SARAH RAPHAELA TORQUATO SEIDEL

**Correlação entre concentrações plaquetárias e de fator de
crescimento TGF- β presente em plasma rico em plaquetas de
equinos**

São Paulo

2017

SARAH RAPHAELA TORQUATO SEIDEL

Correlação entre concentrações plaquetárias e de fator de crescimento TGF- β presente em plasma rico em plaquetas de equinos

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3526
FMVZ

Seidel, Sarah Raphaela Torquato

Correlação entre concentrações plaquetárias e de fator de crescimento TGF- β presente em plasma rico em plaquetas de equinos. / Sarah Raphaela Torquato Seidel. -- 2017.

95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Plasma rico em plaquetas. 2. Agregação plaquetária. 3. Fator de crescimento.

I. Título.

ERRATA

SEIDEL, S. R. T. **Correlação entre concentrações plaquetárias e de fator de crescimento TGF- β presente em plasma rico em plaquetas de equinos**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	95 f.	92 f.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Correlação entre as concentrações plaquetárias e fatores de crescimento presentes em plasma rico em plaquetas de equinos", protocolada sob o CEUA nº 1209080715, sob a responsabilidade de **Raquel Yvone Arantes Baccarin e equipe; Sarah Raphaela Torquato Seidel** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.

We certify that the proposal "Correlation of platelet concentration and grow factors in equine platelet-rich plasma", utilizing 30 Equines (30 males), protocol number CEUA 1209080715, under the responsibility of **Raquel Yvone Arantes Baccarin and team; Sarah Raphaela Torquato Seidel** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2016** a **07/2017**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **HOVET/FMVZ/USP**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **30**

Linhagem: **Árabe**

Peso: **a**

Resumo: O cavalo atleta é submetido a grandes esforços durante o exercício, podendo sofrer lesões ósseas, tendíneas, ligamentares, articulares e musculares, que prejudicam seu desempenho, e dão início a longos e caros tratamentos; destes, muitas vezes resulta um tecido de baixa qualidade, comprometendo a função da estrutura tratada após a volta aos treinamentos. A fim de se obter uma cicatrização de melhor qualidade e em menor tempo, tem sido pesquisado o emprego de derivados sanguíneos como o plasma rico em plaquetas (PRP).

O fato de serem livres das restrições e dos testes requeridos para produtos farmacêuticos, e possuírem fácil disponibilidade e alta segurança, pois são compostos de produto autólogo, fizeram com que esta terapia biológica autóloga ganhasse rápida popularidade nos últimos cinco a 10 anos. Estas, por sua vez, têm se expandido na clínica de equinos por apresentarem resultados promissores e por não serem consideradas doping.

Ao mesmo tempo, a natureza individualizada do PRP também dificulta os estudos científicos, pois como são autólogos, não existirão produtos idênticos para serem administrados a diferentes indivíduos.

O PRP é descrito como um volume de plasma que contém uma contagem de plaquetas acima da linha de base do sangue total; segundo Anitua et al. (2004) o PRP deve ter ao menos 300.000 plaquetas por microlitro. Outros autores definem o PRP como plasma sanguíneo com uma concentração plaquetária duas a oito vezes superior à concentração normal.

O efeito terapêutico do PRP é decorrente principalmente da degranulação dos grânulos alfa contidos nas plaquetas. Estes possuem em seu interior os fatores de crescimento (FCs): fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas (PDEGF), fator plaquetário-4, fator de angiogênese derivado de plaqueta (PDAF) e fator de crescimento tipo insulina-1 (IGF-1), que são liberados após a degranulação plaquetária. A liberação dos FCs ocorre principalmente na primeira hora, mas continua durante o período de vida da plaqueta (aproximadamente sete dias).

Os fatores de crescimento são importantes peptídeos sinalizadores responsáveis pela regulação do metabolismo celular, interagindo com receptores de superfície celular. Estes fatores provocam aumento da transcrição gênica e produção de proteínas que desencadeiam a proliferação e diferenciação celular, além de aumentar a produção da matriz extracelular e angiogênese, o que facilita o processo de reparação tecidual.

A necessidade de prévia ativação das plaquetas no PRP ainda é um tema controverso. Os principais ativadores plaquetários são: ADP, trombina, colágeno, tromboplastina, cloridrato de cálcio, gluconato de cálcio, ou a combinação de dois ativadores como trombina e cloridrato de cálcio. Também já foi citada a ativação com tromboxane, fator ativador de plaquetas, serotonina, epinefrina, e análogos do endoperoxídeo cíclico. Entretanto, alguns autores acreditam que o PRP não necessite de estímulo exógeno para liberar os fatores de crescimento, como observado em estudos experimentais. Diferentes técnicas são utilizadas para

obtenção do PRP, ocasionando grandes variações na concentração de plaquetas do produto final e na disponibilidade dos fatores de crescimento presentes. A variedade é com relação ao protocolo de preparo, número de plaquetas, uso de anticoagulantes, inclusão de leucócitos e o uso de ativadores.

O processo fundamental para obtenção do PRP é a separação seletiva dos componentes sólidos e líquidos do sangue total através de uma técnica chamada plasmaférese. Contudo, o interesse em facilitar sua obtenção e diminuir custos fez com que surgissem equipamentos automatizados e diversos protocolos e kits (EFEGLU et al., 2004; VENDRAMIN et al., 2006; TEXTOR et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2012)

Para produção mais factível e de bai

Local do experimento:

São Paulo, 08 de junho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SEIDEL, Sarah Raphaela Torquato

Título: **Correlação entre concentrações plaquetárias e de fator de crescimento TGF- β presente no plasma rico em plaquetas de equinos**

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: _____

DEDICATÓRIA

À vó Pureza (in memoriam), que sempre vibrou por minhas conquistas e me impulsionou em meus sonhos. Já são dois anos de sua partida, mas sua presença se faz viva em nossas memórias e corações.

Saudades, vó...

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em todas as suas formas e manifestações me abençoa e me dá forças para trilhar meus caminhos.

Aos meus pais, Damião e Francisca, meus exemplos, meus heróis, minhas preciosidades. Todo agradecimento a vocês ainda será insuficiente.

Aos familiares, de sangue ou não, e amigos. Tenho certeza que suas boas vibrações me auxiliaram nesse percurso!

Ao meu namorado Teylo, pelos anos e anos e anos de companheirismo e “calma que vai dar certo”. Te amo!

À minha orientadora Raquel Yvonne Arantes Baccarin, pelo apoio e acolhida, por ampliar minhas possibilidades na vida acadêmica e expandir meus horizontes no mundo da pesquisa.

Às Raquelzetes, Joice, Juliana, Cynthia e Fernanda. Obrigada pela parceria, pelos conselhos técnicos, por aguentar os dramas e rir dos memes. Essa equipe é demais!

