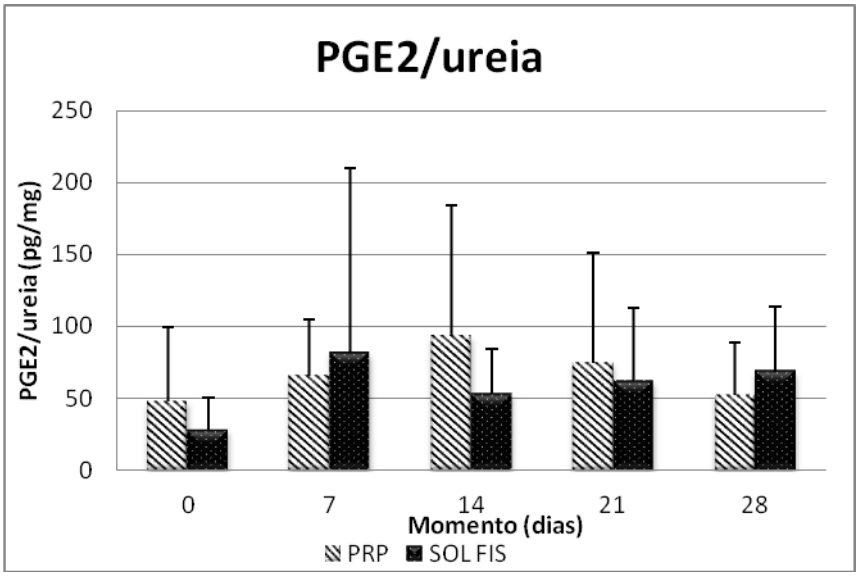



Tabela 17 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo, 2013.

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 10,14 | 62,34 | 111,03 | 161,21 | 109,63 | 60,68 | 87,30 | 296,73 | 75,77 | 64,86 |
| **2** | 4,93 | 14,89 | 44,30 | 15,98 | 25,34 | 6,28 | 17,91 | 26,41 | 36,91 | 17,02 |
| **3** | 12,58 | 397,61 | 94,27 | 41,47 | 52,47 | 32,73 | 126,56 | 110,62 | 260,65 | 34,12 |
| **4** | 27,84 | 37,30 | 36,25 | 38,06 | 52,68 | 22,93 | 13,03 | 37,81 | 32,39 | 45,92 |
| **5** | 66,78 | 29,20 | 36,93 | 47,91 | 42,91 | 51,96 | 60,66 | 46,55 | 45,09 | 119,24 |
| **6** | 9,87 | 17,89 | 34,92 | 119,22 | 161,97 | 17,76 | 87,16 | 48,20 | 51,40 | 82,94 |
| **7** | 47,71 | 41,50 | 37,28 | 52,33 | 45,47 | 21,22 | 44,06 | 40,26 | 31,09 | 45,84 |
| **8** | 43,61 | 50,00 | 29,14 | 16,51 | 57,73 | 168,61 | 89,90 | 135,29 | 59,67 | 7,30 |
| **Média** | 27,93 | 81,34 | 53,02 | 61,59 | 68,52 | 47,77 | 65,82 | 92,73 | 74,12 | 52,16 |
| **DP** | 22,5 | 128,7 | 31,2 | 51,5 | 44,8 | 52,0 | 39,2 | 91,0 | 76,8 | 36,3 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 18 – Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP e SF – São Paulo - 2011-2012




6.1.3.6 Determinação de GAGs do LS

Não houve diferença entre os valores de AH e CS, com e sem a correção por ureia, entre os grupos e entre os momentos dentro do mesmo grupo (Tabela 18 a 21, Figuras 19 a 22), quando densitometradas as lâminas de eletroforese em gel de agarose (Figuras 23 e 24).

Tabela 18 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | **PRP** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 523,28 | 468,81 | 415,57 | 496,37 | 444,04 | 721,29 | 597,32 | 316,37 | 542,77 | 593,93 |
| **2** | 181,67 | 221,72 | 242,55 | 337,01 | 202,97 | 471,82 | 364,76 | 415,61 | 387,72 | 471,84 |
| **3** | 369,48 | 228,81 | 604,08 | 572,99 | 498,33 | 245,65 | 509,56 | 426,14 | 481,26 | 501,21 |
| **4** | 565,21 | 503,39 | 584,35 | 580,81 | 691,00 | 193,42 | 340,21 | 536,88 | 505,43 | 197,62 |
| **5** | 333,66 | 553,83 | 566,41 | 517,86 | 567,46 | 628,09 | 611,08 | 507,30 | 621,81 | 242,60 |
| **6** | 766,90 | 546,20 | 537,69 | 322,63 | 398,98 | 763,98 | 824,09 | 666,27 | 705,75 | 742,84 |
| **7** | 517,85 | 499,92 | 520,45 | 356,34 | 298,29 | 655,32 | 626,91 | 596,40 | 560,27 | 537,40 |
| **8** | 260,68 | 356,92 | 271,96 | 392,54 | 264,95 | 906,59 | 1402,01 | 463,49 | 1396,00 | 296,03 |
| **Média** | 439,84 | 422,45 | 467,88 | 447,07 | 420,75 | 573,27 | 659,49 | 491,06 | 650,13 | 447,94 |
| **DP** | 189,2 | 135,9 | 142,1 | 106,9 | 164,0 | 251,0 | 337,4 | 110,4 | 315,8 | 188,0 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 19 – Valores, média e desvio padrão, de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

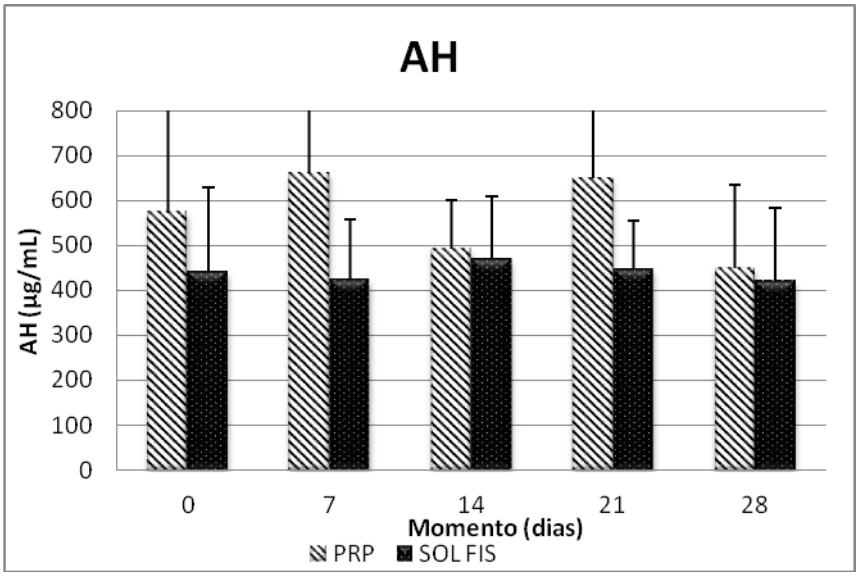



Tabela 19 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação AH/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 1,5 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | 2,5 | 1,6 | 0,9 | 1,3 | 1,8 |
| **2** | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,9 | 0,6 | 1,0 | 0,9 | 1,0 | 0,9 | 1,3 |
| **3** | 0,9 | 0,6 | 1,5 | 1,4 | 1,1 | 0,6 | 1,3 | 1,3 | 1,2 | 1,2 |
| **4** | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,8 | 0,4 | 0,8 | 1,1 | 1,0 | 0,4 |
| **5** | 0,9 | 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,4 | 1,7 | 1,6 | 1,1 | 1,5 | 0,6 |
| **6** | 1,9 | 1,7 | 1,8 | 1,1 | 1,5 | 1,9 | 2,8 | 2,1 | 2,1 | 2,2 |
| **7** | 1,0 | 1,7 | 1,4 | 1,0 | 0,7 | 1,9 | 1,6 | 1,7 | 1,6 | 1,5 |
| **8** | 0,7 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,7 | 2,3 | 3,7 | 1,2 | 3,3 | 0,8 |
| **Média** | 1,12 | 1,09 | 1,29 | 1,22 | 1,31 | 1,34 | 1,49 | 1,25 | 1,34 | 1,23 |
| **DP** | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,7 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 20 – Valores de AH/ureia do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

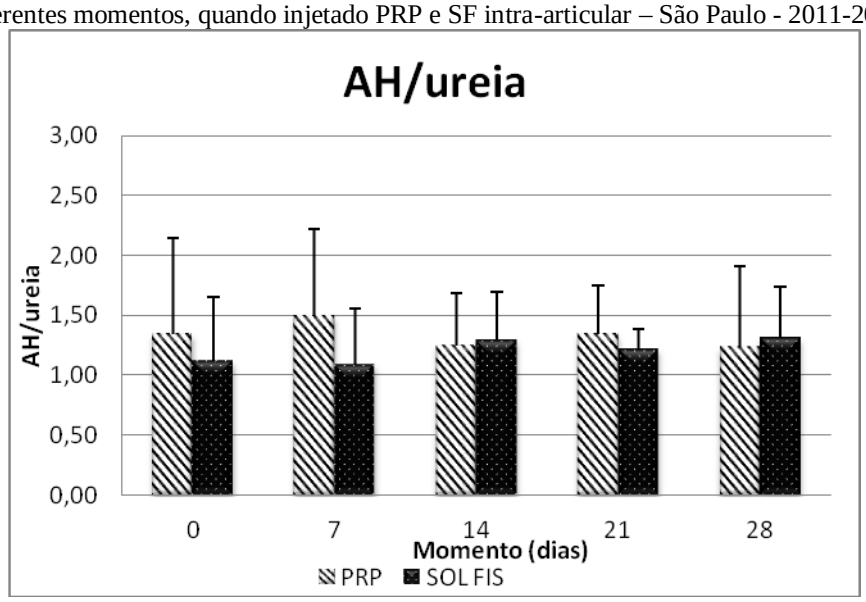



Tabela 20 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 27,91 | 28,61 | 60,86 | 26,94 | 22,84 | 22,12 | 41,23 | 18,83 | 26,97 | 21,36 |
| **2** | 46,06 | 48,59 | 38,88 | 38,81 | 39,37 | 17,31 | 22,42 | 28,25 | 32,20 | 54,14 |
| **3** | 69,37 | 51,08 | 40,56 | 49,71 | 38,47 | 149,33 | 46,36 | 37,31 | 54,12 | 31,02 |
| **4** | 27,50 | 26,13 | 24,97 | 36,70 | 34,16 | 52,27 | 30,35 | 51,25 | 33,62 | 43,23 |
| **5** | 88,07 | 36,09 | 21,14 | 38,80 | 38,81 | 51,16 | 58,71 | 29,57 | 40,21 | 140,79 |
| **6** | 37,77 | 24,53 | 20,05 | 19,40 | 18,31 | 31,38 | 66,67 | 39,22 | 50,81 | 38,03 |
| **7** | | | | | | | | | | |
| **8** | 247,11 | 58,17 | 134,32 | 29,80 | 142,96 | 139,72 | 95,44 | 25,27 | 55,51 | 19,20 |
| **Média** | 77,69 | 39,03 | 48,68 | 34,31 | 47,85 | 66,18 | 51,60 | 32,81 | 41,92 | 49,68 |
| **DP** | 77,9 | 13,5 | 40,3 | 9,8 | 42,7 | 55,2 | 24,6 | 10,6 | 11,5 | 41,9 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 21 – Valores de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

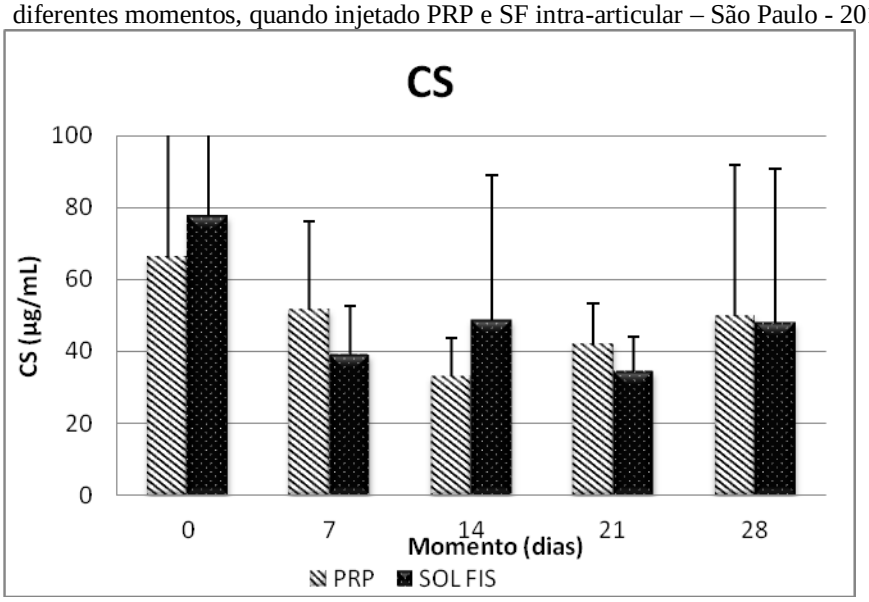



Tabela 21 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | PRP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 | D0 | D7 | D14 | D21 | D28 |
| **1** | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **2** | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **3** | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **4** | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **5** | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,3 |
| **6** | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **7** | | | | | | | | | | |
| **8** | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **Média** | 0,12 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,13 | 0,12 | 0,09 | 0,10 | 0,14 |
| **DP** | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 22 – Valores de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

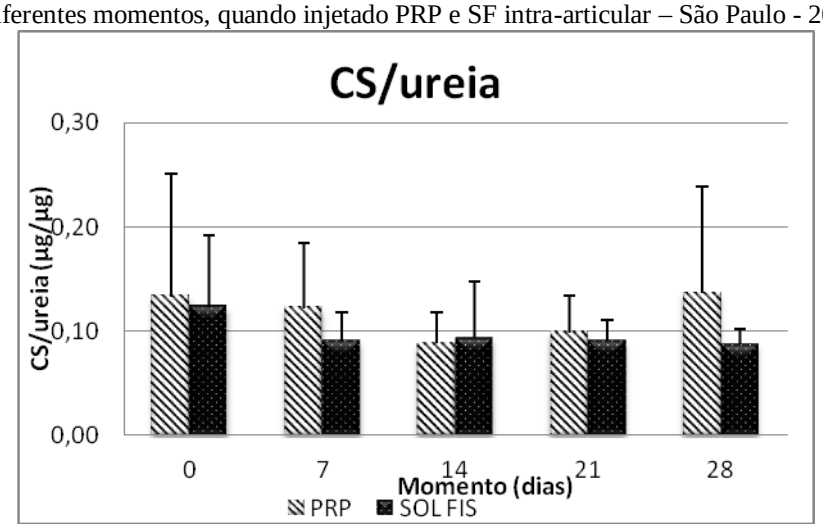



Figura 23 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs de LS de articulação hígida, após injeção de SF. P1: mistura padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5µg cada; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo, 2011-2012

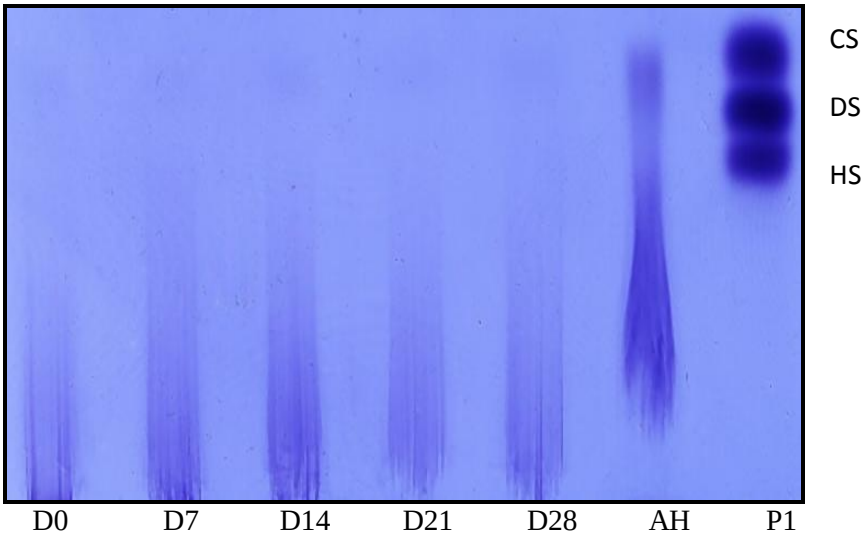
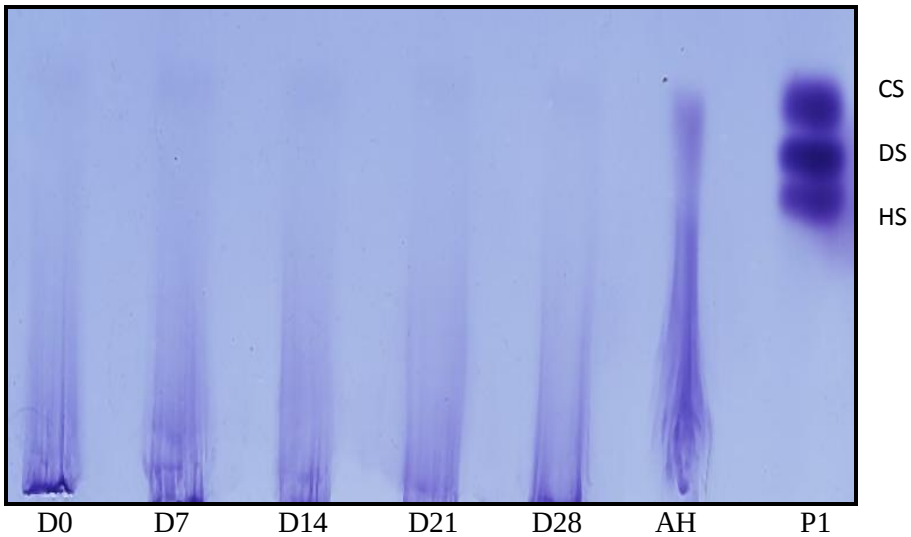


Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs de LS de articulação hígida, após injeção de PRP. P1: mistura padrão de GAGs contendo CS, DS e HS, 5µg cada; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo, 2011-2012




### 6.1.4 Exame ultrassonográfico

Como foram utilizados animais com as articulações metacarpofalageanas hígidas, estes não apresentavam alterações com relação à: espessura, inserção e aspecto da cápsula articular, estando todos enquadrados nas classificações O, R e U respectivamente; os ligamentos mantiveram-se com aspecto e inserção íntegros (Z e C1, respectivamente); a cartilagem articular apresentou-se bem definida (F1); o osso subcondral com superfície lisa (J1) e osteófitos não foram identificados (M1). Esses aspectos ultrassonográficos não mudaram durante todo experimento, em ambos os grupos.