Aos colegas de pós-graduação, Guilherme, Paulo, Ayrton, Henrique, Júlio, Zana, Rodrigo, residentes e enfermeiros do HOVET, Marquinhos e Cícero, obrigada por tornar essa jornada mais agradável.

À técnica Maria Helena Pelissari, pelo apoio clínico, dicas hematológicas e bom humor contagiante no meio de tanta correria.

Às professoras Yara Maria Corrêa da Silva Michelacci e Maria Luiza Vilela Oliva, da Unifesp, por me mostrar outras perspectivas e abrir as portas da instituição.

À toda equipe da Unifesp que me recebeu de braços abertos, em especial à Tati, que me guiou no mundo da agregometria, e Lu, Rai, André, Cris e Rafa. Nossos almoços eram sempre deliciosos!

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado, uma ajuda sempre bem-vinda!

Aos queridos cavalos, que se doaram involuntariamente e a todo momento colaboraram para a execução desse projeto. Trabalhar por vocês e com vocês é um privilégio!

“Vamos pensar o impensável, vamos fazer o impossível. Vamos nos preparar para lidar com o próprio inefável, e ver se não podemos expressá-lo depois. ”

Douglas Adams

RESUMO

SEIDEL, S.R.T. **Correlação entre concentrações plaquetárias e de fator de crescimento TGF- β presente no plasma rico em plaquetas de equinos.** [Correlation between platelet concentration and growth factor TGF- β present in platelet-rich plasma of horses]. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os hemoderivados têm sido utilizados com frequência cada vez maior na medicina equina, sendo caracterizados como um produto autólogo, com maior quantidade de fatores de crescimento e que melhora a capacidade de cicatrização de tecidos com pouco aporte sanguíneo, como tendões e articulações, diminuindo o tempo de recuperação do animal. Sabe-se que os fatores de crescimento são derivados das plaquetas, porém a correlação positiva entre o aumento na contagem plaquetária e a maior concentração de fatores de crescimento ainda é motivo de discussão entre os autores. Com o intuito de se obter um produto final com maior contagem plaquetária, é frequente o aumento da velocidade ou número de centrifugações na metodologia empregada, aumentando o risco de agregação plaquetária precoce. O objetivo do presente trabalho é estudar o efeito da dupla centrifugação no preparo de PRP, por meio da comparação entre contagens plaquetárias, concentrações de fator de crescimento TGF- β 1, e grau de ativação plaquetária por meio da porcentagem de agregação. Foram utilizados 12 equinos, machos, de 3 a 5 anos, clinicamente sadios. Para tanto foram realizados dois protocolos distintos: um com centrifugação única e o outro com dupla centrifugação. No primeiro, o sangue com anticoagulante foi centrifugado a 141G/12 minutos; enquanto no segundo a primeira centrifugação foi de 300G/5 minutos seguida de 700G/15 minutos, com repouso entre as mesmas e após. Os produtos obtidos após cada centrifugação foram submetidos à contagem plaquetária, teste de agregação e quantificação de TGF- β 1 por meio de *kit* ELISA. Os resultados obtidos demonstraram maior concentração plaquetária quando utilizado protocolo de dupla centrifugação. Agregometria evidenciou maior ativação das plaquetas durante o preparo do PRP quando submetidas a maiores velocidades de centrifugação (força gravitacional) e não ao fato das amostras serem centrifugadas duas vezes. A quantificação do TGF- β 1 não mostrou diferença quando realizado em amostras com apenas uma centrifugação, mas demonstrou valores maiores no

produto final da segunda centrifugação. A avaliação por meio de coeficiente de determinação e coeficiente de correlação de Pearson evidenciou correlação positiva entre contagem plaquetária e de TGF- β 1. O protocolo com dupla centrifugação se mostrou mais eficaz em concentrar plaquetas e TGF- β 1, não sendo prejudicado pela ativação precoce dessas plaquetas durante o preparo.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas. Agregação plaquetária. Fator de crescimento.

ABSTRACT

SEIDEL, S.R.T. **Correlation between platelet concentration and growth factor TGF- β present in platelet-rich plasma of horses.** [Correlação entre concentração plaquetária e de fator de crescimento TGF- β presente no plasma rico em plaquetas de equinos]. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Blood derived products have been used in equine medicine with increasing frequency, being characterized as an autologous product, with greater amount of growth factors and be capable of improvement the healing capacity in tissues with poor blood supply, such as tendons and joints, reducing the time of recovery of the animal. It is known that the growth factors are derived from platelets, but the positive correlation between the increase in platelet count and the higher concentration of growth factors is still a reason for discussion among the authors. In order to obtain a final product with a higher platelet count, it is frequent to increase the speed or number of centrifugations in the methodology employed, increasing the risk of early platelet aggregation. The aim of the present study is to verify the effect of double centrifugation in PRP preparation by comparing platelet counts, TGF- β 1 growth factor concentrations, and degree of platelet activation through percentage of aggregation. Twelve horses, male, aged 3 to 5 years-old, clinically healthy were subjected. Two different protocols were performed: one with single centrifugation and the other with double centrifugation. In the first one, the anticoagulated blood was centrifugated at 141G/12 minutes; while in the second one the first centrifugation was 300G/5 minutes followed by 700G/15 minutes, with rest between them and after. The products obtained after each centrifugation were submitted to platelet counting, aggregation test and measurement of TGF- β 1 by ELISA *kit*. The results showed a higher platelet concentration when double centrifugation protocol was used. The aggregometry test evidenced a greater activation of the platelets during the preparation of PRP when submitted to higher centrifugation velocities (times g), and not to double centrifugation. Quantification of TGF- β 1 showed no difference when performed on samples with only one centrifugation, but was higher values in the final product of the second centrifugation. The determination coefficient and Pearson's correlation coefficient showed a positive correlation between the platelet count and TGF- β 1 concentration. The double centrifugation protocol proved to

be more effective at concentrating platelets and consequently higher amounts of TGF- β 1, not being impaired by early activation during obtainment.

Keywords: Platelet-rich plasma. Platelet aggregation. Growth factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de plaqueta demonstrando os componentes visíveis por micrografia eletrônica e citoquímica.	27
Figura 2 - Micrografia eletrônica em camadas evidenciando a ultraestrutura do esqueleto de plaqueta equina em repouso.	28
Figura 3 - Estágios de alteração de forma apresentados pela plaqueta durante processo de ativação.	38
Figura 4 - Ilustração esquemática dos respectivos receptores e agonistas plaquetários.....	39
Figura 5 - Esquema de realização dos protocolos para obtenção dos hemoderivados.....	47
Figura 6 - Resposta plaquetária após adição de agonista em PRP-0, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016	55
Figura 7 - Resposta plaquetária após adição de agonista em PPP-1, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016	56
Figura 8 - Resposta plaquetária após adição de agonista em PRP-1, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016	56
Figura 9 - Enquadramento parcial de câmara de Neubauer contendo amostra de PRP-1 – São Paulo – 2016	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem do número total de plaquetas ($\times 10^3$ plaquetas/ μ l) presentes no sangue total e após protocolos de obtenção do PRP – São Paulo – 2016.....	52
Tabela 2 - Concentração plaquetária alcançada após protocolos de obtenção do PRP – São Paulo – 2016.....	53
Tabela 3 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da porcentagem (%) de agregação plaquetária após protocolos de obtenção do PRP, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016	54
Tabela 4 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TGF- β 1 (pg/ml) resultantes após protocolos de obtenção de PRP – São Paulo – 2016	58
Tabela 5 - Concentração de TGF- β 1 (pg) relacionada ao volume total (ml) obtido após cada centrifugação – São Paulo – 2016	59
Tabela 6 - Razão entre concentração de TGF- β 1 e contagem plaquetária obtida após cada centrifugação – São Paulo – 2016.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Contagem do número total de plaquetas ($\times 10^3$ plaquetas/ μ l) presentes no sangue total e após protocolos de obtenção do PRP – São Paulo – 2016.....	53
Gráfico 2 - Porcentagem de agregação plaquetária após protocolos de obtenção do PRP, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016	55
Gráfico 3 - Média e desvio padrão de TGF- β 1 (pg/ml) resultantes após protocolos de obtenção de PRP – São Paulo – 2016	58
Gráfico 4 - Box plot contendo mediana e concentração de TGF- β 1 (pg/ml) resultantes após protocolos de obtenção de PRP – São Paulo – 2016	59
Gráfico 5 - Correlação entre concentração plaquetária e de TGFB-1 – São Paulo – 2016	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fatores de crescimento: origem e ação	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BMP	Proteína Óssea Morfogênica
COX	Cicloxygenase
CTGF	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
CTM	Células tronco mesenquimais
DAG	Diacylglicerol
DEPA	Dose, Eficiência, Pureza, Ativação
FC	Fator de Crescimento
FvW	Fator de von Willebrand
g	Gauge
G	Força Centrífuga
GDP	Guanosina Difosfato
GP	Glicoproteína
GTP	Guanosina Trifosfato
IGF	Fator de Crescimento Tipo Insulina
IP3	Inositol Trifosfato
kDa	Kilodalton
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligrama
ml	Mililitro
OA	Ostaoartrite
PAR	Receptores de Protease Ativados
PAW	Plaquetas, Ativação, Leucócitos (White blood cells)
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pg	Picograma
PGE1	Prostaglandina E1
PGH2	Prostaglandina H2
PLRA	Platelet, Leukocyte and Red blood cel concentration and Activation
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRF	Fibrina Rica em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
TGF β	Fator de Crescimento Transformante
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
TX	Tromboxano
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	PLASMA RICO EM PLAQUETAS	25
2.1.1	Plaquetas.....	26
2.1.2	Fatores de crescimento	29
2.1.3	Obtenção do PRP	33
2.1.4	Ativação do PRP.....	37
2.1.5	Avaliação da ativação plaquetária	41
3	JUSTIFICATIVA	44
4	OBJETIVOS	45
4.1	OBJETIVO GERAL	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
5.1	ANIMAIS	46
5.2	MÉTODO DE OBTENÇÃO DO PRP	46
5.3	CONTAGEM PLAQUETÁRIA E LEUCOCITÁRIA	49
5.4	AVALIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	49
5.5	MENSURAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO TGF-B1.....	50
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
7	RESULTADOS	52
7.1	CONTAGEM PLAQUETÁRIA E LEUCOCITÁRIA	52
7.2	AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	54
7.3	MENSURAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO TGF-B1.....	57
7.4	CORRELAÇÃO ENTRE CONTAGEM PLAQUETÁRIA E TGF-B1	60
8	DISCUSSÃO	62

9	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

No universo equestre o cavalo está continuamente sendo utilizado para trabalho, e o animal atleta é submetido de forma rotineira a novos tipos de treinos e desafios com o intuito de obter a melhor *performance* possível. Tais exigências levam a um desgaste natural, comumente desencadeando distúrbios locomotores, motivo de grande apreensão por parte dos proprietários e médicos veterinários devido à consequente diminuição do desempenho e qualidade de vida do animal, aliado à geração de ônus financeiro e incerteza do retorno à função.

O uso de hemoderivados surge como estratégia para o tratamento das afecções que acometem os diferentes tecidos do sistema musculoesquelético. Apesar de difícil padronização, os hemoderivados, em particular o plasma rico em plaquetas (PRP), têm mostrado efeitos benéficos no tratamento de várias enfermidades musculoesqueléticas em equinos, melhorando a reparação tecidual, diminuindo o número de recidivas da lesão e o tempo necessário para a volta às competições (VENDRUSCOLO et al., 2014).

A maioria dos estudos clínicos em equinos produzem resultados positivos em relação ao uso do PRP, já os resultados dos ensaios clínicos em humanos não mostram a mesma eficácia. Os resultados benéficos em ambas as espécies são mais frequentes em estudos com alto risco de viés (BROSSI et al., 2015), e a evidência clínica dos efeitos benéficos do PRP no tratamento de lesões em tendões, ligamentos e cartilagem, ainda permanece falha.

Um dos fatores que prejudicam esta comprovação é a difícil padronização do produto, apesar de ser alvo de inúmeros estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*. A correta caracterização desse produto, considerando desde a forma de preparo até a apresentação final de seus constituintes, visa proporcionar uma aplicação mais direcionada e assertiva na terapia locomotora, resultando em melhor resposta terapêutica. Em especial, este trabalho tem como interesse a caracterização do PRP para melhor estudar seus efeitos no ambiente articular, ou seja, ação condroprotetora e de modulação da inflamação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O conceito de terapias derivadas de plaquetas teve início em meados dos anos 70, quando Ross et al. (1974) percebeu melhores resultados na capacidade mitogênica do plasma/soro após adição de plaquetas com cálcio ou sobrenadante derivado de plaquetas com trombina; concluindo que as plaquetas poderiam apresentar uma maior fonte de efeitos proliferativos. Nos anos seguintes alguns dos fatores de crescimento foram descobertos e caracterizados, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (WITE et al., 1978; KAPLAN et al., 1979), fator de crescimento transformante beta (TGF β) (ASSOIAN et al., 1983), fator de crescimento tipo insulina (IGF-1) (KAREY & SIRBASKU, 1989), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (BRUNNER et al., 1993) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BANKS et al., 1998).

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é classificado como um produto autólogo, hemoderivado, de fácil aquisição e baixo custo, apresentando em sua composição plaquetas, fatores de crescimento, proteínas plasmáticas, algumas hemácias e leucócitos; sendo capaz de auxiliar na reparação tecidual devido sua atividade mitótica, quimiotática e neovascular (MAIA et al., 2008; MARX, 2001).