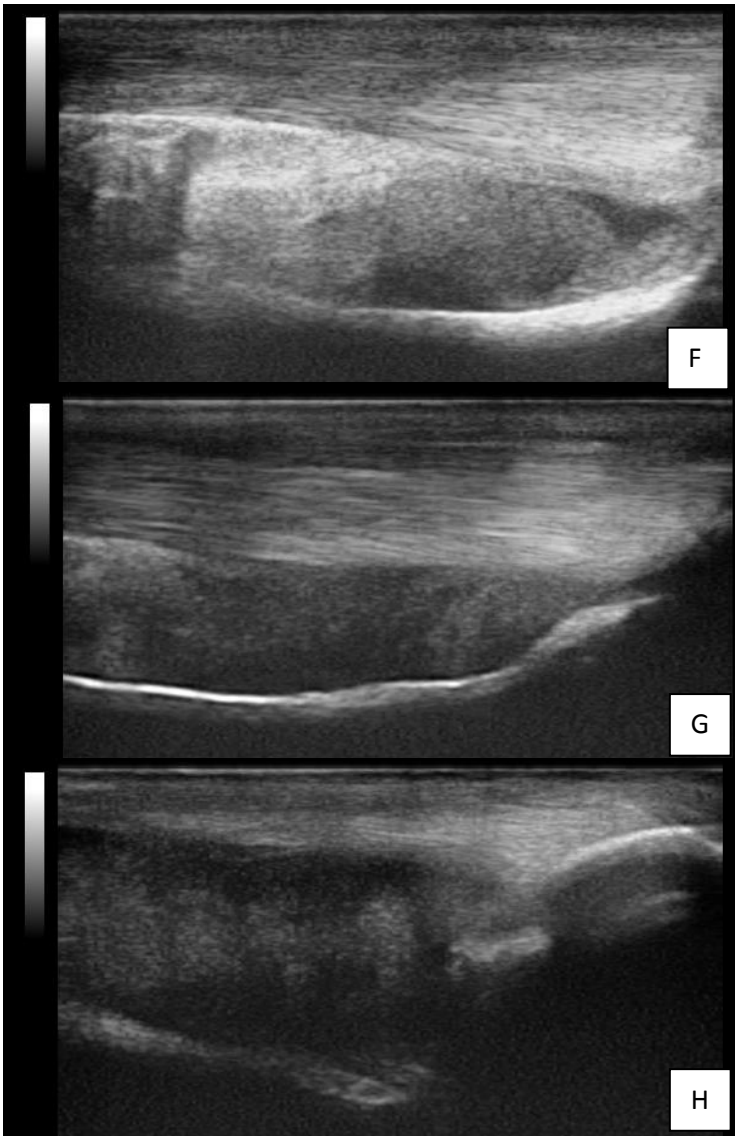
Avaliações ultrassonográficas obtidas quanto ao aspecto e qualidade do LS e vascularização da membrana sinovial, mudaram no decorrer do experimento (Figuras 25 e 26).

Quanto ao aspecto do LS, não houve diferença entre os grupos, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo ($P>0,05$) (Figuras 27 e 28).

Quanto à quantidade de LS, não houve diferença entre os grupos. Entre os momentos do grupo que recebeu SF também não houve diferença. No grupo que recebeu PRP, houve aumento da quantidade de LS nos dias 14 e 28 quando comparados ao dia 0 ($P<0,05$) (Figuras 29 e 30).

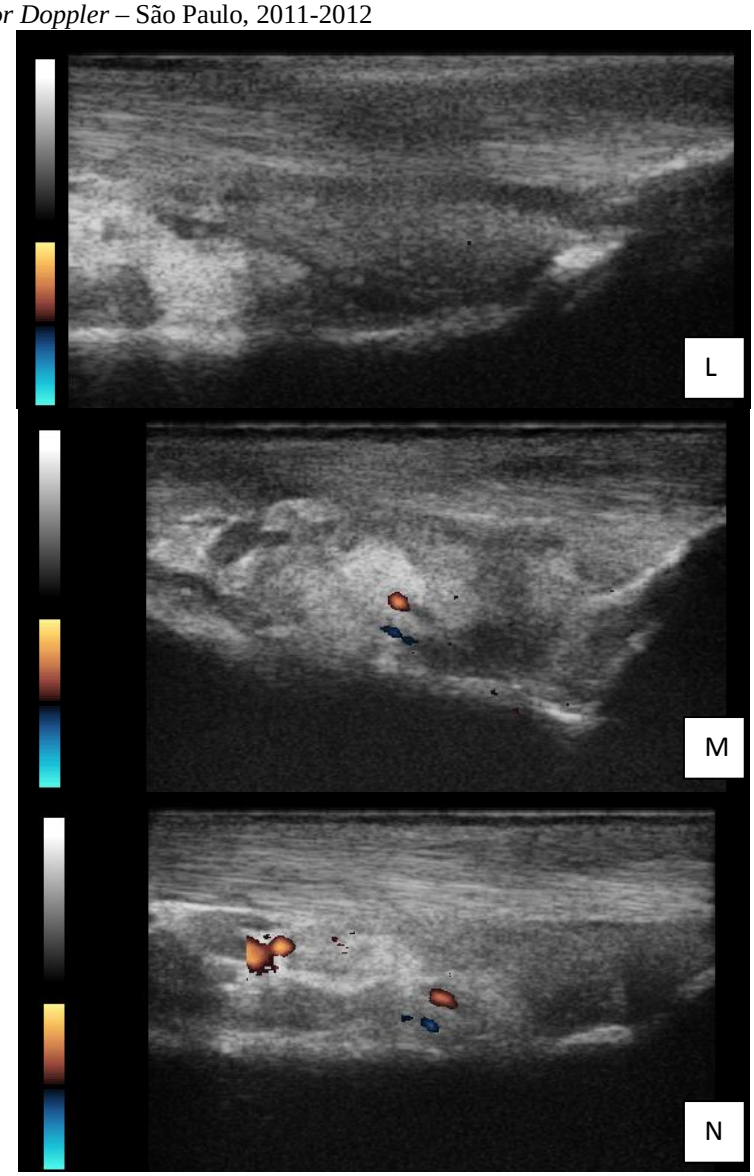
Com relação à vascularização da membrana sinovial, não houve diferença entre os grupos, porém houve aumento da vascularização no dia 14 quando comparado ao dia 0 do grupo que recebeu PRP (P<0,05) (Figuras 31 e 32).

Figura 25 – Imagens ultrassonográficas do recesso medial com líquido anecóico e material amorfo – São Paulo - 2011-2012



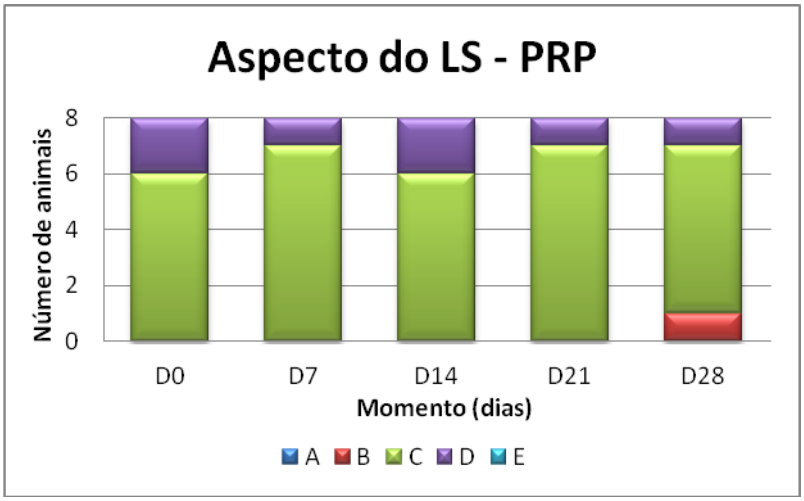

Legenda: F - sem alteração; G - quantidade aumentada em até metade do volume fisiológico; H - quantidade aumentada em até o dobro do volume fisiológico

Figura 26 – Imagens ultrassonográficas do recesso medial com líquido anecóico e material amorfo, e avaliação em *Color Doppler* – São Paulo, 2011-2012



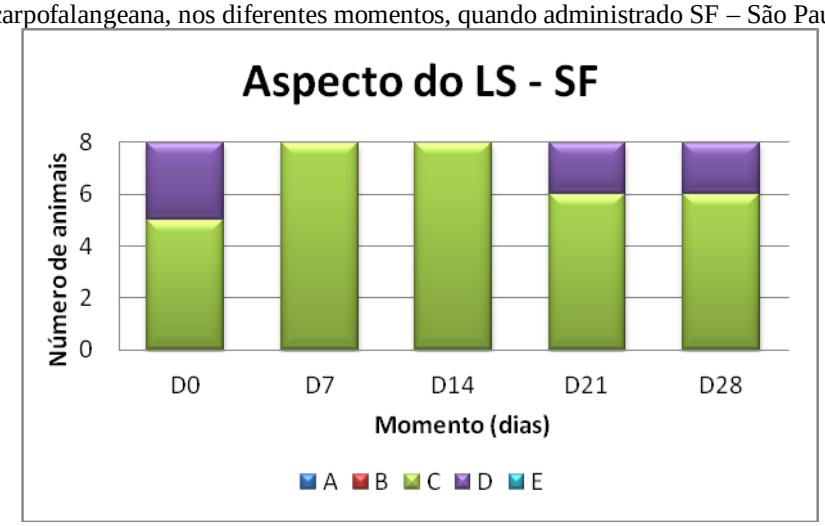

Legenda: L - sem observação de fluxo articular; M - vascularização visível ou pontos coloridos esparsos e em pequena quantidade; N - vascularização aumentada ou pontos coloridos em blocos e em grande quantidade no mesmo animal

Figura 27 – Número de animais de acordo com o aspecto do LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP – São Paulo – 2011-2012



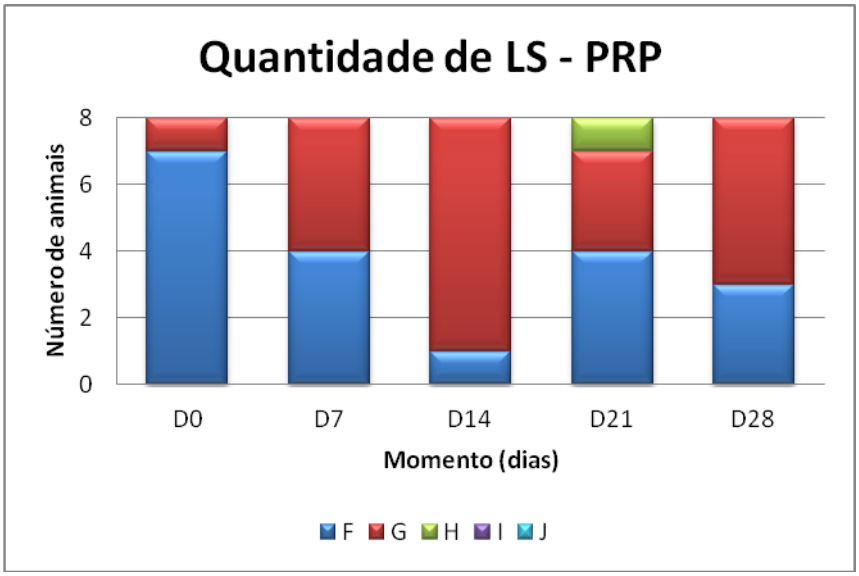

Legenda: A - anecóico, em quantidade normal; B - efusão sinovial anecóica; C - heterogêneo predominando líquido anecóico; D - predomínio de material amorfo heterogêneo e líquido anecóico; E - material amorfo heterogêneo e/ou líquido com material denso e com focos hiperreflexivos em suspensão

Figura 28 – Número de animais de acordo com o aspecto do LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado SF – São Paulo – 2011-2012



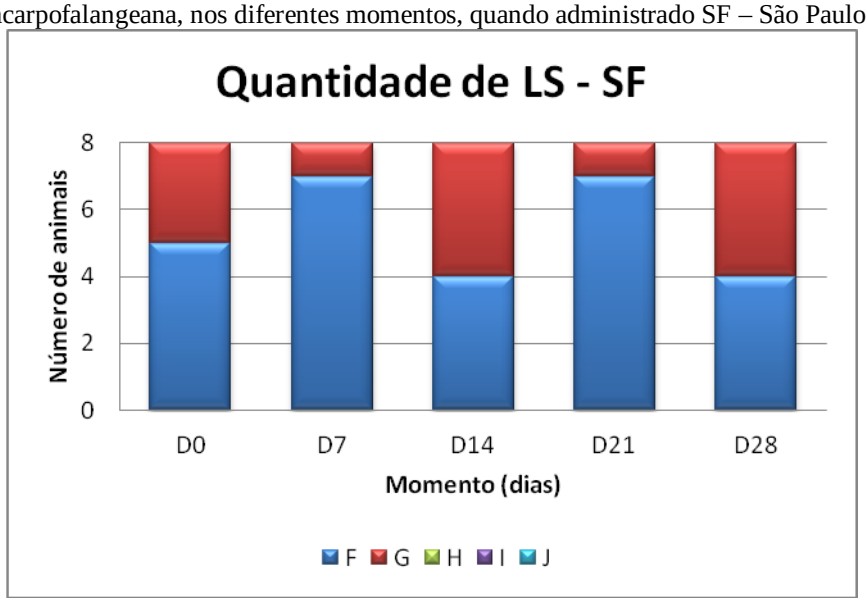

Legenda: A - anecóico, em quantidade normal; B - efusão sinovial anecóica; C - heterogêneo predominando líquido anecóico; D - predomínio de material amorfo heterogêneo e líquido anecóico; E - material amorfo heterogêneo e/ou líquido com material denso e com focos hiperreflexivos em suspensão

Figura 29 – Número de animais de acordo com a quantidade de LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP – São Paulo – 2011-2012



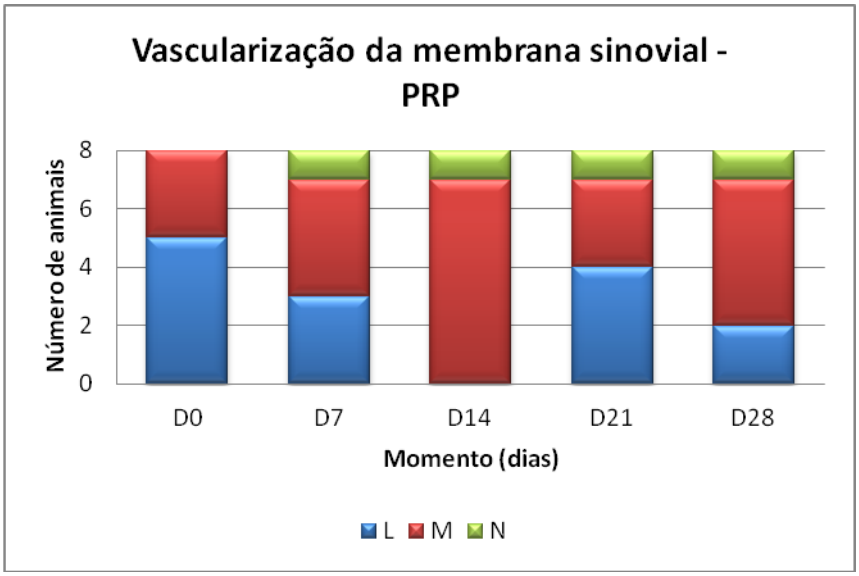

Legenda:F - sem alteração; G - quantidade aumentada em até metade do volume fisiológico; H - quantidade aumentada em até o dobro do volume fisiológico; I - quantidade aumentada em mais que o dobro do volume fisiológico; J - quantidade aumentada em três vezes ou mais do volume fisiológico

Figura 30 – Número de animais de acordo com a quantidade de LS observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado SF – São Paulo – 2011-2012



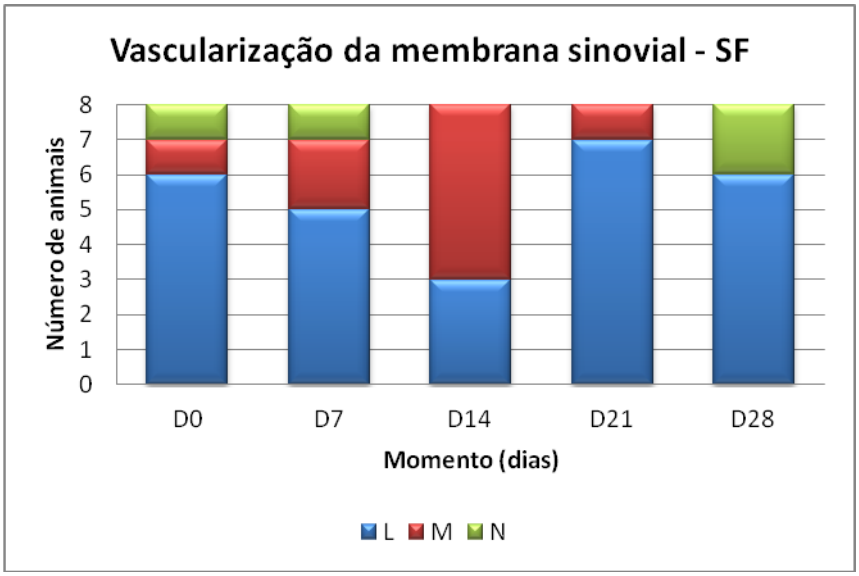

Legenda: F - sem alteração; G - quantidade aumentada em até metade do volume fisiológico; H - quantidade aumentada em até o dobro do volume fisiológico; I - quantidade aumentada em mais que o dobro do volume fisiológico; J - quantidade aumentada em três vezes ou mais do volume fisiológico

Figura 31 – Número de animais de acordo com a vascularização da membrana sinovial observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP – São Paulo – 2011-2012




Legenda: L - sem observação de fluxo articular; M - vascularização visível ou pontos coloridos esparsos e em pequena quantidade; N - vascularização aumentada ou pontos coloridos em blocos e em grande quantidade – São Paulo - 2011-2012

Figura 32 – Número de animais de acordo com a vascularização da membrana sinovial observado por exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado SF – São Paulo – 2011-2012




Legenda: L - sem observação de fluxo articular; M - vascularização visível ou pontos coloridos esparsos e em pequena quantidade; N - vascularização aumentada ou pontos coloridos em blocos e em grande quantidade

## 6.2 EXPERIMENTO 2

### 6.2.1 Exame físico

Ao exame físico, não foram observados aumento de volume articular, postura antálgica e alterações articulares palpáveis, como calor, dor e alteração de consistência em nenhum dos momentos de ambos os grupos.