O primeiro uso clínico do PRP na medicina foi reportado por Marx et al. (1998) como tratamento na reconstrução de defeitos mandibulares em pessoas. Desde então, tem sido documentado seu emprego na medicina humana em diferentes campos terapêuticos, como cirurgia oral e maxilofacial, regeneração neural, oftalmologia, terapia cardiovascular, dermatologia, cosmética, engenharia de tecidos e ortopedia (ANITUA et al., 2012; LUBKOWSKA et al., 2012). Seus resultados satisfatórios encorajaram a aplicação do mesmo na medicina equina, concentrando-se predominantemente nas afecções locomotoras, com boa resposta terapêutica em desmites (WASELAU et al., 2008), tendinites (MAIA et al., 2009; BOSCH et al., 2010), laminite crônica (CARMONA; LÓPEZ; SAMUDIO, 2013) e uso intra-articular (FORTIER et al., 2002).

2.1.1 Plaquetas

As plaquetas são originadas de prolongamentos de megacariócitos $16n$ a $64n$, que após seccionados são liberados na corrente sanguínea (HARTWIG; ITALIANO, 2003), apresentando-se nos equinos de formato predominantemente discoide com 5 a 7 μm de comprimento e largura de 1 a 3 μm (GENTRY, 2000), podendo ser encontradas com até 20 μm de diâmetro na corrente sanguínea (ARGÜELLES et al., 2006).

Possuem uma vida útil de 5 a 9 dias na circulação sanguínea, sendo removidas por apoptose após alterações em sua estrutura de superfície, que ocorre predominantemente por meio das células de Kupffer e hepatócitos (GROZOVSKY et al., 2010). Na circulação, as plaquetas são suscetíveis a sofrer alterações físicas, bioquímicas e funcionais, o que colabora para sua heterogeneidade; sua resposta funcional é variável e relacionada ao seu tamanho e idade, sendo atribuída uma maior capacidade hemostática àquelas maiores e mais jovens (KARPATKIN, 1978; HARTLEY, 2007; PEREIRA, 2008).

Com o intuito de promover uma melhor compreensão da anatomia plaquetária, alguns autores propõem que sua estrutura seja dividida em quatro zonas: (1) periférica; (2) sol-gel; (3) zona de organelas; (4) membranas (Figura 1). Esta divisão, entretanto, não é amplamente aceita, já que é artificial e não descreve bem a função plaquetária. Apesar disso, descrevemos a seguir cada uma dessas “zonas”.

A zona periférica consistiria de membranas e estruturas associadas à superfície plaquetária (WHITE, 1979). Sua membrana plasmática é composta por uma bicamada fosfolipídica, na qual colesterol, glicolipídios e glicoproteínas estão incorporados (SMYTH et al., 2010). Fosfolipídeos com carga negativa, como fosfatidilserina e fosfatidilinositol, estão presentes predominantemente na lamela interna da membrana, o que mantém a superfície plaquetária em um estado de “não coagulação”. A assimetria fosfolipídica é mantida por flipases, translocases aminofosfolipídicas ATP-dependentes, que movem ativamente os fosfolipídeos de carga negativa da lamela externa para a lamela interna da membrana (HEEMSKERK; BEVERS; LINDHOUT, 2002).

Figura 1 - Ilustração de plaqueta demonstrando os componentes visíveis por micrografia eletrônica e citoquímica.

Fonte: (BENTFELD-BARKER e BAINTON, 1982).

Legenda: À esquerda, corte equatorial e à direita, longitudinal. Componentes e organelas assinalados de cima à baixo: Microtúbulos, Grânulos Densos, Sistema Canalicular Aberto, Mitocôndria, Grânulos Alfa, Glicogênio, Sistema Tubular Denso, Peroxissomo, Lisossomo, Membrana Plasmática.

O citoesqueleto plaquetário (Figura 2) encontra-se na zona cortical sol-gel e é composto por uma rede formada por filamentos de actina, ao qual se liga a proteína espectrina. Essa rede liga-se a proteínas integrais de membrana por meio das proteínas adaptadoras. (TEXTOR, 2014; LODISH et al., 2004). A rede de filamentos de espectrina-actina faz interações com uma proteína de ligação à actina, denominada filamina A, a qual se liga ao complexo GPIb/IX/V, integral de membrana, que também é um receptor, na superfície plaquetária, para fatores da coagulação do sangue (SMYTH et al., 2010).

Figura 2 - Micrografia eletrônica em camadas evidenciando a ultraestrutura do esqueleto de plaqueta equina em repouso.

Fonte: (HARTWIG et al., 1999).

Legenda: Da porção mais externa à porção mais interna: Membrana plasmática, esqueleto da membrana, esqueleto de espectrina, esqueleto de actina, anel de microtúbulo.

As integrinas, associadas internamente ao citoplasma com as proteínas de sinalização, como proteínas G e tirosina-quinase, e externamente ao meio através de subunidades com domínios extracelulares; são capazes de produzir agregação e adesão plaquetária (TABLIN, 2000; PELAGALLI et al., 2003). A resposta plaquetária se produz por uma atividade contrátil mediada pela polimerização do complexo actina-miosina, sendo que os microtúbulos citoplasmáticos mantêm a forma discoide e guiam os movimentos gerados pelo complexo actina-miosina (HARTWIG; ITALIANO, 2003). A centralização dos componentes do esqueleto da membrana é provavelmente mediada pela miosina IIA, forma predominante da miosina II presente nas plaquetas, a qual apresenta importantes funções na formação plaquetária, ativação e contração (HEATH et al., 2001; BEARER, 2005).

Os grânulos e componentes plaquetários constituem a zona de organelas. São conhecidos dois tipos de grânulos plaquetários: densos e alfa. Os grânulos densos, presentes em menor quantidade, contém componentes de baixo peso molecular que regulam a agregação, como a serotonina, ADP, ATP, GDP, GTP, histamina, cálcio, magnésio e polifosfato (RENDU; BROHARD-BOHN, 2001). Os grânulos alfa contém proteínas. São microvesículas de 300 a 500 nm (MAYNARD et

al., 2007), sendo responsáveis pela coloração arroxeada no esfregaço sanguíneo típico (BOSWELL et al., 2012), e contém biomoléculas ativas como proteínas adesivas (fibrinogênio, fator de von Willebrand), receptores, fatores de coagulação (V, XI, XIII, pro-trombina), fatores fibrinolíticos (antitrombina, plasmina, plasminogênio), outras proteínas básicas, glicoproteínas de membrana e fatores de crescimento (ANITUA et al., 2004). As proteínas presentes nos grânulos alfa desempenham importante papel em relação às funções plaquetárias como formação e crescimento de trombos, modulação inflamatória e estímulo à síntese de matriz extracelular (MEC) durante a cicatrização de feridas (GENTRY, 2000), porém há indícios que a distribuição dessas proteínas não ocorre de maneira uniforme, sugerindo a existência de subpopulações distintas de grânulos alfa com liberação cinética diferenciada (SEHGAL; STORRIE, 2007; ITALIANO et al., 2008).

Os demais componentes da zona de organelas incluem as mitocôndrias, envolvidas no metabolismo de energia oxidativa (HOLMSEM, 1993), peroxissomos, que contém a enzima catalase, e lisossomos, compostos por proteinases como catepsinas, elastase e colagenase, além de glicosidase e heparinase, os quais contribuem com a regulação da formação de trombo, remodelação da matriz extracelular e lise de coágulos (CIFERRI et al., 2000; RENDU; BROHARD-BOHN, 2001).

A quarta zona, denominada sistema membranar, apresentaria o Sistema Tubular Denso (STD), onde é armazenado o cálcio intracelular, o qual é liberado por meio do mensageiro solúvel inositol 1,4,5 trifosfato. O STD também atua na síntese de prostaglandina e tromboxano, e é o local onde se encontra a enzima cicloxigenase (HARTWIG, 2002; ITALIANO et al., 2008).

Além das funções hemostáticas, as plaquetas também têm demonstrado ações bactericida e fungicida, presença de fatores de coagulação e glicoproteínas de membrana capazes de influenciar a inflamação (FORTIER; HACKETT; COLE, 2011), propriedades analgésicas mediante liberação de peptídeos ativadores de proteases (ASFAHA, 2007), e fatores capazes de induzir a proliferação e reparo celular, como os lipídios bioativos e espécies de oxigênio reativo, não limitando seus efeitos anabólicos estritamente aos fatores de crescimento (TEXTOR, 2014).

2.1.2 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento (FC) são proteínas biologicamente ativas que podem ser produzidos por diferentes tipos de células, podendo tanto ser produzidos autocrinamente pela célula alvo ou liberados através da membrana plasmática das células adjacentes (TAKAHASHI et al., 2007). Essas proteínas atuam em nível de membrana celular, provocando uma cascata bioquímica que leva a sua ação direta no núcleo da célula, resultando em estímulos como divisão celular, crescimento e diferenciação (FORTIER et al., 2011).

Segundo Everts (2007), os FCs derivados das plaquetas podem ser classificados em dois grupos: os de ação morfométrica, envolvidos principalmente com crescimento ósseo mediante presença da proteína óssea morfogênica (BMP); e os de ação mitogênica, capazes de aumentar a população de células saudáveis por mitogênese, sendo comum à maioria dos FCs. Tratam-se de proteínas que juntamente com moléculas de sinalização podem atingir um ambiente molecular adequado que permita atividade anabólica com proliferação celular, diferenciação e quimiotaxia (EVERTS, 2007; CUGAT et al., 2015).

A liberação dos FC não se restringe unicamente às plaquetas, e alguns, como o TGF β , são sintetizados pela maioria das células do organismo, estando envolvidos em grande parte dos processos fisiológicos. Cada FC pode ainda desempenhar uma ou mais funções, sendo sua atividade específica sobre grupos celulares determinada pelo ambiente celular no qual se encontra (CUGAT et al., 2015). No quadro 01 há uma breve descrição dos principais FCs plaquetários, suas origens e principais ações.

Dentre os FCs presentes no PRP, o TGF β merece destaque devido sua abrangência na resposta celular de diversos tecidos. A superfamília do TGF β apresenta três isoformas: β 1, β 2 e β 3, incluindo também a BMP, possuindo peso molecular de 25kDa (LUBKOWSKA; DOLEGOWSKA; BANFI, 2012). Embora possuam algumas atividades semelhantes, cada isoforma possui modos de ação específicos.

O TGF- β 1, em estudos *in vitro*, mostrou-se capaz de estimular a condrogênese na membrana sinovial e em células tronco derivadas de medula (DENKER; NICOLL; TUAN, 1995; BAUGÉ et al., 2013); também estimula a atividade de condrócitos e diminui a atividade catabólica de IL-1 (BAUGÉ et al., 2007), aumenta a síntese de matriz extracelular cartilaginosa, diminui a inflamação articular e promove

diferenciação de células tronco (CARON, 2003). A isoforma $\beta 2$ apresenta potencial condrogênico sobre condrócitos (LEHMANN et al., 2013), estimula crescimento de células tronco mesenquimais (CALS et al., 2012) e combate a degradação de colágeno em explantes de cartilagem (TCHETINA et al., 2006). Já a isoforma $\beta 3$ estimula a síntese de matriz extracelular e tem sido avaliada em modelos *in vitro* de injúria aguda em cartilagens de coelhos (FAN et al., 2010; KURTH et al., 2007; LEE et al., 2010), apresentando potencial condrogênico, associada ou não à BMP-6, em células tronco derivadas de tecido adiposo e de medula óssea de equinos (VIDAL et al., 2009; SHADEMAN; PARHAM; DEHGHANI, 2016).

Acredita-se que o TGF- $\beta 1$ desempenhe importante função no tratamento de inflamações articulares, conforme resultados apresentados por experimentos *in vitro* e *in vivo* que evidenciam sua eficácia em reduzir degradação de proteoglicanos induzida por citocinas pró-inflamatórias (VAN BEUNINGEN et al., 1993; VAN BEUNINGEN et al., 1994), sendo indicado como uma alternativa promissora ao tratamento de defeitos articulares, sejam eles parciais ou completos (HUNZIKER; SCHENK, 1995; HUNZIKER; ROSENBERG, 1994). Porém há indícios que altas doses possam estimular proliferação sinovial e fibrose, atração de leucócitos inflamatórios à membrana sinovial e indução de formação de osteófitos (BAKKER et al., 2001; BLANEY DAVIDSON; VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2007)

Quadro 1 - Fatores de crescimento: origem e ação

(continua)

Fator de crescimento	Origem	Ação
PDGF	Plaquetas, macrófagos, monócitos, células endoteliais, osteoblastos	Mitogênico para tecido conjuntivo e células de origem mesenquimal; quimiotático para fibroblastos, células musculares, neutrófilos e células mononucleares; estimula fagocitose dos neutrófilos, síntese de colágeno e regula collagenase
TGF β	Plaquetas, MEC óssea, matriz cartilaginosa, células TH1 ativas e natural killer, macrófagos/monócitos e neutrófilos	Migração celular, neovascularização e angiogênese; melhora síntese e inibe a degradação da MEC; regula síntese de colágeno e secreção de collagenase; ação mitogênica sobre outros FCs, inibe proliferação de macrófago e linfócitos

(conclusão)