Com relação à dinâmica, em ambos os grupos, o grau de claudicação foi zero em todos os momentos.

### 6.2.2 PRP

Para quantificação final de plaquetas utilizando o procedimento descrito no item 5.3, foi realizada a comparação entre a quantidade de plaquetas no sangue de cada animal com a quantidade de plaquetas contidas no PRP.

A média de concentração obtida foi de 2,2 vezes a quantidade presente no sangue (Figura 33). A média inicial de plaquetas dos oito cavalos foi de 180 x $10^3$ plaquetas/µL e a média obtida no PRP foi de 389 x $10^3$ plaquetas/µL (Tabela 22).

Figura 33 – Média da concentração plaquetária obtida após protocolo de centrifugação para obtenção do PRP de cada cavalo (1-6), e a média final da concentração plaquetária obtida entre todos os cavalos – São Paulo - 2011-2012

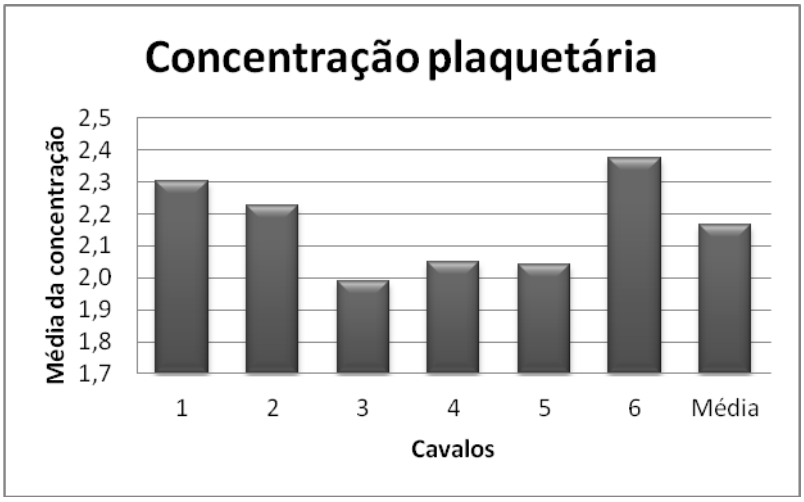


Tabela 22 – Concentração plaquetária obtida após protocolo de obtenção do PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-6) – São Paulo - 2011-2012

| Animal | Plaquetas Início ($x10^3$ µL) | Plaquetas Final ($x10^3$ µL) | Concentração |
|---|---|---|---|
| **1** | 191 | 440 | 2,3 |
| **2** | 160 | 356 | 2,2 |
| **3** | 217 | 432 | 2,0 |
| **4** | 178 | 365 | 2,1 |
| **5** | 173 | 353 | 2,0 |
| **6** | 163 | 387 | 2,4 |
| **Média** | 180 | 389 | 2,2 |

A contagem de leucócitos, foi realizada em contador automático hematológico, e o valor final permaneceu nos mesmos padrões dos valores sanguíneos, não ocorrendo concentração (Tabela 23).

Tabela 23 – Quantidade leucocitária ($x10^3$/µL) presente no PRP, em todos os momentos, de cada cavalo (1-6) – São Paulo - 2011-2012

| Animal | Momento | Quantidade de leucócitos (x $10^3$/µL) |
|---|---|---|
| **1** | M0 | 5,7 |
| **2** | M0 | 7,3 |
| **3** | M0 | 3,9 |
| **4** | M0 | 11,4 |
| **5** | M0 | 11,0 |
| **6** | M0 | 3,1 |
| **Média** | | 6,5 |

### 6.2.3 LS

#### 6.2.3.1 Análise física do LS

Os grupos não diferiram quanto à coloração. No grupo PRP houve diferença entre os momentos 0 e 24; 0 e 48; 24 e 168 quanto à coloração, com predomínio de coloração palha no M0 e M168 ($P<0,05$) (Tabela 24, Figuras 34 e 35).

Tabela 24 – Coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 |
| 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 |
| 5 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 6 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 |
| Mediana | 1 | 2 | 2,5 | 2 | 2,5 | 1 | 1ac | 2,5abc | 2abc | 3b | 2bc | 1c |

Legenda: palha=1; ouro=2; avermelhado = 3, letras minúsculas distintas diferem estatisticamente (P<0,05).

Figura 34 – Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

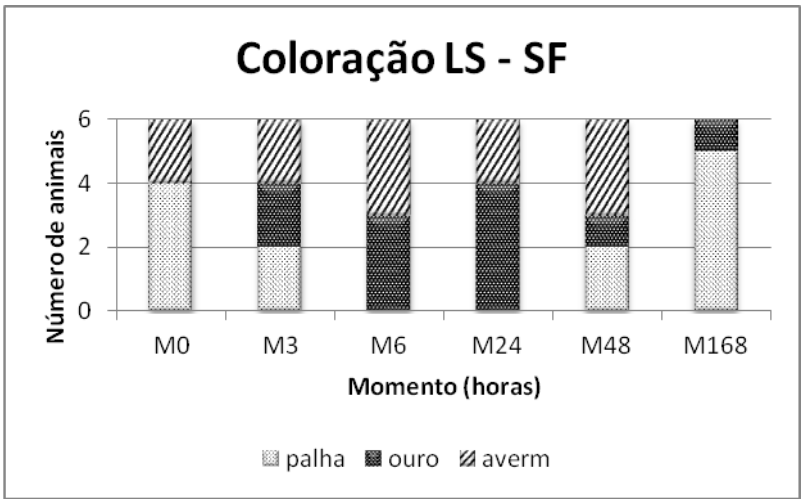
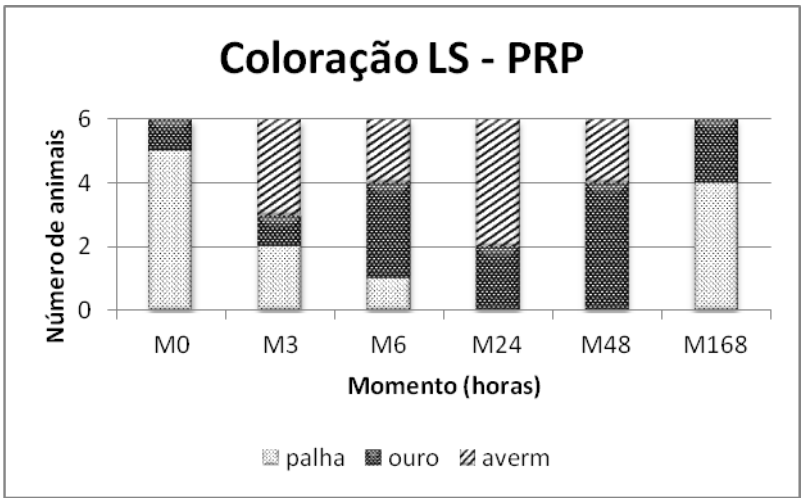



Figura 35 – Número de animais de acordo com a coloração do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injeto PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012



Quando comparados o aspecto do LS entre os grupos, observa-se aumento do aspecto turvo no M6 no grupo PRP em relação ao grupo SF (P<0,05) (Tabela 25).

No grupo PRP houve diferença no aspecto entre os momentos 6 e 0; 48, 168, com predomínio de aspecto límpido no M48 e M168 (P<0,05) (Figuras 36 e 37).

Tabela 25 – Aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 |
| **2** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| **3** | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 |
| **4** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| **5** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| **6** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 |
| **Mediana** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1a** | **1ab** | **2b** | **2ab** | **1a** | **1a** |

Legenda: límpido = 1; semiturvo = 2; turvo =3; letras minúsculas distintas diferem estatisticamente (P<0,05).

Figura 36 – Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

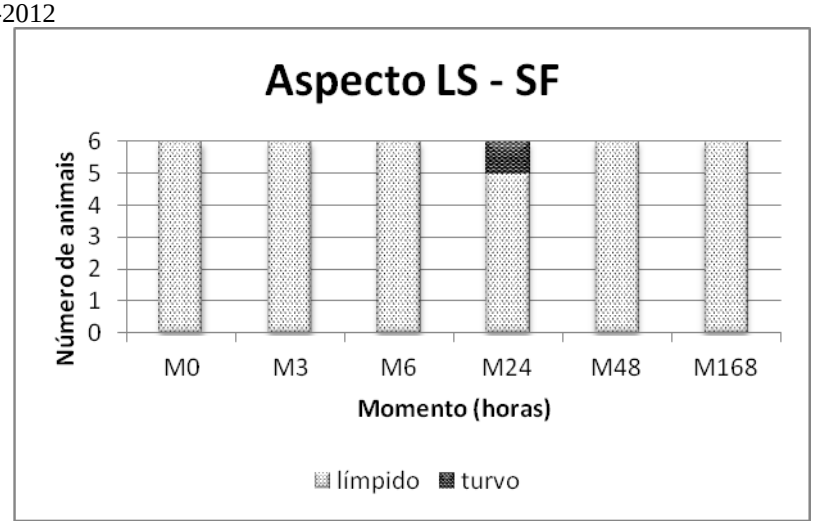
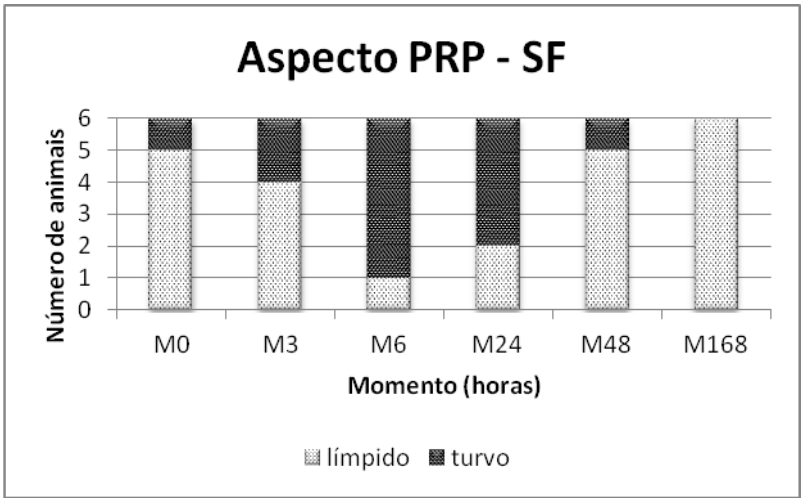


Figura 37 – Número de animais de acordo com o aspecto do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012



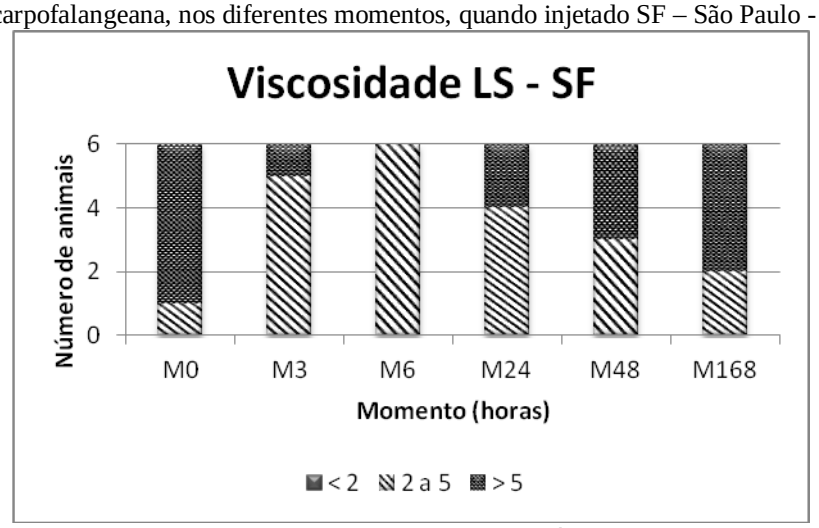

Com relação à viscosidade, não houve diferença entre os grupos. Nos dois grupos, observa-se piora na viscosidade no M6 em relação ao M0 (P<0,05), e no grupo SF, piora da viscosidade no momento 3 horas em relação ao M0 (P<0,05) (Tabela 26, Figuras 38 e 39).

Tabela 26 – Viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , sendo < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | | **PRP** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **M0** | **M3** | **M6** | **M24** | **M48** | **M168** | **M0** | **M3** | **M6** | **M24** | **M48** | **M168** |
| **1** | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| **2** | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **3** | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **4** | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **5** | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| **6** | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| **Mediana** | **3a** | **2b** | **2b** | **2ab** | **2,5ab** | **3ab** | **3a** | **3a** | **2,5b** | **3ab** | **3ab** | **3ab** |

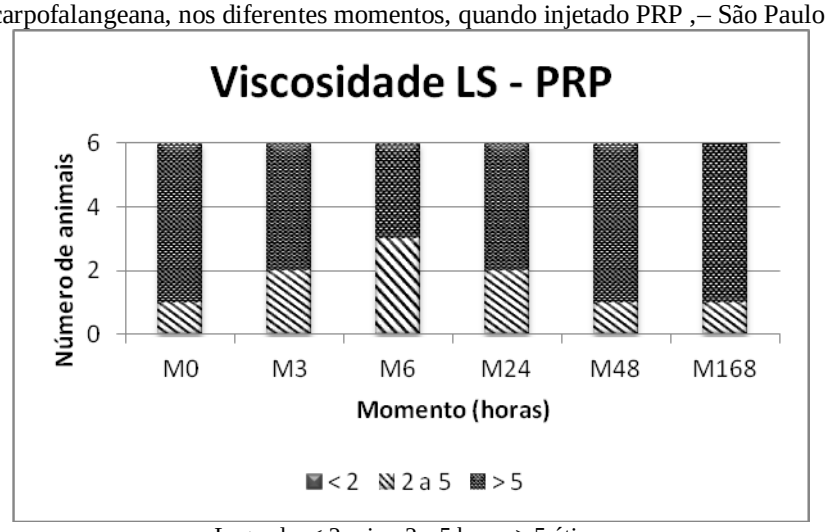
Legenda: <2 = 1; 2 a 5 = 2; >5 = 3.

Figura 38 – Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF – São Paulo - 2011-2012




Legenda: < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima

Figura 39 – Número de animais de acordo com a viscosidade do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP ,– São Paulo - 2011-2012




Legenda: < 2 ruim, 2 a 5 boa e > 5 ótima

### 6.2.3.2 Teste do precipitado de mucina

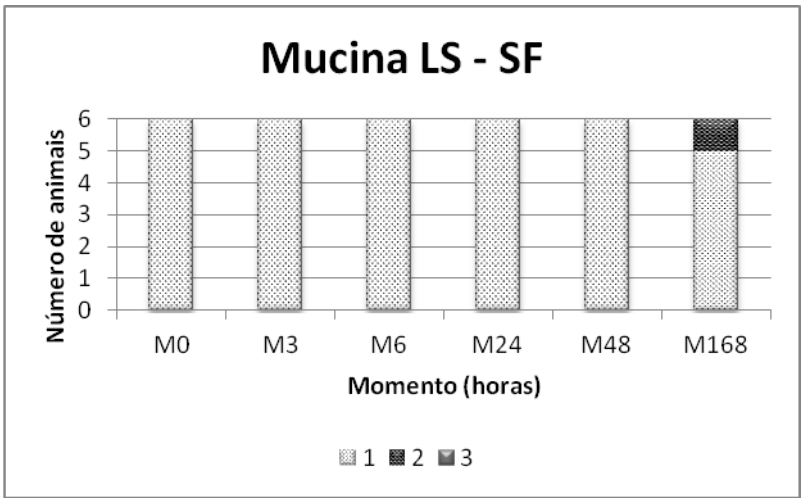
Houve diferença entre os grupos em relação ao precipitado de mucina no M3,onde observa-se piora na qualidade da mucina no grupo PRP ($P<0,05$). Também se observa piora na qualidade da mucina no momento 3 horas em relação ao momento 0, no grupo que recebeu PRP ($P < 0,05$) (Tabela 27 e Figuras 40 e 41).

Tabela 27 – Teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular, sendo 1-bom, 2-regular, 3-ruim – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 3 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| **Mediana** | **1** | **1A** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1a** | **3bB** | **2ab** | **1ab** | **1ab** | **2ab** |

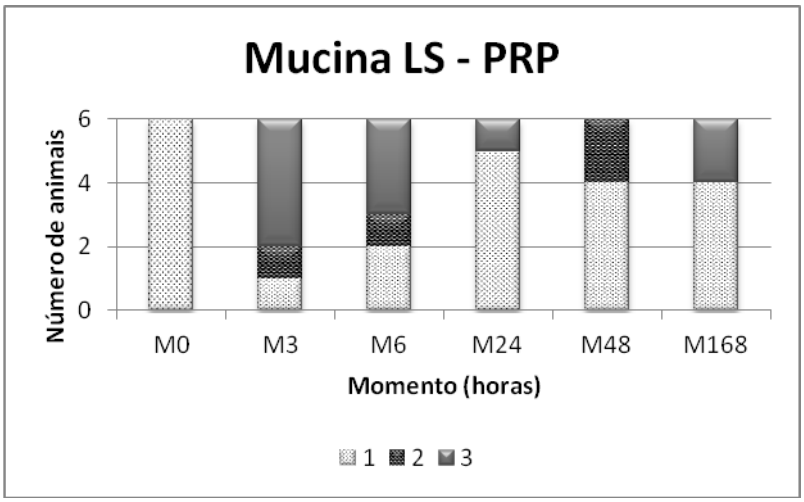
Letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística dentro do mesmo grupo (P<0,05).
Letras maiúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística entre os grupos (P<0,05).

Figura 40 – Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012




Legenda: 1-bom, 2-regular, 3-ruim

Figura 41 – Número de animais de acordo o teste de mucina do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012




Legenda: 1-bom, 2-regular, 3-ruim

### 6.2.3.3 Contagem total de células no LS

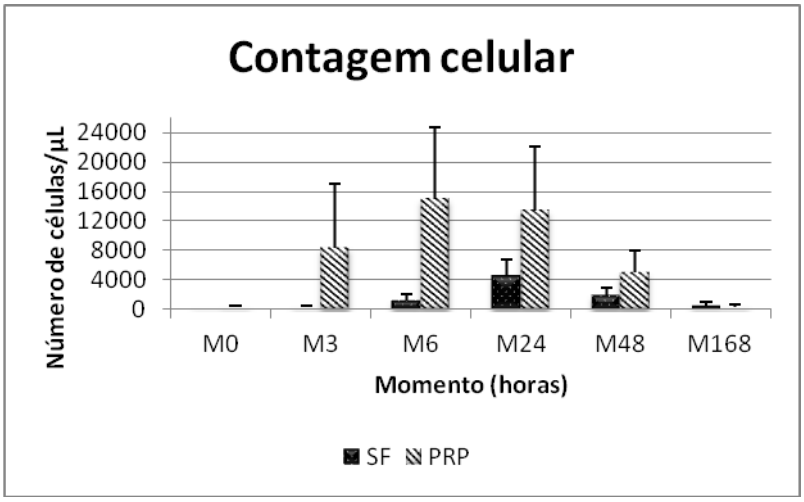
Houve diferença no número de células nucleadas do LS entre os grupos nos momentos 3, 6, 24 e 48 horas. Quando comparados os diferentes momentos no mesmo grupo notou-se aumento do número de células nos momentos 6 e 24 horas em relação ao momento 0 (P<0,05) e posterior diminuição da contagem celular no momento 168 horas (P<0,05) no grupo PRP, bem como aumento celular no M24 em relação a 0, 3, 6, 48 e 168 horas; e aumento celular em M48 em relação a M0 no grupo que recebeu SF (P<0,05) (Tabela 28 e Figura 42).

Tabela 28 – Contagem celular (células/µL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 35 | 700 | 1025 | 1700 | 1175 | 275 | 700 | 23000 | 16900 | 11300 | 3900 | 100 |
| **2** | 228 | 280 | 2000 | 7150 | 2700 | 1400 | 275 | 832,5 | 2600 | 2800 | 1035 | 445 |
| **3** | 28 | 115 | 688 | 3413 | 928 | 450 | 110 | 13800 | 27600 | 12800 | 5950 | 100 |
| **4** | 95 | 290 | 2425 | 6725 | 1910 | 263 | 42,5 | 6050 | 16750 | 13150 | 7050 | 385 |
| **5** | 80 | 140 | 875 | 5125 | 1675 | 170 | 45 | 5850 | 21800 | 29250 | 9350 | 950 |
| **6** | 265 | 120 | 325 | 3200 | 3380 | 290 | 450 | 925 | 4450 | 11250 | 2700 | 312,5 |
| **Média** | 121,83a | 274,16acA | 1223acA | 4552,1bA | 1961,3cA | 474,66ac | 270,41a | 8409,5abB | 15016bB | 13425bB | 4997,5abB | 382,08a |
| **DP** | 100,5 | 223,0 | 812,5 | 2147,5 | 930,4 | 462,2 | 262,7 | 8573,0 | 9764,5 | 8637,5 | 3041,3 | 313,20 |

Letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística dentro do mesmo grupo (P<0,05).
Letras maiúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística entre os grupos (P<0,05).

Figura 42 – Contagem média e desvio padrão de células nucleadas do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012



### 6.2.3.4 Determinação de ureia do LS

Não houve diferença entre os momentos dentro do mesmo grupo nos valores de ureia (Tabela 29).

Tabela 29 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de ureia (mg/dL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 359 | 374 | 359 | 362 | 355 | 361 | 0 | 441 | 457 | 448 | 423 | 347 |
| **2** | 316 | 335 | 331 | 307 | 377 | 386 | 304 | 317 | 316 | 414 | 336 | 304 |
| **3** | 365 | 344 | 326 | 329 | 391 | 351 | 296 | 302 | 272 | 363 | 288 | 277 |
| **4** | 308 | 281 | 265 | 262 | 347 | 273 | 357 | 396 | 344 | 395 | 418 | 302 |
| **5** | 338 | 318 | 312 | 312 | 316 | 326 | 368 | 398 | 362 | 385 | 373 | 366 |
| **6** | 428 | 418 | 395 | 426 | 415 | 460 | 274 | 295 | 308 | 362 | 356 | 291 |
| **Média** | 352,33 | 345,00 | 331,33 | 333,00 | 366,83 | 359,50 | 266,50 | 358,17 | 343,17 | 394,50 | 365,67 | 314,50 |
| **DP** | 43,4 | 47,1 | 43,9 | 56,0 | 35,0 | 62,4 | 135,5 | 61,2 | 63,8 | 32,8 | 51,2 | 34,4 |

Não foi observada diferença estatística entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

### 6.2.3.5 Determinação de IL-1β, IL1ra, TNF-α e $PGE_2$ do LS

Não houve diferença nos valores de IL-1β e IL-1β/ureia entre os grupos e entre os momentos dentro do grupo PRP. No grupo SF, os valores de IL-1β foram abaixo dos valores detectáveis (Tabelas 30 e 31 e Figuras 43 e 44).

Tabela 30 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana de seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | | | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | |
| **2** | | | <0,00 | | <0,00 | | 0,11 | 5,84 | 7,8 | 0 | 7,91 | 1,00 |
| **3** | | | <0,00 | | <0,00 | | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | |
| **4** | | | <0,00 | | <0,00 | | | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 1,41 | 1,41 |
| **5** | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | | | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 0,82 |
| **6** | | | <0,00 | | <0,00 | | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 1,71 | <0,00 | 0 |
| **Média** | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | | 0,04 | 0,97 | 1,30 | 0,29 | 1,56 | 0,81 |
| **DP** | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | | 0,1 | 2,4 | 3,2 | 0,7 | 3,2 | 0,6 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do grupo PRP (P>0,05).

Figura 43 – Valores, média e desvio padrão, de IL-1β (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

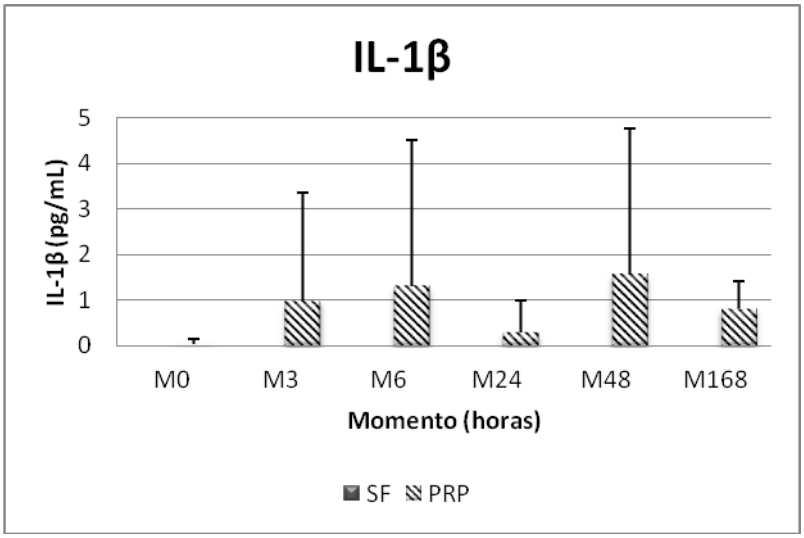
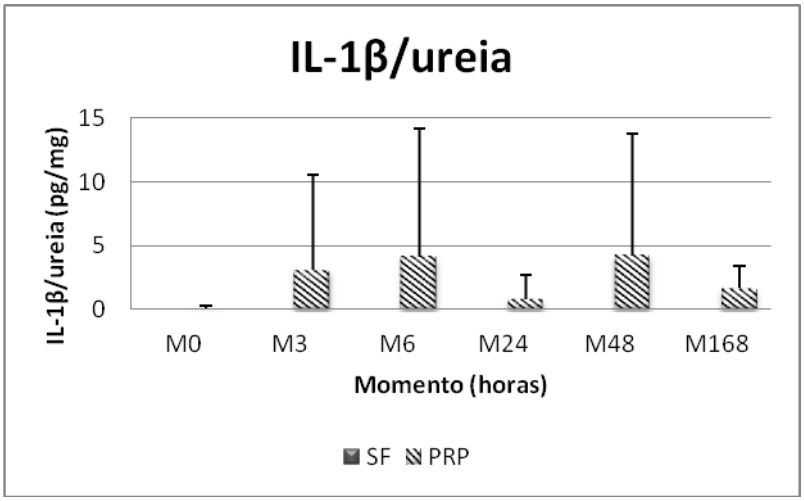



Tabela 31 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **2** | | | 0 | | 0 | | 0,39 | 18,45 | 24,68 | 0 | 23,56 | 3,3 |
| **3** | | | 0 | | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | | | 0 | | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,69 | 2,35 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,87 |
| **6** | | | 0 | | 0 | | 0 | 0 | 0 | 4,73 | 0 | 0,4 |
| **Média** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0,07 | 3,08 | 4,11 | 0,79 | 4,21 | 1,65 |
| **DP** | | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0,2 | 7,5 | 10,1 | 1,9 | 9,5 | 1,7 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 44 – Valores, média e desvio padrão, de IL-1β/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012




Nota-se aumento do valor de IL-1ra no M24, em relação ao M0 e M3 (P<0,05) no grupo PRP. Não houve diferença entre os grupos e entre os momentos do grupo SF (P>0,05).

Quando corrigido o valor de IL-1ra pela ureia, observa-se aumento no valor de IL-1ra no M24 em relação aos momentos 0, 3 e 168 em ambos os grupos (P<0,05). Não houve diferença entre os grupos (P>0,05) (tabelas 32 e 33 e figuras 45 e 46).

Tabela 32 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL-1ra (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| **Animal** | **SF** | | | | | | **PRP** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | |
| **2** | <0,00 | <0,00 | 20,59 | 97,83 | 34,23 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 |
| **3** | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 52,77 | 9,55 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 16,03 | 162,22 | <0,00 | |
| **4** | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 159,38 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 54,96 | 47,02 | <0,00 |
| **5** | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 43,94 | <0,00 | <0,00 |
| **6** | <0,00 | 17,87 | <0,00 | 153,67 | 228,42 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | <0,00 | 35,13 | <0,00 | <0,00 |
| **Média** | 0 | 2,98 | 3,43 | 77,27 | 45,37 | 0 | 0a | 0a | 2,67ab | 49,38b | 7,84ab | 0ab |
| **DP** | 0 | 7,3 | 8,4 | 71,5 | 90,7 | 0 | 0 | 0 | 6,5 | 59,8 | 19,2 | 0 |

Letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística dentro do mesmo grupo (P<0,05).
Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento (P>0,05).

Figura 45 – Valores, média e desvio padrão, de IL-1ra (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

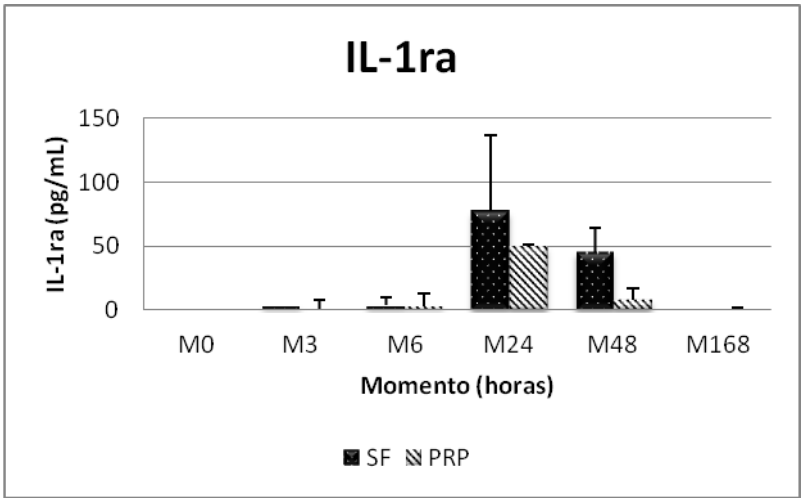
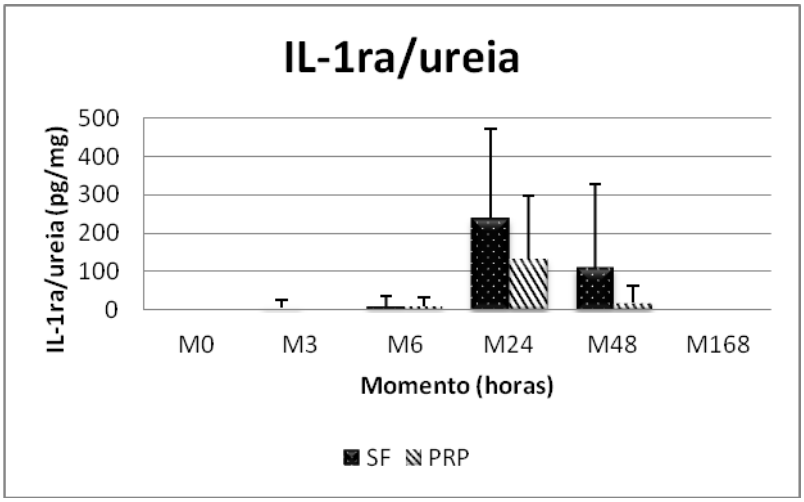



Tabela 33 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de IL1-ra/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana de seis cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **2** | 0 | 0 | 63,17 | 297,35 | 87,55 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **3** | 0 | 0 | 0 | 171,90 | 25,34 | 0 | 0 | 0 | 58,92 | 446,87 | 0 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 608,32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 139,14 | 112,49 | 0 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 114,13 | 0 | 0 |
| **6** | 0 | 42,76 | 0 | 360,72 | 550,42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97,038 | 0 | 0 |
| **Média** | 0,0a | 7,13a | 10,53a | 239,7b | 110,5a | 0a | 0,00a | 0,00a | 9,82ab | 132,8b | 18,75ab | 0a |
| **DP** | | 17,5 | 25,8 | 233,8 | 218,1 | 0 | 0,0 | 0,0 | 24,1 | 164,7 | 45,9 | 0 |

Letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística dentro do mesmo grupo (P<0,05).
Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento (P>0,05).

Figura 46 – Valores, média e desvio padrão, de IL-1ra/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012



Não houve diferença nos valores de TNF-α e TNF-α/ureia entre os grupos e entre os momentos dentro do mesmo grupo (Tabelas 34 e 35 e Figuras 47 e 48).