Fator de crescimento	Origem	Ação
bFGF	Plaquetas, macrófagos, células mesenquimais, condrócitos, osteoblastos	Crescimento e diferenciação de condrócitos e osteoblastos; mitogênico para células mesenquimais, condrócitos, osteoblastos, fibroblastos e mioblastos; inibe síntese de colágeno tipo 1
EGF	Plaquetas, macrófagos, monócitos, células renais, glândulas submandibular, lacrimal e de Brunner	Estimula angiogênese e quimiotaxia em células endoteliais; regula secreção de collagenase; aumenta expressão de fibroblastos, pré-osteoblastos e pré-condrócitos
VEGF	Plaquetas, células endoteliais	Aumenta angiogênese e permeabilidade vascular; mitogênico para células endoteliais
IGF	Plasma, células epiteliais, endoteliais, hepáticas e do músculo liso; fibroblastos, osteoblastos, matriz óssea	Formação de matriz óssea, síntese de osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo 1 pelos osteoblastos; proliferação e diferenciação de MSC em células condrogênicas, adipogênicas, miogênicas e neurogênicas
CTGF	Plaquetas com endocitose para medula óssea	Angiogênese, regeneração cartilaginosa, fibrose e adesão plaquetária

Fonte: (EVERTS, 2007; DHURAT; SUKESH, 2014; CUGAT et al., 2015).

Apesar do TGF β ser liberado por plaquetas, já na sua forma ativa (BLAKYTNY et al., 2004), outras células, dentre elas os macrófagos, também podem secretá-lo, porém em uma forma latente, necessitando de posterior ativação para alcançar as células alvo (DOYLE et al., 2012). Ele é capaz de atuar tanto de forma autócrina quanto parácrina, sendo portanto um FC com características de longo prazo na sua ação (BECK et al., 1993; EVERTS, 2007). Em seu mecanismo parácrino, age nas células próximas fazendo com que liberem proteínas de TGF β , sendo esse processo de ativação mantido pelo mecanismo autócrino, envolvendo FCs secretados pela célula em seus próprios receptores de membrana (RUDKIN; MILLER, 1996). Dessa forma, após secreção pelas plaquetas ou macrófagos, o TGF β pode causar efeitos nas células adjacentes, incluindo fibroblastos, células mesenquimais, endoteliais e pré-osteoblastos; podendo estimular angiogênese, condrogênese, produção de

fibronectina, glicosaminoglicanos e colágeno; bem como estimular os monócitos a secretarem FGF, PDGF, TNF- α e Interleucina-1 (LUBKOWSKA; DOLEGOWSKA; BANFI, 2012).

O papel do TGF β no desenvolvimento e manutenção da cartilagem articular já foi bem definido e caracterizado, ou seja, apresenta a habilidade de modular a biossíntese de diversos componentes da MEC (GELB; ROSIER; PUZAS, 1990; MORALES; JOYCE; ROBERTS, 1991; MALEMUD, 1993). Dentre seus efeitos já relatados na literatura, estão: produção de colágeno tipo II e agregam, aumento de inibidores de protease, bloqueio da degradação da MEC (BLANEY DAVIDSON; VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2007; VAN DER KRAAN ET AL., 2009); manutenção da homeostase da matriz cartilaginosa (BLANEY DAVIDSON et al., 2005; PLAAS et al., 2011), e indução condrogênica de células-tronco mesenquimais (FREYRIA; MALLEIN-GERIN, 2012).

Porém, seu uso intra-articular pode apresentar respostas indesejadas na cartilagem, como estímulo para crescimento de osteófitos, inflamação e efeitos fibrogênicos (BAKKER et al., 2001; FORTIER; HACKETT; COLE, 2011). Em trabalho mensurando a isoforma TGF- β 1 em líquido sinovial de equino, Anderson et al. (1998) encontraram uma concentração média de 885 pg/ml em articulações saudáveis, sendo que ao classificar os animais pela faixa etária, os mais jovens alcançavam maiores valores, chegando a 1.011 pg/ml, enquanto os animais adultos apresentavam valores inferiores. A presença do fator no líquido sinovial, mesmo em sua forma latente, pode contribuir para uma resposta exacerbada após a administração de FC exógeno.

2.1.3 Obtenção do PRP

Muitos pesquisadores têm buscado obter preparações ricas em plaquetas (PRP) para que essas plaquetas, uma vez ativadas, liberem seus fatores de crescimento nos tecidos ou órgãos lesionados. Portanto, não é desejável que as plaquetas sejam “ativadas” e liberem o conteúdo de seus grânulos alfa durante o processo de obtenção do PRP. Entretanto, a grande diversidade nas técnicas empregadas para a obtenção do PRP dificulta sua padronização, à medida que cada protocolo resulta em um produto com características únicas e diferente potencial terapêutico.

Assim como a falta de padronização de técnicas, o PRP e seus derivados também não possuem uma classificação que seja utilizada de maneira uniforme e geral. No sistema descrito por Ehrenfest et al. (2014), a classificação do PRP se baseia em dois fatores: conteúdo celular e arquitetura de fibrina; agrupando o PRP em quatro tipos. Plasma rico em plaquetas puro (P-PRP), sem leucócitos e com rede de fibrina de baixa densidade; Leucócito e plasma rico em plaquetas (L-PRP), com maior concentração de leucócitos e fibrina de baixa densidade; Fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF), livre de leucócitos e com fibrina de alta densidade; Leucócito e fibrina rica em plaquetas (L-PRF), combinando alta concentração de leucócitos e fibrina de alta densidade.

Outro sistema de classificação, proposto por DeLong et al. (2012), baseia-se em três fatores, sendo denominado PAW (*Platelets, Activation system, White blood cells*). Caracteriza os produtos de PRP de acordo com a concentração plaquetária, crescente de P1 a P4; uso de ativador exógeno, assinalado como x; concentração leucocitária acima ou abaixo da basal, A e B; bem como a concentração de neutrófilos, α e β . De acordo com essa metodologia, um PRP contendo 1.000.000 de plaquetas/ μ l, ativado com cloreto de cálcio e sem leucócitos ou neutrófilos seria denominado P3-x-B β . Há ainda outros sistemas de classificação, como os sugeridos por Mishra et al. (2012), destinado apenas para aplicações na medicina esportiva; Mautner et al. (2015) e sua metodologia PLRA com ênfase ao volume administrado e frequência de aplicações; e Magalon et al. (2016) com a classificação DEPA. Em tais classificações comumente se consideram a concentração plaquetária, se há enriquecimento leucocitário e uso ou não de ativadores exógenos; porém é incomum a utilização de tais sistemas em grande parte da literatura vigente.

Para obtenção do PRP, é necessário que ocorra a separação seletiva dos componentes sólidos e líquidos do sangue total por intermédio de uma técnica denominada aférese (WEIBRICH, 2001), e as metodologias empregadas para atingir a adequada separação dos componentes sanguíneos incluem centrifugação simples ou dupla de tubos ou sistemas comerciais, sistemas automatizados como equipamentos de plasmaferese e *kits* que utilizam filtração (SUTTER; KANEPS; BERTONE, 2004; ARGÜELLES et al., 2006). Aférese e os sistemas automatizados minimizam possibilidade de erro do operador, têm alta repetibilidade, atingem altas concentrações plaquetárias e possuem baixo risco de contaminação; enquanto o sistema de centrifugação de tubo comercial proporciona PRP com mínima

manipulação e baixo risco de contaminação; porém ambas as metodologias necessitam de equipamentos especializados, aumentando o custo da produção (SUTTER; KANEPS; BERTONE, 2004; MCLELLAN; PLEVIN, 2011).

A técnica de coleta por tubos é simples e pouco onerosa, exigindo laboratório com centrífuga e preferencialmente uma câmara de fluxo para sua manipulação, pois apresenta maior possibilidade de contaminação devido coleta manual do PRP, bem como maiores cuidados e atenção por parte do operador (TEXTOR, 2011; FONTENOT et al., 2012). Segundo Efeoglu et al. (2004), os métodos manuais basicamente diferem entre si quanto à quantidade de sangue total coletado, anticoagulante e proporção do mesmo, tipos de equipamentos utilizados para coleta e centrifugação do sangue, velocidade das centrifugações e adição de ativadores exógenos. Os princípios para realizar a técnica de forma adequada iniciam com a coleta obedecendo antisepsia, uso de agulhas com calibre 21g ou maior e aspiração lenta do sangue, a fim de manter a qualidade das plaquetas (LIPPI; SALVAGNO; MONTAGNANA, 2006).

O uso de tubo de vidro deve ser evitado, dando preferência a materiais de plástico, como tubos de polipropileno; a superfície de vidro pode dar início à cascata de coagulação ou diminuir a contagem plaquetária, por promover sua adesão à sílica (LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000). A escolha do anticoagulante deve priorizar aquele que cause menor interferência na funcionalidade plaquetária, preservando ao máximo sua integridade e morfologia durante o processo (DHURAT; SUKESH, 2014). Os anticoagulantes formulados com citrato se adequam aos requisitos supramencionados, sendo utilizados por grande parte dos pesquisadores (SUTTER; KANEPS; BERTONE, 2004; PICCIONE et al., 2010; TEXTOR, 2011). Dentre eles, o citrato de sódio a 3,8% contendo 24,4 mg/ml de íon citrato e pH de 7.8, atua como quelante de cálcio, reagindo com o cálcio livre do sangue e impedindo a coagulação (BELL; SPAIN; GOLDSMITH, 1990; CALLAN; SHOFER; CATAFALMO, 2009). A proporção deve ser ajustada de modo a permitir a ação anticoagulante sem diluir em excesso a amostra. Kingston et al. (2001) em estudo dos efeitos do citrato de sódio, heparina de baixo peso molecular e prostaglandina sobre a agregação, ligação de fibrinogênio e contagem plaquetária; observou que o aumento na concentração de citrato de sódio ocasiona em redução na resposta da agregação plaquetária. A proporção sangue total:anticoagulante de 9:1 geralmente é utilizada nas metodologias

de obtenção manual do PRP (TEXTOR, 2011), e sua homogeneização deve ser realizada de forma lenta, permitindo a interação dos componentes.

Após a coleta e homogeneização, o sangue é submetido à centrifugação, e fatores como tempo de duração, força e velocidade utilizados podem resultar em diferentes concentrações plaquetárias, bem como alterar a morfologia das plaquetas (NIKOLIDAKIS; JANSEN, 2008). O processo de centrifugação atua graças à diferença de gradiente e densidade dos componentes do sangue, dando origem a três camadas de composição distinta. Os eritrócitos, por serem mais densos, se concentram na camada mais profunda; os leucócitos e algumas plaquetas maiores localizam-se acima da camada eritrocitária, formando uma linha branca denominada zona de névoa; as plaquetas permanecem suspensas no plasma, logo acima da zona de névoa, e sua concentração decresce à medida em que se aproxima da superfície da camada plasmática (BOSWELL et al., 2012). Embora alguns protocolos sejam extrapolados daqueles realizados na medicina humana, deve ser levado em consideração que as células sanguíneas dos equinos requerem uma força relativa de centrifugação menor para atingir o gradiente de separação, quando comparada à dos humanos (KISSICH et al., 2012).

As velocidades e tempo empregados, bem como realizar uma ou mais centrifugações, apresentam bastante diversidade na literatura. Arora et al. (2016), em estudo quantificando plaquetas e fatores de crescimento de PRP preparados em diferente força centrífuga e tempo de duração, observaram que as maiores forças de centrifugação resultaram em maiores concentrações plaquetárias.

Ainda relacionado ao método de obtenção do PRP por tubo, quando trabalhando com dupla centrifugação, o produto final pode apresentar propriedades distintas dependendo da coleta do plasma sobrenadante obtido na primeira centrifugação. Para obter um PRP dito “puro” ou pobre em leucócitos, o plasma sobrenadante e a camada superficial acima da zona de névoa são transferidos para um novo tubo, e após a segunda centrifugação, aproximadamente 70% do sobrenadante é descartado, e a fração remanescente onde se encontra o botão plaquetário é ressuspensa. De outra forma, quando se deseja obter um PRP rico em leucócitos, toda a zona de névoa e conseqüentemente pequena porção da camada de eritrócitos é coletada, transferida a novo tubo e após a segunda centrifugação, obtém-se um PRP com alta concentração plaquetária, alta concentração leucocitária

e presença de alguns eritrócitos (DHURAT; SUKESH, 2014; LANSDOWN; FORTIER, 2016).

Não somente as etapas dos protocolos podem influenciar no produto final, como também fatores individuais e ambientais. Em estudo desenvolvido por Giraldo et al. (2013), os autores observaram que os fatores de crescimento apresentam variação na sua concentração de acordo com o tipo de concentrado plaquetário obtido, bem como diferença de acordo com a raça, gênero e idade dos animais. Em outro estudo, conduzido por Rinnovati et al. (2016) foi utilizado um grupo homogêneo de cavalos, com mesma raça, faixa etária próxima e peso médio semelhante; a fim de avaliar se variáveis ambientais poderiam influenciar a concentração plaquetária do PRP. Os autores concluíram que o horário de coleta, estado de hidratação dos animais e prévia administração de anti-inflamatórios não esteroidais também devem ser levados em consideração no momento de preparar o PRP.

Embora a concentração plaquetária final adequada não tenha sido estabelecida de modo geral, alguns autores sugerem que as plaquetas devem concentrar de duas a oito vezes em relação ao valor basal (FORTIER, 2011; MCILWRAITH, 2011), enquanto outros adotam os valores propostos por Marx (2001), alcançando uma concentração de três a cinco vezes em relação ao basal ou de ao menos 1×10^6 plaquetas/ μ L.