Tabela 34 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP, intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **2** | 1,23 | 9,16 | 4,06 | 0,44 | 24,71 | 16,74 | 601,0 | 1049,2 | 1049,2 | 1049,2 | 621,35 | 151,44 |
| **3** | 238,44 | 241,69 | 362,42 | 589,29 | 295,47 | 306,23 | 0 | 86,19 | 113,3 | 47,64 | 9,29 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | |
| **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Média** | 39,94 | 41,81 | 61,08 | 98,29 | 53,36 | 53,83 | 100,17 | 283,85 | 232,51 | 182,81 | 105,11 | 30,29 |
| **DP** | 97,2 | 98,0 | 147,6 | 240,5 | 119,0 | 123,8 | 245,4 | 511,9 | 459,2 | 424,9 | 252,9 | 67,7 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 47 – Valores, média e desvio padrão, de TNF-α (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

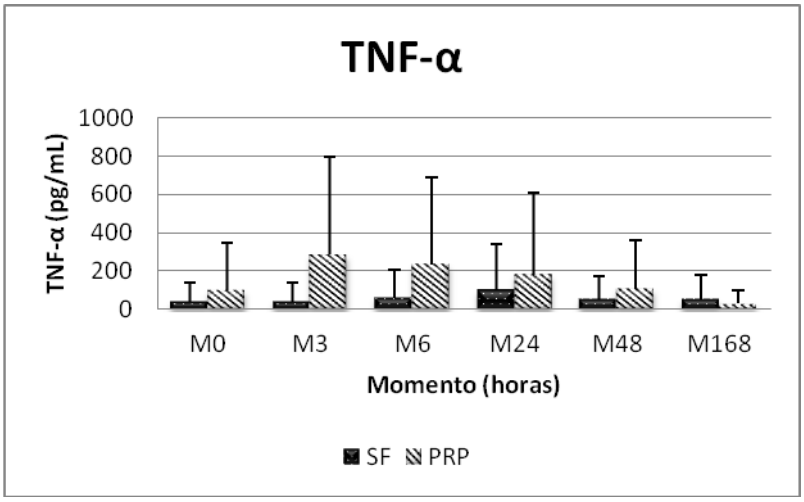
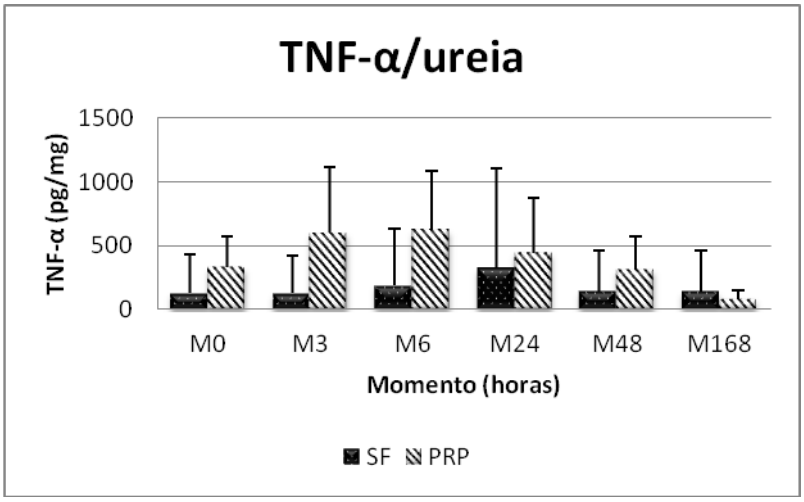


Tabela 35 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **2** | 3,36 | 26,64 | 12,47 | 1,33 | 63,19 | 47,69 | 1977,1 | 3309,8 | 3320,3 | 2534,3 | 1849,2 | 498,18 |
| **3** | 754,56 | 721,47 | 1094,9 | 1919,5 | 783,73 | 793,35 | 0 | 285,39 | 416,56 | 131,26 | 32,28 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **5** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Média** | 126,32 | 124,69 | 184,56 | 320,14 | 141,15 | 140,17 | 329,52 | 599,20 | 622,81 | 444,26 | 313,58 | 83,03 |
| **DP** | 307,8 | 292,6 | 446,0 | 783,5 | 315,8 | 320,6 | 807,1 | 1332,8 | 1332,0 | 1025,3 | 752,4 | 203,4 |

Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento, ou entre os momentos dentro do mesmo grupo (P>0,05).

Figura 48 – Valores, média e desvio padrão, de TNF-α/ureia (pg/mg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012




Houve aumento no valor de $PGE_2$ no momento 3 horas, em relação aos momentos 0, 24, 48 e 168 horas no grupo PRP (P<0,05). Não houve diferença entre os momentos do grupo SF (P>0,05). Houve diferença entre os grupos nos momentos 3 e 6 horas (P<0,05) (Tabela 36, Figura 49).

Quando corrigido os valores de $PGE_2$ pelos valores de ureia, houve aumento no valor no momento 3 horas, em relação aos momentos 0, 24, 48 e 168 horas no grupo PRP (P<0,05). Não houve diferença entre os momentos do grupo SF (P>0,05). Houve diferença entre os grupos nos momentos 3 e 6 horas (P<0,05) (Tabela 37 e Figura 50).

Tabela 36 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de $PGE_2$ (pg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 8,13 | 16,62 | 26,50 | 9,03 | 21,53 | 19,76 | 23,89 | 117,73 | 68,77 | 35,71 | 28,91 | 14,17 |
| **2** | 28,17 | 34,65 | 57,56 | 30,35 | 51,06 | 44,70 | 8,12 | 200,10 | 86,63 | 29,48 | 33,61 | 13,55 |
| **3** | 17,93 | 22,32 | 30,07 | 27,67 | 16,82 | 13,83 | 9,53 | 67,83 | 47,38 | 38,93 | 41,96 | 29,94 |
| **4** | 20,66 | 14,94 | 53,18 | 62,81 | 46,14 | 24,51 | 4,82 | 435,50 | 247,19 | 65,96 | 38,25 | |
| **5** | 9,87 | 14,00 | 28,68 | 23,49 | 20,12 | 19,44 | 4,82 | 435,50 | 247,19 | 65,96 | 38,25 | |
| **6** | 6,50 | 28,53 | 43,90 | 18,15 | 26,57 | 68,64 | 15,59 | 81,80 | 57,55 | 27,10 | 47,51 | 20,41 |
| **Média** | 8,13 | 16,62A | 26,50A | 9,03 | 21,53 | 19,76 | 23,89a | 117,7bB | 68,77abB | 35,71a | 28,91a | 14,17a |
| **DP** | 28,17 | 34,65 | 57,56 | 30,35 | 51,06 | 44,70 | 8,12 | 200,10 | 86,63 | 29,48 | 33,61 | 13,55 |

Letras minúsculas na mesma linha denotam diferença entre os momentos no mesmo grupo (P<0,05).
Letras maiúsculas na mesma linha denotam diferença entre os grupos (P<0,05).

Figura 49 – Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$ (pg/mL) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

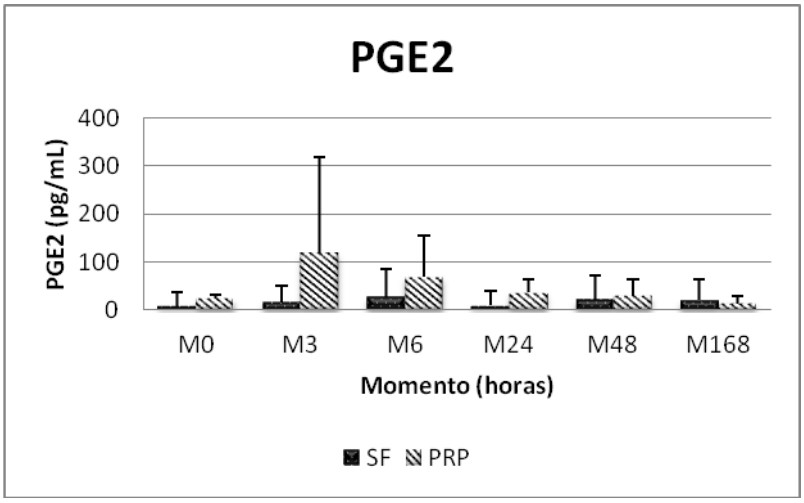
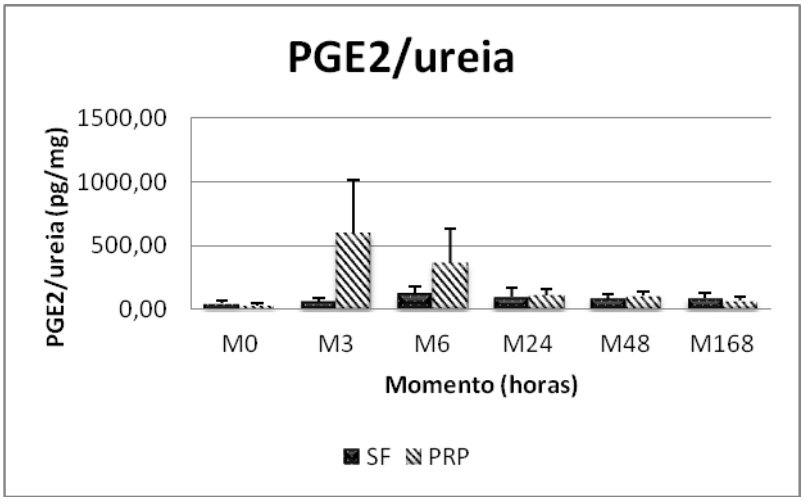



Tabela 37 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 22,65 | 44,45 | 73,83 | 24,97 | 60,64 | 54,73 | | 266,95 | 150,47 | 79,72 | 68,35 | 40,83 |
| **2** | 77,17 | 100,71 | 176,56 | 92,26 | 130,59 | 127,35 | 26,72 | 631,22 | 274,13 | 71,21 | 100,02 | 44,59 |
| **3** | 56,74 | 66,63 | 90,85 | 90,13 | 44,62 | 35,82 | 32,20 | 224,59 | 174,17 | 107,24 | 145,70 | 108,08 |
| **4** | 67,09 | 53,17 | 200,69 | 239,73 | 132,98 | 89,78 | 13,50 | 1099,7 | 718,57 | 166,98 | 91,50 | |
| **5** | 29,20 | 44,03 | 91,94 | 75,27 | 63,67 | 59,64 | 13,10 | 1094,2 | 682,84 | 171,32 | 102,54 | |
| **6** | 15,19 | 68,25 | 111,13 | 42,60 | 64,02 | 149,22 | 56,90 | 277,30 | 186,87 | 74,86 | 133,45 | 70,13 |
| **Média** | 44,67 | 62,87A | 124,1A | 94,16 | 82,75 | 86,09 | 28,48a | 598bB | 364abB | 111,8a | 106,9a | 65,9a |
| **DP** | 25,7 | 21,3 | 51,9 | 76,2 | 38,7 | 44,5 | 17,9 | 412,5 | 264,0 | 46,2 | 28,3 | 31,0 |

Letras minúsculas na mesma linha denotam diferença entre os momentos no mesmo grupo (P<0,05).
Letras maiúsculas na mesma linha denotam diferença entre os grupos (P<0,05).

Figura 50 – Valores, média e desvio padrão, de $PGE_2$/ureia (pg/mg) no LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando administrado PRP e SF – São Paulo - 2011-2012




6.2.3.6 Determinação de GAGs do LS

Com relação ao AH, houve diferença entre os grupos no momento 168 horas, onde se observa maior concentração de AH no grupo SF em relação ao grupo PRP (P<0,05). No grupo PRP, houve diminuição da concentração de AH às 3, 6 e 168 horas em relação ao valor inicial e aos valores de 24 horas (P<0,05). No grupo SF, também ocorreu diminuição dos valores de AH às 3 e 6 horas em comparação aos valores iniciais e de 48 horas (P<0,05) (Tabela 38 e Figura 51).

Observa-se diminuição nos valores de AH/ureia nos momentos 3, 6 e 168 horas em relação ao momento 0 no grupo PRP (P<0,05). Não houve diferença entre os momentos no grupo SF, ou entre os grupos (Tabela 39 e Figura 52).

Tabela 38 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 536,21 | 368,04 | 379,98 | 678,79 | 489,23 | 429,91 | 400,56 | 233,15 | 236,27 | 402,17 | 357,30 | 245,64 |
| **2** | 461,39 | 379,09 | 282,87 | 346,14 | 359,70 | 421,91 | 560,31 | 355,32 | 327,00 | 548,26 | 467,43 | 292,72 |
| **3** | 471,82 | 350,78 | 352,33 | 379,50 | 406,15 | 386,89 | 526,31 | 220,44 | 266,71 | 540,46 | 487,26 | 382,44 |
| **4** | 522,06 | 394,40 | 404,75 | 498,62 | 469,37 | 390,69 | 470,73 | 376,04 | 265,92 | 368,25 | 342,67 | 305,82 |
| **5** | 352,53 | 320,65 | 336,17 | 358,75 | 365,32 | 333,49 | 602,76 | 451,72 | 427,85 | 471,72 | 475,92 | 291,99 |
| **6** | 391,21 | 316,97 | 286,41 | 401,01 | 391,78 | 309,31 | 323,69 | 250,79 | 316,01 | 579,75 | 366,58 | 294,73 |
| **Média** | 455a | 354b | 340b | 443ab | 413a | 378abA | 480a | 314b | 306b | 485a | 416ab | 302bB |
| **DP** | 72,1 | 31,5 | 49,2 | 127,2 | 54,0 | 48,1 | 104,4 | 93,6 | 68,4 | 85,7 | 67,2 | 44,5 |

Letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística dentro do mesmo grupo (P<0,05).
Letras maiúsculas diferentes na mesma linha denotam significância estatística entre os grupos (P<0,05).

Figura 51 – Valores, média e desvio padrão, de AH (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

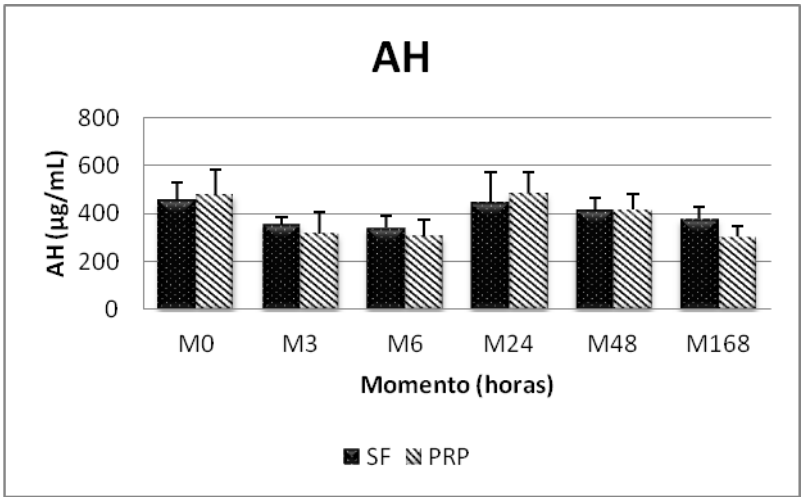
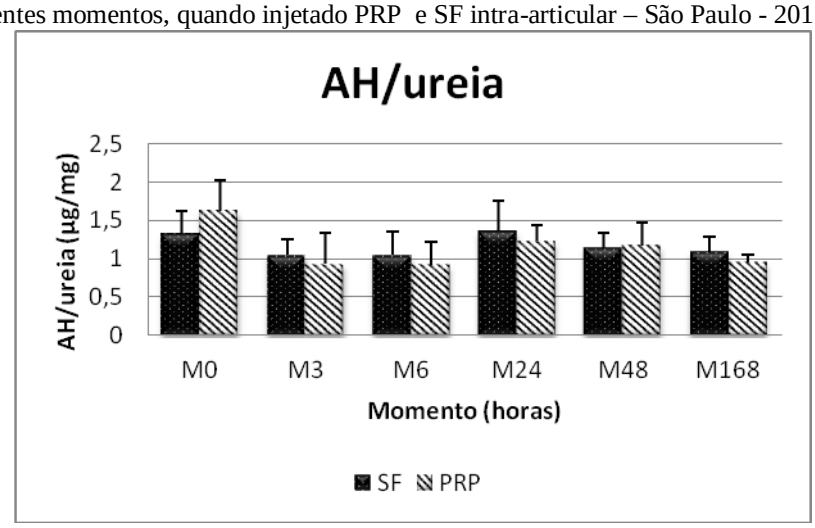



Tabela 39 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da relação AH/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP , intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 1,49 | 0,98 | 1,06 | 1,88 | 1,38 | 1,19 | 1,12 | 0,59 | 0,69 | 1,02 | 0,85 | 0,81 |
| **2** | 1,46 | 1,13 | 0,85 | 1,13 | 0,95 | 1,09 | 1,89 | 1,18 | 1,20 | 1,51 | 1,62 | 1,06 |
| **3** | 1,29 | 1,02 | 1,08 | 1,15 | 1,04 | 1,10 | 1,43 | 0,55 | 0,74 | 1,40 | 1,31 | 1,04 |
| **4** | 1,70 | 1,40 | 1,53 | 1,90 | 1,35 | 1,43 | 1,72 | 1,27 | 0,86 | 1,02 | 0,96 | 1,05 |
| **5** | 1,04 | 1,01 | 1,08 | 1,15 | 1,16 | 1,02 | 1,98 | 1,42 | 1,35 | 1,14 | 1,42 | 0,96 |
| **6** | 0,91 | 0,76 | 0,73 | 0,94 | 0,94 | 0,67 | | 0,57 | 0,69 | 1,29 | 0,87 | 0,85 |
| **Média** | 1,32 | 1,05 | 1,05 | 1,36 | 1,14 | 1,09 | 1,63a | 0,93b | 0,92b | 1,23ab | 1,17ab | 0,96b |
| **DP** | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,1 |

Letras minúsculas na mesma linha denotam diferença entre os momentos no mesmo grupo (P<0,05).
Não foi observada diferença estatística entre os grupos no mesmo momento (P>0,05).

Figura 52 – Valores de AH/ureia do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012




Com relação ao CS, houve diferença entre os grupos nos momentos 24 e 48 horas, onde se observa maior concentração de CS no grupo PRP em relação ao grupo SF (P<0,05). No grupo PRP, houve aumento da concentração de CS em 24 e 48 horas em relação a 3, 6 e 168 horas (P<0,05) e de M24 horas também em relação a M0 (P<0,05). No grupo SF, os valores em 24 e 48 horas são maiores que 3 e 6 horas (P<0,05) (Tabela 40 e Figura 53).

Observa-se aumento nos valores de CS/ureia no M24 e M48 em relação aos momentos 0, 3, 6 e 168 no grupo PRP; e aumento no M24 em relação ao M3, M6 e M168 no grupo SF (P<0,05). Não houve diferença entre os grupos nos valores de CS/ureia (Tabela 41 e Figura 54).

A lâmina de eletroforese em gel de agarose foi escaneada e lida no densitômetro (Figura 55).

Tabela 40 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 35,45 | 23,14 | 24,26 | 34,98 | 36,52 | 16,54 | 40,12 | 13,90 | 18,34 | 75,18 | 127,25 | 24,37 |
| **2** | 44,42 | 37,96 | 22,42 | 88,83 | 53,30 | 60,48 | 63,51 | 18,60 | 19,31 | 90,36 | 53,88 | 10,99 |
| **3** | 42,84 | 21,89 | 35,38 | 39,85 | 39,16 | 32,66 | 38,00 | 26,65 | 19,17 | 173,75 | 97,56 | 19,88 |
| **4** | 31,06 | 17,43 | 18,95 | 48,49 | 74,26 | 18,65 | 20,63 | 20,66 | 8,72 | 110,62 | 39,63 | 15,51 |
| **5** | 22,02 | 26,82 | 25,90 | 32,98 | 34,19 | 17,02 | 27,53 | 12,43 | 11,43 | 29,43 | 26,63 | 12,24 |
| **6** | 49,62 | 20,44 | 24,87 | 75,04 | 80,94 | 23,24 | 24,64 | 39,20 | 28,45 | 156,63 | 103,17 | 22,64 |
| **Média** | 37ab | 24a | 25a | 53bA | 53bA | 28ab | 35ac | 21a | 17a | 105bB | 74bcB | 17a |
| **DP** | 10,1 | 7,2 | 5,5 | 23,2 | 20,2 | 17,0 | 15,6 | 9,9 | 6,9 | 53,4 | 40,2 | 5,5 |

Letras minúsculas na mesma linha denotam diferença entre os momentos no mesmo grupo (P<0,05).
Letras maiúsculas na mesma linha denotam diferença entre os grupos (P<0,05).

Figura 53 – Valores de CS (µg/mL) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

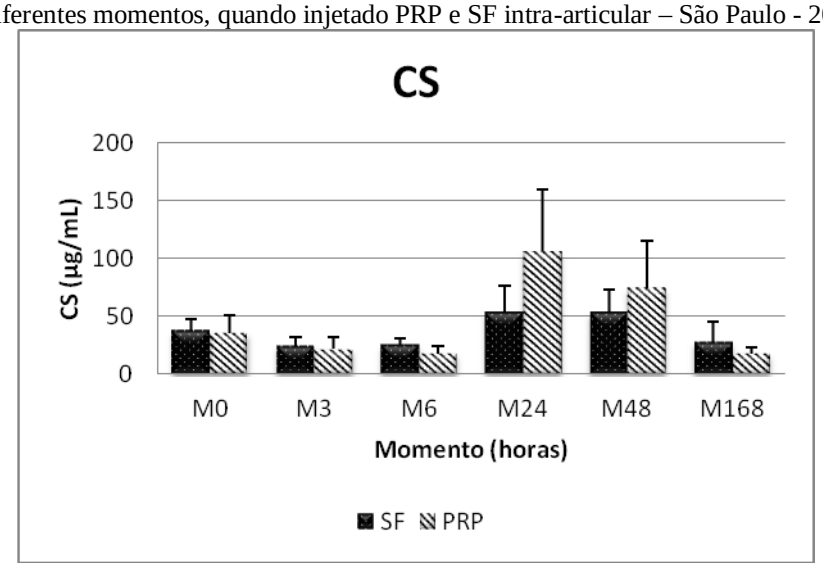



Tabela 41 – Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana dos oito cavalos, nos diferentes momentos, quando injetado SF ou PRP (PRP) intra-articular – São Paulo - 2011-2012

| Animal | SF | | | | | | PRP | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 | M0 | M3 | M6 | M24 | M48 | M168 |
| **1** | 0,10 | 0,06 | 0,07 | 0,10 | 0,10 | 0,05 | 0,11 | 0,04 | 0,05 | 0,19 | 0,30 | 0,08 |
| **2** | 0,14 | 0,11 | 0,07 | 0,29 | 0,14 | 0,16 | 0,21 | 0,06 | 0,07 | 0,25 | 0,19 | 0,04 |
| **3** | 0,12 | 0,06 | 0,11 | 0,12 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | 0,07 | 0,05 | 0,45 | 0,26 | 0,05 |
| **4** | 0,10 | 0,06 | 0,07 | 0,19 | 0,21 | 0,07 | 0,08 | 0,07 | 0,03 | 0,31 | 0,11 | 0,05 |
| **5** | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,11 | 0,11 | 0,05 | 0,09 | 0,04 | 0,04 | 0,07 | 0,08 | 0,04 |
| **6** | 0,12 | 0,05 | 0,06 | 0,18 | 0,20 | 0,05 | | 0,09 | 0,06 | 0,35 | 0,24 | 0,07 |
| **Média** | 0,11ab | 0,07a | 0,08a | 0,16b | 0,14ab | 0,08a | 0,12a | 0,06a | 0,05a | 0,27b | 0,20b | 0,06a |
| **DP** | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 |

Letras minúsculas na mesma linha denotam diferença entre os momentos no mesmo grupo (P<0,05).
Letras maiúsculas na mesma linha denotam diferença entre os grupos (P<0,05).

Figura 54 – Valores de CS/ureia (µg/µg) do LS obtido por artrocentese da articulação metacarpofalangeana, nos diferentes momentos, quando injetado PRP e SF intra-articular – São Paulo - 2011-2012

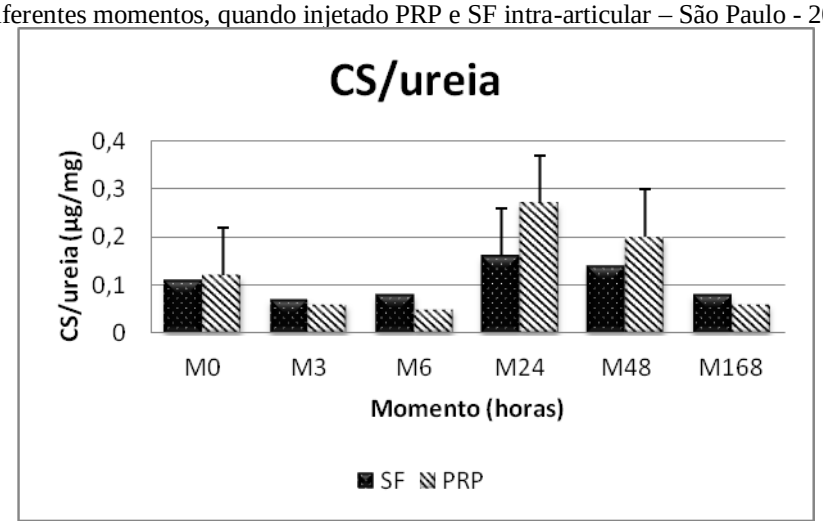
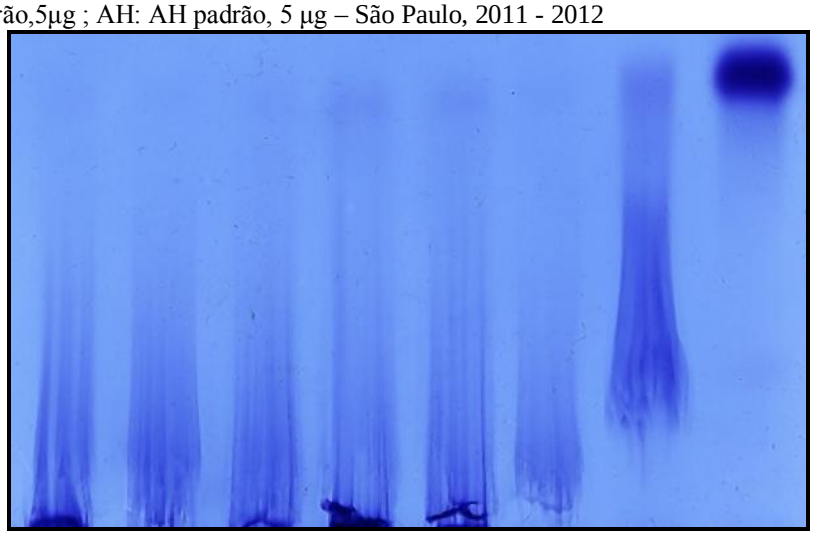


Figura 55 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs de LS de articulação hígida, após injeção de PRP. CS: CS padrão,5µg ; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo, 2011 - 2012



M0 M3 M6 M24 M48 M168 AH CS

# 7 DISCUSSÃO

Enfermidades articulares em equinos são doenças comuns e que levam a dor, diminuição da movimentação e queda de desempenho em animais atletas. O tratamento baseado em anti-inflamatórios e condroprotetores torna-se difícil, uma vez que o ambiente articular tem pouca capacidade intrínseca de se restaurar, e esses fármacos são administrados em doses frequentes, o que acarreta efeitos colaterais. Buscando melhores resultados clínicos no tratamento de lesões articulares, novas terapias estão sendo desenvolvidas e testadas, tanto em ensaios clínicos como experimentais. Dentre elas, grande destaque merecem os hemoderivados.

Inúmeros trabalhos são publicados avaliando o uso de PRP em tendões e ligamentos, porém, pouco se tem estudado sobre seus efeitos nas articulações sinoviais. Nesse estudo, avaliamos a resposta articular frente à aplicação de PRP, no que diz respeito à clínica, análise do LS e exame ultrassonográfico.

Os mesmos animais foram utilizados para os grupos controle e tratado, em ambos os experimentos, a fim de minimizar a variação individual. A articulação metacarpofalangeana foi utilizada por ser de fácil acesso para coleta de LS e frequentemente acometida por doenças articulares.

A avaliação clínica da articulação em estudo permitiu-nos observar que a aplicação de PRP, seja seriada ou em aplicação única, não provoca sinais clínicos relacionados a artrite, uma vez que não observamos aumento de temperatura, volume ou dor, (MCILWRAITH, 2002), diferentemente do encontrado por Textor e Tablin (2013), onde foi observado efusão sinovial após 6, 24 e 96 horas da injeção intra-articular de PRP ativado ou não.

O exame de claudicação composto pelo passo e trote, com e sem flexão da articulação, também demonstrou que os animais não sentiram dor. Textor e Tablin (2013) obtiveram presença de teste de flexão positivo quando da injeção de PRP intra-articular em equinos ativado por trombina bovina e ausência de claudicação quando utilizado PRP puro ou ativado com cloreto de cálcio. Melhora no grau de claudicação em equinos com lesões articulares quando da injeção de PRP intra-articular já foi comprovada (CARMONA et al., 2007; VIDRIERO et al., 2010; CARMONA; LOPEZ, 2011; YAMADA et al., 2012).

Nesse estudo utilizamos o método de dupla centrifugação com uso de tubos para obtenção do PRP. É um protocolo de fácil realização, porém há necessidade de laboratório

equipado com centrífuga e câmara de fluxo, já que há manipulação do produto durante sua produção e esse deverá ser estéril.

O protocolo apresentou boa repetibilidade, e a concentração plaquetária média atingiu níveis maiores que 300.000 plaquetas/µL, podendo então o produto considerado PRP (FOSTER et al., 2009; MCCARREL; FORTIER, 2009; CARMONA; LOPEZ, 2011; YAMADA et al., 2012; GIRALDO et al., 2013). Estudos relacionando o uso de PRP e melhora no quadro clínico do animal foram realizados com concentrações plaquetárias entre 300 a 450.000 plaquetas/µL (CARMONA; LOPEZ, 2011; YAMADA et al., 2012; CARMONA, 2013).

Protocolos que geram maior concentração plaquetária, não são necessariamente melhores, uma vez que forças gravitacionais muito altas, como utilizadas em medicina humana, provocam ativação plaquetária quando utilizadas em equinos (KISIDAY et al., 2012) e também altas concentrações podem ser inibitórias (WEIBRICH et al., 2001).

Em apenas dois momentos não obtivemos a concentração esperada de plaquetas no PRP. A variação dentro do mesmo indivíduo e entre os indivíduos é reconhecido como o fator determinante para atingir a concentração plaquetária (MAZZOCCA et al., 2012). Resultado semelhante foi obtido por Boswell et al. (2012), onde notaram variação na concentração plaquetária do mesmo indivíduo, além de variação no número de leucócitos. Essa variação pode ser atribuída a inúmeros fatores, como hidratação, inflamação e lipemia (AHMADIZAD et al, 2010; HARTLEY, 2012) ou raça, sexo e idade (GIRALDO et al., 2013).

Os dois animais do experimento que não atingiram concentração plaquetária ideal durante um dos momentos, apresentaram lesões inflamatórias, um deles gastrite e o outro ferida em pele na face palmar do osso metacarpiano, podendo ser o processo inflamatório a possível explicação para o ocorrido. A influência da raça, do sexo e da idade não pode ter ocorrido nesse caso, já que os animais tinham idades discrepantes, um macho e uma fêmea, de raças diferentes, e ambos atingiram a concentração exigida nos outros momentos.

A presença de leucócitos no PRP é bastante controversa na literatura, se por um lado eles têm ação benéfica, como antibiótico (MOOJEN et al., 2008; CIESLIK-BIELECKA et al., 2009) e são essenciais para debridamento de tecidos lesionados e liberação de citocinas (BOSWELL et al., 2012), por outro têm efeitos deletérios, através da liberação de metaloproteinases e de sua competição com os GAGs (BOSWELL et al., 2012).

Observamos que a contagem média de leucócitos no PRP utilizado semanalmente e com aplicação única, não ultrapassou os valores de referência para a contagem de leucócitos no sangue total, e sua presença não provocou efusão e dor articular, contradizendo o que

Arnockzy, Delos e Rodeo (2011) constataram. Em estudo realizado por Textor e Tablin (2013), o número de leucócitos ultrapassava os valores obtidos nesse experimento (13,1 x $10^3$/μL *versus* 8,3 x $10^3$/μL), e também não foram observados sinais clínicos relacionados a processo inflamatório. A eficácia da presença de leucócitos no PRP torna-se de difícil avaliação, uma vez que poucos trabalhos citam a concentração leucocitária no PRP (ARNOCKZ; DELOS; RODEO, 2011).

Como era necessária a obtenção de PRP de maneira asséptica, semeamos o produto final obtido em meio de cultura para avaliação de crescimento bacteriano, onde este não foi notado. A presença de leucócitos era mais uma garantia que não haveria contaminação bacteriana à articulação, uma vez que eles possuem efeito antibiótico (MOOJEN et al., 2008; CIESLIK-BIELECKA et al., 2009).

A degranulação dos grânulos α, grânulos densos e grânulos lambda presentes nas plaquetas ocorre quando são ativadas (BOSWELL et al., 2012), o que pode ser feito de maneira endógena ou exógena (WROBLEWSKI et al., 2010). Nesse estudo decidiu-se por não ativá-las previamente, e verificar se a presença do PRP induziria alguma resposta inflamatória. Também se supôs que as mesmas poderiam ser ativadas de maneira endógena, uma vez que o colágeno presente em tecidos articulares provoca degranulação plaquetária (MCCARREL; FORTIER, 2009; TEXTOR, 2011). Ademais, era necessário utilizar o PRP na forma líquida. Mesmo que a quantidade de fatores de crescimento liberados não seja tão alta (HAN et al., 2009; DUNKEL et al., 2011), ele possui plaquetas em repouso íntegras que podem ser ativadas por substâncias do tecido lesionado (ZANDIM et al., 2012) e independente se algum estímulo exógeno é utilizado ou não para induzir coagulação, isto não influencia na quantidade de fatores de crescimento liberada (DUNKEL et al., 2011).

Além disso, estudos já comprovaram que o uso de PRP não ativado estimula a migração e diferenciação de condrócitos e das células mesenquimais progenitoras (KRUGER et al., 2011) e a melhora na secreção de AH (ANITUA et al., 2007).

Para validação da necessidade de ativação ou não do PRP previamente à sua injeção intra-articular, faz-se necessário dosar os fatores de crescimento presentes no meio articular, após uma hora da aplicação, pois é o momento de maior liberação desses fatores (DUNKEL et al., 2011). Trabalhos foram publicados avaliando a concentração de fatores de crescimento no PRP ativado e não ativado (SUTTER et al., 2004; MCCARREL; FORTIER, 2009; TEXTOR; TABLIN, 2013), porém pouco se sabe sobre sua ativação endógena.

A análise do LS foi realizada para avaliar a resposta sinovial frente à aplicação de PRP.

O LS normal é amarelo palha e límpido. A coloração avermelhada indica hemorragia no momento da punção e o amarelo ouro indica um processo hemorrágico anterior, com quebra da hemoglobina (PERSSON, 1971; VAN PELT, 1974; MAHAFFEY, 2002; MACWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003). Na avaliação semanal, em ambos os grupos houve predomínio de coloração palha, porém, na injeção única com avaliação seriada, nota-se uma piora da coloração nos momentos 24 e 48 horas, possivelmente decorrente de um processo inflamatório (MCILWRAITH et al., 1979), ocasionado pelas artrocenteses seriadas, uma vez que não há diferença entre os grupos.

Com relação à turbidez, na avaliação semanal, em ambos os grupos houve predomínio de aspecto límpido durante todo o experimento, enquanto no experimento dois, observou-se aspecto turvo no grupo PRP, na coleta após seis horas da injeção, que pode ser decorrente da presença de hemácias ou leucócitos (MACWILLIAMS; FRIEDRICHS, 2003), sendo que nesse caso, possa ter ocorrido também pela presença de plaquetas, já que em seis horas, como proposto por Textor e Tablin (2013) há a maior concentração plaquetária no LS após injeção de PRP.

A viscosidade do LS é característica da presença de AH, e sua qualidade está diretamente relacionada à concentração e estrutura deste componente (KORENEK et al., 1992; TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1995).

A piora na viscosidade no dia 7 do grupo que recebeu PRP semanal; nos momentos 6 horas no grupo PRP e 3 e 6 horas no grupo SF na avaliação seriada, pode ter sido decorrente de possível sinovite, efusão ou redução da síntese ou polimerização incompleta do AH (MCILWRAITH et al., 1979; TEW; HOTCHKISS, 1981; STEEL, 2008).

A qualidade do precipitado de mucina foi pior somente no dia 14 no grupo PRP, coincidentemente com a piora da viscosidade no momento seis horas no grupo PRP seriado, e não foi coincidente com a viscosidade nos momentos 3 e 6 horas do grupo SF. Também apresenta piora no momento 3 horas do grupo PRP.

Como teoricamente este teste fornece um índice semiquantitativo confiável do grau de polimerização da molécula de AH presente no LS (MAHAFFEY, 2002; STEEL, 2008), somente no momento 6 horas do grupo PRP podemos supor que a piora da viscosidade tenha relação com a polimerização incompleta do AH.

Contudo, trabalhos relatam o aumento da síntese de AH pelos condrócitos quando da injeção intra-articular de PRP (AKEDA et al., 2006; ANITUA et al., 2007; MISHRA et al., 2009; FORTIER; HACKETT, COLE, 2011).

Como há aumento na contagem de células nucleadas em articulações em movimento (PERSSON, 1971), os animais permaneceram em repouso durante todo o experimento. Comparado ao grupo controle, o aumento de células nucleadas no grupo PRP foi maior até a avaliação de 48 horas, porém não houve diferença na avaliação semanal. Resultado semelhante foi encontrado por Textor e Tablin (2013) até as 24 horas, quando comparado solução salina a PRP puro e PRP ativado com cloreto de cálcio.

O aumento na contagem celular observado em ambos os grupos dos dois experimentos, pode ter ocorrido devido as injúrias na membrana sinovial e sinovite (MCILWRAITH, 2002), condição inflamatória (SUGIUCHI et al., 2005) decorrente das artrocenteses seriadas, porém, nos grupos PRP, o aumento foi mais evidente, o que pode ser explicado pela presença de leucócitos no produto injetado. Já a porcentagem de polimorfonucleares e mononucleares nos dois grupos de avaliação semanal ficaram dentro dos valores normais para a espécie, sendo 90%-100% mononucleares e 0-10% polimorfonucleares (VAN PELT, 1962; KORENEK et al., 1992; MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CÉLESTE et al., 2005; STEEL, 2008).

Para avaliar se ocorreu ou não diluição do LS decorrente da injeção de solução salina ou PRP, ou até mesmo de transudado, valores de ureia mensurados no LS foram utilizados como fator de correção para os valores das citocinas, $PGE_2$ e GAGs.

Não foi observada diferença entre os grupos nos valores de IL-1β, IL-1ra e TNF-α, demonstrando que o PRP não induz o processo de catabolismo articular (KIDD et al., 2001; RIGGS, 2006; CARON, 2011), infecção ou inflamação (AREND et al., 1998).

Observou-se que nos grupos que receberam PRP, quantidades pequenas de IL-1β foram encontradas em todos os momentos, tendendo a maiores valores em 6 e 48 horas e nos dias 7 e 14 na avaliação semanal, indicando que possa haver um processo inflamatório no ambiente articular ou liberação de IL-1β pelas plaquetas (BARRY et al., 1999; LINDEMANN et al, 2001; DUNKEL et al., 2011), que normalmente ocorre após 24 horas da ativação plaquetária (ROUSSY et al., 2007).

O fato de ser uma proteína de fase aguda (AREND et al., 1998), explica não encontrarmos IL-1ra nos grupos de avaliação semanal e observarmos valores maiores em 24 horas quando da avaliação seriada, corroborando com Hawkins et al. (1995). Estes autores afirmam que ocorre aumento da produção de Il-1ra em torno de 24 horas após insulto inflamatório, decorrente da presença de substância exógena à articulação ou a artrocentese seriada. Em nosso ensaio tanto a SF quanto o PRP apresentaram padrões semelhantes de aumento da IL-1ra. A ocorrência fisiológica de IL-1ra demonstra que o organismo monta sua

própria resposta de defesa, e a síntese deste peptídeo é parte natural deste processo (DINARELLO; THOMPSON, 1991; AREND et al., 1998; HORAI et al., 2000; AREND; GUTHRIDGE, 2000).

Nos quatro grupos, apenas dois animais apresentaram valores detectáveis de TNF-α tanto na injeção de SF quanto no PRP. Estudo realizado por Billinghurst, Fretz e Gordon (1995) demonstrou que o TNF-α aumenta nas primeiras 12 horas após exercício em cavalos com doenças articulares e em nosso estudo, percebemos uma tendência a maiores valores de TNF- α em três e seis horas após injeção de PRP e em 24 horas após injeção de SF.

Valores maiores de $PGE_2$ foram detectados em três horas após injeção de PRP, e maiores concentrações foram vistas as três e seis horas no grupo PRP com relação à SF. Resultado semelhante foi encontrado por Rasera et al. (2008), onde foi observado aumento de $PGE_2$ três horas após exercício intenso que voltava aos valores de normalidade após 24 horas do exercício.

Relatos já foram publicados sugerindo que o aumento de $PGE_2$ em processos inflamatórios ocorre durante as primeiras 24 horas (HAWKINS et al., 1993; ROSS et al., 2012), sendo este importante mediador inflamatório encontrado durante doenças articulares (HARDY et al., 1998).

Os resultados de IL-1β, TNF-α e $PGE_2$ indicam que, mesmo que haja uma inflamação decorrente da injeção de PRP, a articulação restabelece os valores normais dessas substâncias em até sete dias.

Com relação ao CS, quando avaliados os grupos do experimento dois, notamos maiores quantidades de CS em 24 horas em ambos os grupos, sem diferença entre eles, porém tendendo a ser mais evidente no grupo PRP, podendo indicar catabolismo articular, uma vez que o CS é um biomarcador direto desse processo (MCILWRAITH, 2005) ou processo de síntese. Dado o curto intervalo de tempo, acreditamos se tratar de um processo catabólico, provavelmente decorrente da destruição da MEC em função da inflamação provocada pelas artrocenteses.

O processo catabólico pode ter sido provocado pelas artrocenteses seriadas (VAN DEN BOOM et al., 2005) e acentuado pela presença do PRP, pois ele possui fatores que atuam nas vias anabólica, catabólica, pro-inflamatória e anti-inflamatória (BOSWELL et al., 2012). Em 168 horas, os valores de CS retornaram aos valores iniciais, padrão semelhante ao encontrado por Grauw et al. (2009), onde foi observado aumento nos valores de CS oito horas após indução de inflamação, com retorno aos valores basais em 168 horas.

A coleta semanal demonstra que, mesmo que haja um processo inflamatório catabólico, a articulação é capaz de restabelecer sua homeostasia em até sete dias, evidenciando a suspeita de inflamação transitória e não deletéria provocada pelo PRP.

Os menores valores de AH foram encontrados as três, seis e 168 horas no grupo PRP, que pode indicar catabolismo articular (MCILWRAITH, 2005), não havendo diferença entre os grupos, e entre os momentos do grupo SF. Anabolismo articular e aumento na produção de AH foram encontrados por Akeda et al. (2006) em cultivo *in vitro* de condrócitos de suínos e Anitua et al. (2007) em cultivo *in vitro* de sinoviócitos humano quando utilizado PRP ativado por trombina e gluconato de cálcio, respectivamente, resultado diferente do encontrado nesse estudo.

Em inflamações agudas, a degradação pode ser maior que a síntese devido à presença de mediadores inflamatórios. De acordo com Tew e Hotchkiss (1981) menores concentrações de AH induzem piora no teste de qualidade do precipitado de mucina em casos de sinovite aguda e em nosso estudo, notamos piora na viscosidade no grupo PRP às seis horas e no grupo SF às três e seis horas e a mucina pior às três horas no grupo PRP e ruim às 168 horas, correspondendo aos valores de AH mais baixo.

O exame ultrassonográfico foi utilizado no intuito de avaliar as alterações articulares, no que diz respeito às características do LS e vascularização de membrana sinovial. A sinovite ou efusão articular passam muitas vezes despercebidas durante a avaliação clínica, e os exames ultrassonográficos em modo-B e *Color Doppler* complementam a avaliação.

Na avaliação do LS, articulações hígidas apresentam-se com líquido anecóico em quantidade normal (DENOIX, 2009). Nesse estudo, os animais apresentavam predominantemente LS anecóico, porém com pequena quantidade de material ecogênico, podendo representar fibrina (DENOIX, 2009), característica que não alterou no decorrer das avaliações semanais.

O LS com material heterogêneo pode ser explicado pela utilização de animais sedentários, com pequena movimentação da articulação e, portanto, membrana sinovial mais espessa. Não foi observado hipertrofia da sinóvia, um dos principais achados ultrassonográficos dos processos inflamatórios articulares (KANG et al., 2013).

O exame ultrassonográfico permitiu observar que existe um processo inflamatório sutil dos componentes articulares na avaliação semanal em ambos os grupos no 14º dia, onde há um aumento na quantidade de LS e aumento na vascularização da membrana sinovial, o que deve ter ocorrido pelas artrocenteses seriadas, pois a variação nos dois grupos foi semelhante.

Porém, no grupo que recebeu PRP, a vascularização da membrana sinovial e a quantidade de LS aumentaram significativamente.

Não houve correlação entre o achado clínico de aumento de volume articular e aumento da quantidade de LS no exame ultrassonográfico, percebido nos dias 14 e 28 quando aplicado PRP. Trabalho realizado por Garrigues et al. (2013)[11] permitiu observar fraca relação entre a efusão percebida na avaliação clínica com sinovite vista com a ultrassonografia, em artrite reumatoide de pacientes humanos, nas articulações escapulo-umeral, radiocarpica e metatarsofalangeana, porém, forte relação foi verificada na articulação tibiotársica.

A utilização do *Color Doppler* para avaliação do fluxo vascular na membrana sinovial é útil para detecção precoce de processos inflamatórios (STRUNK et al., 2010). Estudo feito por Beitinger et al. (2013) verificou que a presença de fluxo vascular na membrana sinovial detectado com o *Color Doppler* é capaz de diferenciar doenças inflamatórias de não inflamatórias. O aumento na vascularização da membrana sinovial pode ter ocorrido devido a um processo inflamatório (BRAUN; GOLD, 2012; WATANABE et al., 2012; BEITINGER et al., 2013) ou a uma possível neovascularização induzida por fatores de crescimento derivados de plaquetas (ZANDIM et al.; 2012; XIE et al., 2013[12]). Para certificar-se qua a neovascularização ocorreu devido à presença de fatores de crescimento, seria interessante dosar os fatores angiogênicos.

Grande problema na mensuração do fluxo vascular intra-articular é a avaliação semi-quantitativa ou até mesmo qualitativa realizada, o que a torna operador dependente. *Softwares* computacionais para avaliação quantitativa da quantidade de *pixel* formado na tela já foram desenvolvidos (KANG et al., 2013). Entretanto, a sensibilidade do *Color* ou *Power Doppler* no momento do exame continua sendo operador dependente, e a quantidade de *pixels* utilizada para formar a imagem depende do aparelho utilizado.

Como não houve alterações nos biomarcadores inflamatórios, nas citocinas pró-inflamatórias e no aspecto do LS ao exame ultrassonográfico na avaliação semanal, acredita-se que o aumento de vascularização da membrana sinovial tenha ocorrido devido à neovascularização e não a um processo inflamatório.

---

[11] GARRIGUES, F.; JOUSSE-JOULIN, S.; BOUTTIER, R.; NONENT, M.; BRESSOLLETTE, L.; SARAUX, A. Concordance between clinical and ultrasound findings in rheumatoid arthritis**. Joint Bone Spine,** In Press, on line em 29 de abril de 2013.

[12] XIE, X.; ZHAO, S.; WU, H.; XIE, G.; HUANGFU, X.; HE, Y.; ZHAO, J. Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. **Journal of Surgical Research**, E1-E9, 2013.

# 8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com esse trabalho nos permite concluir que o protocolo desenvolvido para obtenção do PRP é possível de ser realizado de maneira asséptica e possui constante repetibilidade. Os leucócitos presentes no PRP não acarretam prejuízos a articulações íntegras.

O exame ultrassonográfico é eficaz em avaliar o fluxo vascular da membrana sinovial, que se apresentou aumentado nas articulações que receberam PRP.

Os achados sugerem que o PRP provoca leve e transitória inflamação articular, contudo não acarreta catabolismo articular.

# REFERÊNCIAS

ABELLANET, I.; PRADES, M. Intraarticular platelet rich plasma (PRP) therapy: evaluation in 42 sport horses with OA. In: **Proceedings...** INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 11th ,2009 - Guarujá, SP.

AHMADIZAD, S.; EL-SAYED, M. S. ; MACLAREN, D. P. Effects of time of day and acute resistance exercise on platelet activation and function. **Clinical Hemorheology and Microcirculation** v. 45, n. 2-4, p. 391-399, 2010.

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

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

ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; ZALDUENDO, M. M.; DE LA FUENTE, M.; AZOFRA, J.; ANDÍA, I. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. **Rheumatology**, v. 46, n. 12, p. 1769-1762, 2007.

AREND, W. P.; GUTHRIDGE, C. J. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 59, p. 60 – 64, 2000. Supplement 1.

AREND, W. P.; MALYAK, M.; GUTHRIDGE, C. J.; GABAY, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 27-55, 1998.

ARNOCZKY, S. P.; DELOS, D.; RODEO, S. A. What is platelet-rich plasma? **Operative Techniques in Sports Medicine,** v. 19, p. 142-148, 2011.

ASFAHA, S.; CENAE, N.; HOULE, S. ALTIER, C.; PAPEZ, M. D.; NGUYEN, C.; STEINHOFF, M.; CHAPMAN, K.; ZAMPONI, G. W.; VERGNOLLE, N. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. **Brithish Journal of Pharmacology,** v. 150, n. 2, p. 176-185, 2007.

BARRY, O. P.; KAZANIETZ, M. G.; PRATICO, D.; FITZ GERALD, G. A. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 7545-7556, 1999.

BEITINGER, N.; EHRENSTEIN, B.; SCHREINER, B.; FLECK, M.; GRIFKA, J.; LURING, C.; HARTUNG, W. The value of colour Doppler sonography of the knee joint: a useful tool to discriminate inflammatory from non-inflammatory disease? **Rheumatology**, 2013.

BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Veterinary Surgery,** v. 30, p. 528-538, 2001.

BIELECKI, T. M.; GAZDZIK, T. S.; ARENDT, J.; SZCZEPANSKI, T.; KROL, W.; WIELKOSZYNSKI,T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. **The Journal of Bone Joint Surgery**, v. 89, n.3, p. 417-420, 2007.

BILLINGHURST, R. C.; FRETZ, P. B.; GORDON, J. R. Induction of intra-articular tumor necrosis factor during acute inflammatory responses in equine arthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, p. 208-216, 1995.

BOSCH, VAN SCHIE, H. T. M.; GROOT, M. W.; CADBY, J. A.; VAN DE LEST, C. H. A.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN; P. R. Effects of Platelet-Rich Plasma on the Quality of Repair of Mechanically Induced Core Lesions in Equine Superficial Digital Flexor Tendons: A Placebo-Controlled Experimental Study. **Journal of Orthopaedic Research Society,** v. 28, p. 211-217, 2010.

BOSWELL, S. G.; COLE, B. J.; SUNDMAN, E. A.; KARAS, V.; FORTIER, L. A. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. **The Journal of Arthroscopy and Related Surgery**, v. 28, n. 3, p. 429-439, 2012.

BRAUN, H. J.; GOLD, G. E. Diagnosis of osteoarthritis: imaging. **Bone,** v. 51, p. 278-288, 2012.

BRHEM, W.; AKLIN, B.; YAMASHITA, T.; RIESER, F.; TRUB, T.; JAKOB, R. P.; MAINIL-VARLET, P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. **Osteoarthritis Cartilage**, n. 14, v.12, p. 1214-1226, 2006.

CALDEIRA, F. M. C.; MUZZI, L. A. L.; MUZZI, R. A. L. Artrose em cães. **Caderno técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.37, p. 53-83, 2002.

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

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

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous platelet concentrates as na adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p.191-195, 2013.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2011. p. 655-668.

CÉLESTE, C.; IONESCU, M.; POOLE, A. R.; LAVERTY, S. Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolismo measured by biomarkers in synovial fluid. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 602-610, 2005.

CIESLIK-BIELECKA, A.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T. S.; ARENDT, J.; KRÓL, W.; SZCZEPANSKI, T. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. **Transfusion and Apheresis Science**, v.41, n.1, p. 9-12, 2009.

CLEGG, P. D.; COUGHLAN, A. R.; RIGGS, C. M.; CARTER, S. D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. **Equine Veterinary Journal**, v.29, n.5, p. 343-348, 1997.

DENOIX, J. M. Joints and miscellaneous tendons (miscellaneous tendons and ligaments). In: RANTANEN, N.; MCKINNON, A. O. **Equine diagnostic ultrasonography.** Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1998. p. 475-521.

DENOIX, J. M. Ultrasonographic examination in the diagnosis of joint disease. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 165-202.

DENOIX, J. M. Ultrasonographic examination of joints in horses: a live demonstration. In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 11; CONFERÊNCIA ANNUAL DA ABRAVEQ, 2009, Guarujá, Brasil. **Proceedings…** Guarujá, Brasil: World Equine Veterinary Association e Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos, 2009.

DENOIX, J. M. Ultrasonographic examination of joints. In: ROSS, M.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011. p. 206-211.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acid mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analitical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DINARELLO, C. A.; THOMPSON, R. C. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. **Immunology Today**, v. 12, n. 11, p. 404-410, 1991.

DUNKEL, B. BOLT, D. M., SMITH, R. K.; CUNNINGHAM, F. M. Stimulus-dependent release of tissue-regenerating factors by equine platelets. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 3, p. 346-354, 2011.

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

FILARDO, G.; KON, E.; RUIZ, M. T. P.; VACCARO, F.; GUITALDI, R.; DI MARTINO, A.; CENACCHI, A.; FORNASARI, P. M.; MARCACCI, M. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy**, v. 20, n. 10, p.2078-2087, 2012.

FORTIER, L. A.; HACKETT, C. H.; COLE, B. J. The effects of platelet-rich plasma on cartilage: basic science and clinical application. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v. 19, p. 154-159, 2011.

FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, M. B.; RODEO, S. A. Platelet rich plasma: from basic science to clinical applications. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 11, p. 2259-2272, 2009.

FRISBIE, D.D.; AL-SOBAYIL, F.; BILLINGHURST, R.C.; KAWCAK, C.E.; MCILWRAITH, C.W. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n.10, p. 1196-1204, 2008.

FUFA, D.; SHEALY, B.; JACOBSON, M.; KEVY, S.; MURRAY, M. M. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 66, p. 684-690, 2008.

FUKUSHIMA, A.; BOYLE, D. L.; CORR, M.; FIRESTEIN, G. S. Kinetic analysis of synovial signalling and gene expression in animal models of arthritis. **Annals of the Rheumatic Disease**, n. 69, p. 918-923, 2010.

GIRALDO, C. E.; LOPEZ, C.; ALVAREZ, M. E.; SAMUDIO, I. J.; PRADES, M.; CARMONA, J. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. **Veterinary Research**, v. 9, n. 29, p. 1-10, 2013.

GODFREY, R. W.; JOHNSON W. J.; NEWMAN, T.; HOFFSTEIN, S. T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor are not synergistic for human synovial fibroblast $PLA_2$ activation and $PGE_2$ production. **Prostaglandins**, v. 35, n. 1, p. 107-114, 1988.

GRAUW, J. C.; LEST, C. H. A.; WEEREN, P. R. V. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. **Arthritis Research Therapy**, v. 11, p. 1-8, 2009.

HAN, B.; WOODEL-MAY, J.; PONTICIELLO, M.; YANG, Z.; NIMNI, M. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. **The journal of bone and joint surgery**, n. 91, p. 1459-1470, 2009.

HARDY, R.; BERTONE, A.L.; WEISBRODE, S.E.; MUIR, W.W.; O´DORISIO, T.M.; MASTY, J. Cell trafficking, mediator release, and articular metabolism in acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joint. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n. 1, p. 88-100, 1998.

HARTLEY, P. S. The diurnal tick-tockery of platelet biology. **Platelets** v. 23, n. 2, p. 157-160, 2012.

HARVEY, A. K.; ILRUBEY, P. S.; CHANDRASEKHAR, S. Transforming growth factor-beta inhibition of interleukin-1 activity involves regulation of interleukin-1 receptors on chondrocytes. **Experimental Cell Research**, v. 195, p. 376-385, 1991.

HAWKINS, D. L.; MACKAY, R. J.; GUM, G. G.; COLAHAN, P. T.; MEYER, J. Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6, and prostaglandin $E_2$ values in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 379-386, 1993.

HAWKINS, D. L.; CARGILE, J. L.; MACKAY, R. J.; BROOME, T. A.; SKELLEY, L. A. Effect of tumor necrosis factor antibody on synovial fluid cytokines activities in equine antebrachiocarpal joints injected with endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.10, p. 1292-1299, 1995.

HORAI, R.; SAIJO, S.; TANIOKA, H.; NAKAE, S.; SUDO, K.; OKAHARA, A.; IKUSE, T.; ASANO, M.; IWAKURA, Y. Development of chronic inflammatory arthropaty resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonista – deficiente mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 2, p. 313-320, 2000.

HULTH, A.; JOHNELL, O.; MIYAZONO, K.; LINDBERG, L.; HEINEGARD, D.; HELDIN, C.H. Effect of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 14, p. 547-553, 1996.

IM, H. J.; PACIONE, C.; CHUBINSKAYA, S.; VAN WIJNEN, A. J.; SUN, Y.; LOESER, R. F. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1 beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 25386-25394, 2003.

ISHIDA, K.; KURODA, R.; MIWA, M.; TABATA, Y.; HOKUGO, A.; KAWAMOTO, T.; SASAKI, K.; DOITA, M.; KUROSAKA, M. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in citro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. **Tissue Engineering**, v. 13, p. 1103-1112, 2007

JAQUES, L. B.; BALLIEUX, R. E.; DIETRICH, C. P.; KAVANAGH, L. W. A microelectrophoresis method for heparin. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 351-360, 1997.

JOUGLIN, M.; ROBERT, C.; VALETTE, J. P.; GAVARD, F.; QUINTIN-COLONNA, F.; DENOIX, J. M. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations.**Veterinary Research**, v. 31, n. 5, p. 507-515, 2000.

KAMM, J. L.; NIXON, A. J.; WITTE, T. H. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 693-699, 2010.

KANG, T.; HORTON, L.; EMERY, P.; WAKEFIELD, R. J. Value of ultrasonound in rheumatologic disease. **Journal of Korean Medical Science**, v.28, p.497-507, 2013.

KEEN, H. I.; CONAGHAN, P. G. Ultrasonography in osteoarthritis. **Radiologic Clinics of North America**, v.47, n.4, p.581-594, 2009.

KIDD, J. A.; FULLER, C.; BARR, A. R. S. Osteoarthritis in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.13, n. 3, p. 160-168, 2001.

KISIDAY, J. D.; MCILWRAITH, C. W.; RODKEY, W. G.; FRISBIE, D. D.; STEADMAN, J. R. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. **Cartilage**, v. 3, n. 3, p. 245-254, 2012.

KON, E.; MANDELBAUM, B.; BUDA, R.; FILARDO, G.; DELCOGLIANO, M.; TIMONCINI, A.; FORNASARI, P. M.; GIANNINI, S.; MARCACCI, M. Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis . **Arthroscopy: the Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 27, p.1490-1501, 2011.

KORENEK, N. L.; ANDREWS, F. M.; MADDUX, J. M.; SANDERS, W. L.; FAULK, D. L. Determination of total protein concentration and viscosity of synovial fluid from the tibiotarsal joints of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 781 – 784, 1992.

KRUGER, J. P.; HONDKE, S.; ENDRES, M.; PRUB, A.; SICLARI, A.; KAPS, C. Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. **Orthopaedic Research Society**, v. 30, p. 845-852, 2011.

KUMM, J.; TAMM, A.; LINTROP, M. Association between ultrasonographic findings and bone/cartilage biomarkers in patients with early-stage knee osteoarthritis. **Calcified Tissue International**, v. 85, p. 514-522, 2009.

LEME, F. O. P.; WURZINGER, L. J.; VASCONCELOS, A. C.; ALVES, G. E. S. Ativação de plaquetas de eqüinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 149-157, 2006.

LINDEMANN, S.; TOLLEY, N. D.; DIXON, D. A.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; WEYRICH, A. S. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1β synthesis. **Journal of Cell Biology**, v.154, n. 3, p. 485-490, 2001.

MACWILLIAMS, P. S.; FRIEDRICHS, K. R. Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. **The Veterinary Clínics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p.153-178, 2003.

MAHAFFEY, E. A. Synovial fluid. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Cytology and hematology of the horse**. Goleta: American Veterinary, 2002. p. 163-170.

MANN, K.G. Biochemistry and physiology of blood coagulation. **Thrombosis and Haemostasis,** v. 82, n. 2, p. 165-174, 1999.

MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, p. 225-228, 2001.

MAZZOCCA, A. D.; MCCARTHY, R.; CHOWANIEC, D. M.; COTE, M. P.; ROMEO, A. A.; BRADLEY, J. P.; ARCIERO, R. A.; BEITZEL, K. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v.94, n.2, p. 308-316, 2012.

MCCARELL, T.; FORTIER, L. Temporal Growth Factor Release from Platelet-Rich Plasma, Trehalose Lyophilized Platelets, and Bone Marrow Aspirate and Their Effect on Tendon and Ligament Gene Expression. **Orthopaedic Research Society**, v. 27, p. 1033-1042, 2009.

MCILWRAITH, C. W. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 473-482, 2005.

MCILWRAITH, C. W.; FESSLER, J. F.; BLEVINS, W. E.; PAGE, E. H.; REBAR, A. H.; VAN SICKLE, D. C.; COPPOC, G. L. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: clinical determinations. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, p. 11-20, 1979.

MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. 490 p.

MCILWRAITH, C. W. Diseases in joints, tendons, ligaments and related structures. In: STASHAK, T. S. **Adam´s lameness in horses.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. p. 459-644.

MCLELLAN, J.; PLEVIN, S. *Evidence-based Clinical Question* Does it matter which platelet-rich plasma we use? **Equine Veterinary Education**, v. 23, p. 101-104, 2011.

MISHEFF, M. M.; STOVER, S. M. A comparision of two techniques for arthrocentesis of the equine metacarpophalangeal joint. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 4, p. 273-276, 1991.

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 34, p. 1774-1778, 2006.

MISHRA, A.; TUMMALA, P.; KING, A.; LEE, B.; KRAUS, M.; TSE, V.; JACOBS, C. R. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. **Tissue Engeniring Part C Methods**.v. 15, p.431–435, 2009.

MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O. M.; THEORET, C. L. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 70, p. 277-282, 2009.

MOOJEN, D. J.; EVERTS, P. A.; SCHURE, R. M.; OVERDEVEST, E. P.; VAN ZUNDERT, A.; KNAPE, J. T.; CASTELEIN, R. M.; CREEMERS, L. B.; DHERT, W. J. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against Staphylococcus aureus. **Journal of Orthopaedic Research**, v.26, n.3, p.404-410, 2008.

NIEMINEN, H. J.; TOYRAS, J.; RIEPPO, J.; NIEMINEN, M. T.; HIRVONEN, J.; KORHONEN, R.; JURVELIN, J. S. Real-time ultrasound analysis of articular cartilage degradation in vitro. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 28, n.4, p.519-525, 2002.

OKASAKI, K.; JINGUSHI, S.; IKENOUE, T.; URABE, K.; SAKAI, H.; OHTSURU, A.; AKINO, K.; YAMASHITA, S.; NOMURA, S.; IWAMOTO, Y. Expression of insulin like growth factor I messenger ribonucleic acid in developing osteophytes in murine experimental osteoarthritis and in rats inoculated with growth hormone-secreting tumor. **Endocrinology**, v. 140, p. 4821-4830, 1999.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L.; MCCLAIN, H. Assessment of glycosaminoglycan concentration in equine synovial fluids as a marker of joint disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 205-212, 1995.

PARK, R.; WRIGLEY, R.; STEYN, P. Equine diagnostic imaging. In: STASHAK, T. S. **Adam´s lameness in horses**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. p. 185-376.

PERSSON, L. On the synovia in horses. A clinical and ecperimental study. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.35, p. 7-77, 1971. Supplement.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; ASSENZA, A.; CAOLA, G. Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n.7, p. 371-375, 2010.

RASERA, L.; MASSOCO, C.O.; LANDGRAF, R.G.; BACCARIN, R.Y.A. Influência do exercício na indução da apoptose e necrose das células do líquido sinovial de equinos atletas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.5, p. 231-236, 2008.

REEF, V. B. Joint Ultrasonography. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 3, p. 256-267, 2004.

RIGGS, C. M. Osteochondral injury and joint disease in athletic horse. **Equine Veterinary Education**, v. 18, n. 2, p.110-112, 2006.

ROSS, T. N.; KISIDAY, J. D.; HESS, T.; MCCILWRAITH, C. W. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, p. 1583-1590, 2012.

ROUSSY, Y.; BERTRAND DUCHESNE, M. P.; GAGNON, G. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 5, p. 639-648, 2007.

SAITO, M.; TAKAHASHI, K. A.; ARAI, Y.; INOUE, A.; SAKAO, K.; TONOMURA, H.; HONJO, K.; NAKAGAWA, S.; INOUE, H.; TABATA, Y.; KUBO, T. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 27, p. 201-207, 2009.

SANCHEZ, M.; ANITUA, E.; AZOFRA, J.; AGUIRRE, J. J.; ANDIA, I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 26, p. 910-913, 2008.

SCHNABEL, L. V., MOHAMMED, H. O.; JACOBSON, M. S.; FORTIER, L. A. Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, p. 260-265, 2008.

SMITH, J. J.; ROSS, M. W.; SMITH, R. K. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts *in vitro*. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatoly,** v.19, p. 43-47, 2006.

SMITH, R. K. Using ultrasound to image joints. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 10th. 2008. **Proceedings...** ,2008. p. 279-282.

STASHAK, T. S. Exame de claudicação. In: STASHAK, T. S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. São Paulo. Roca, 2006. 100 p

STEEL, C. M. Equine synovial fluid analysis. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 24, p. 437-454, 2008.

STRUNK, J.; BACKHAUS, M.; SCHMIDT, W.; KELLNER, H. Color Doppler sonography for investigation of peripheral joints and ligaments. **Zeitschrift für Rheumatologie,** v. 69, n. 2, p. 164-170, 2010.

SUGIUCHI, H.; ANDO, Y.; MANABE, M.; NAKAMURA, E.; MIZUTA, H.; NAGATA, S.; OKABE, H. Measurement of total and differential White blood cell counts in synovial fluid by means of na automated hematology analyzer. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 1, p. 36-47, 2005.

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

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

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; GENT, T.; FREEMAN, S.; FOSTER, N.; BARRETT-JOLLEY, R.; MOBASHERI, A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 10-24, 2009.

TEW, W. P.; HOTCHKISS, R. M. Synovial fluid analysis and equine joint disorders. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 1, p. 163 – 170, 1981.

TEXTOR, J. A. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, p. 275-298, 2011.

TEXTOR, J. A.; NORRIS, J. W.; TABLIN, F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. **American Journal Veterinary Research**, v. 72, p. 271-278, 2011.

TEXTOR, J. A.; TABLIN, F. Intra-articular use of platelet-rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. **Veterinary Surgery**, v. 9999, p. 1-12, 2013.

TODHUNTER, R. J. Anatomy and physiology of sinovial joints. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.1-28.

TULAMO, R-M.; HEISKANEN, T.; SALONEN, M. Concentration and molecular weight distribuition of hyaluronate in synovial fluid from clinically normal horses and horses with disease joints. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 710-715, 1995.

VAN DEN BOOM, R.; VAN DE LEST, C. H. A.; BULL, S.; BRAMA, P. A. J.; VAN WEEREN, P. R.; BARNEVELD, A. Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin $E_2$ and glycosaminoglycans in healthy equine joints. . **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 250-256, 2005.

VAN PELT, R. W. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, p. 91-95, 1974.

VAN PELT, R. W. Properties of equine synovial fluid. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 141, p. 1051-1061, 1962.

VANDERPERREN, K.; MARTENS, A.; DECLERCQ, J.; DUCHATEAU, L.; SAUNDERS, J. Comparision of ultrasonography versus radiography for the diagnosis of dorsal fragmentation of the metacarpophalangeal or metatarsophalangeal joint in horses. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 1, n. 235, p. 70-75, 2009b.

VANDERPERREN, K.; SAUNDERS, J. H. Diagnostic imaging of the equine fetlock region using radiography and ultrassonography. Part 1: Soft tissues. **The Veterinary Journal,** v. 181, n. 2, p. 111-122, 2009a.

VIDRIERO, E. L.; GOULDING, K. A.; SIMON, D. A.; SANCHEZ, M.; JOHNSON, D. H. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. **Arthroscopy: the Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 26, p. 269-278, 2010.

VON RECHENBERG, B.; MCWILRAITH, C. W.; AKENS, M. K.; FRISBIE, D. D.; LEUTENEGGER, C.; AUER, J. A. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE2) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explants cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthtitic joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 2, p. 140-150, 2000.

WALTHER, M.; HARMS, H.; KRENN, V.; RADKE, S.; KIRSCHNER, S.; GOHLKE, F. Synovial Tissue of the Hip at Power Doppler US: Correlation between Vascularity and Power Doppler US Signal. **Radiology**, v. 225, p. 225-231, 2002.

WATANABE, T.; TAKEMURA, M.; SATO, M.; SEKINE, A.; FUKUOKA, D.; SEISHIMA, M.; SHIMIZU, K.; MATSUOKA, T.; Quantitative analysis of vascularization in the finger joints in patients with rheumatoid arthritis using three-dimensional volumetric ultrasonography with power Doppler. **Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 2, p. 299-307, 2012

WEEREN, R. VAN; GRAUW, J. C. Pain in osteoarthritis. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 26, p. 619-642, 2010.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K.; KUNZ-KOSTOMANOLAKIS, M.; LOOS, A. H.; WAGNER, W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 16, n. 5, p. 693-699, 2001.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WEYRICH, A. S.; DIXON, D. A.; PABLA, R.; ELSTAD, M. R.; MACINTYRE, T. T.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMANN, G. A. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** v. 95, n. 10, p. 5556-5561, 1998.

WHITCOMB, M. B. Ultrasonography of the equine tarsus. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTIONERS, 52. 2006, San Antonio – USA. **Proceedings…** Santo Antonio: USA AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTIONERS, 2006. p. 13-16.

WOODAL JR, J.; TUCCI, M.; MISHRA, A.; ASFOUR, A.; BENGHUZZI, H. Cellular effects of platelet rich plasma interleukin-1 release from prp treated macrophages. **Biomedical Sciences Instrumentation**, v. 44, p. 489-494, 2008.

WRIGLEY,R. H. Ultra-sonografia de tendões, ligamentos e articulações. In: STASHAK, T. S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. São Paulo: Roca, 2006. 100 p.

WROBLEWSKI, A. P.; MEJIA, H. A.; WRIGHT, V. J. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 20, p. 98-105, 2010.

YAMADA, A. L. M.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, P. G. G.; FELISBINO, S. L.; QUEIROZ, D. L.; WATANABE, M. J.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 323-332, 2012.

ZANDIM, B. M.; SOUZA, M. V.; MAGALHÃES, P. C.; BENJAMIN, L. A.; MAIA, L.; OLIVEIRA, A. C.; PINTO, J. O.; JÚNIOR, J. I. R. Platelet activation: Ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.1, p. 83-92, 2012.

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