2.1.4 Ativação do PRP

Quando em seu estado fisiológico na circulação sanguínea, as plaquetas estão em sua forma inativa, podendo ser ativadas após estímulo de origem endógena ou exógena, capazes de promover alteração de sua forma e função (EVERTS, 2007). A alteração do formato da plaqueta é facilitada pelos filamentos de actina e miosina, que levam a uma reestruturação do citoesqueleto e desenvolvimentos de filopódios (Figura 3), os grânulos plaquetários são levados ao centro da célula onde se fundem e liberam seu conteúdo no ambiente extracelular (BOSWELL et al., 2012; TEXTOR, 2014). A exocitose e degranulação resultam em um aumento da área de superfície plaquetária, que passa a apresentar uma forma espiculada (BOSWELL et al., 2012).

Figura 3 - Estágios de alteração de forma apresentados pela plaqueta durante processo de ativação.

Fonte: (HARTWIG et al., 1999).

Legenda: Plaqueta em seu formato discoide, em repouso, à esquerda. Forma mais arredondada após início da ativação, com aumento de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, imagem central. Último estágio após ativação, com emissão de filopódios e lamelipódios, mediada por fosfoinosítídeos (PIs), à direita.

Para que ocorra a ativação, os agonistas ligam-se a receptores específicos presentes na membrana, o que ocasiona o aumento da concentração do íon cálcio intracitoplasmático, tanto pela liberação de estoque intracelular quanto pelo influxo pela membrana plasmática (VARGA-SAZBO; BRAUN; NIESWANDT, 2009). O aumento da concentração de cálcio disponível promove alterações estruturais e funcionais apresentadas pelas plaquetas, e suas projeções de membrana promovem uma reação de mudança de forma que permite às plaquetas interagirem umas com as outras, resultando na agregação plaquetária (RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010).

Os agonistas atuam principalmente em receptores associados à proteína G, e, após a interação agonista-receptor, ocorre a ativação das fosfolipases, sendo a fosfolipase C considerada a principal via de ativação plaquetária (VARGA-SAZBO; BRAUN; NIESWANDT, 2009) (Figura 4). Sua ativação resulta em dois mensageiros secundários: diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP_3). O IP_3 se liga a receptores de membrana do sistema tubular denso liberando estoque intracelular de cálcio, que estimula a atividade da fosfolipase A2 a liberar ácido araquidônico. Por sua vez, o

ácido araquidônico é convertido a prostaglandina H₂ (PGH₂) pela cicloxigenase 1 (COX1), sendo posteriormente metabolizado a tromboxano A₂, o qual é um potente ativador plaquetário. O DAG também contribui, mediando o influxo de cálcio (MURUGAPPAN; SHANKAR; KUNAPULI, 2004).

Há ainda a participação de várias glicoproteínas nas fases iniciais da ativação, alteração e agregação plaquetária. Dentre elas, a principal é a GPIIb/IIIa, que permanece inativa até sofrer alterações conformacionais devido ativação plaquetária, tornando-a capaz de se ligar ao fibrinogênio, fibronectina e fator de von Willebrand (FvW), embora sua sequência de ações ainda não tenha sido completamente elucidada, sua ligação ao FvW e fibrinogênio é associada à indução de agregação plaquetária (VARGA-SAZBO; BRAUN; NIESWANDT, 2009). Enquanto a GPIb estimula o aumento da concentração intracitoplasmática de cálcio e ativação da GPIIb-IIIa, potencializando a liberação dos grânulos alfa e lisossomais e consequente agregação e contração plaquetária (LANDI; MARQUES JÚNIOR, 2003; HARRISON, 2005).

Figura 4 - Ilustração esquemática dos respectivos receptores e agonistas plaquetários.

Fonte: (STEGNER e NIESWANDT, 2011).

Legenda: PAR-1 e PAR-4, receptor ativado por proteinases 1 e 4; G12/13, Gi, Gq e Gz, subunidades da proteína G; CLEC-2, receptor de lectina tipo C; TF, fator tecidual; TxA2, tromboxano A2; TP, receptor de TxA2; α_2 , receptor adrenérgico; P2Y1, P2Y12 e P2X1, receptores purinérgicos; LAT, proteína ligadora para ativação de células T; PI3K, AC, adenilato ciclase; fosfoinositideo-3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-bisfosfato; IP3, inositol-1,4,5-trisfosfato; DAG, diacilglicerol; Src, Syk, Fyn, Lyn, SFK, proteínas tirosina quinases.

Diversas substâncias de origem endógena ou exógena podem desencadear a ativação plaquetária, incluindo adenosina difosfato (ADP), trombina bovina ou autóloga, cloridrato de cálcio, gluconato de cálcio, tromboplastina, colágeno, fator ativador de plaqueta, serotonina, magnésio, tromboxano A2 e epinefrina (BOSWELL et al., 2012; TEXTOR; TABLIN, 2012). Dentre essas, a trombina bovina ou autóloga, e o cloreto de cálcio tem sido descritos como os mais utilizados na literatura (TEXTOR; TABLIN, 2012).

A trombina é considerada como o agonista fisiológico mais potente das plaquetas, atuando sobre os receptores de protease ativados (PAR) 1 e 4, os quais são relacionados à proteína G (ZHOU; SCHMAIER, 2005; RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010). Sua adição ao PRP causa uma rápida ativação plaquetária, com formação de coágulo entre 5 a 15 minutos, e liberação de grande parte dos fatores de crescimento (TEXTOR; TABLIN, 2012; CAVALLO et al., 2016), o que pode ocasionar em diminuição dos FC disponíveis caso não sejam utilizados logo após sua liberação (DELONG; RUSSELL; MAZZOCCA, 2012). A trombina bovina pode desencadear respostas indesejáveis, como hemorragia, trombose e reação imune; sendo recomendado dar preferência a trombina autóloga, associada ou não ao cloreto de cálcio (ORTEL; MERCER; THAMES, 2001; LANSDOWN; FORTIER, 2016).

O cloreto de cálcio age basicamente anulando o efeito promovido pelo anticoagulante, ou seja, sua adição desencadeia a recalcificação do PRP, levando à formação de coagulação espontânea em até 30 minutos, quando facilitado por uma superfície de vidro (TEXTOR; TABLIN, 2012). É considerado um ativador fraco e sua resposta é dose-dependente (WASTERLAIN; BRAUN; DRAGOO, 2012; LANSDOWN; FORTIER, 2016). Seu processo de ativação é mais lento e fisiológico, quando comparado à trombina exógena, ao promover uma rede de fibrina que contém as plaquetas, resultando na formação de pequenas quantidades de trombina endógena e permitindo uma liberação mais lenta dos fatores de crescimento por um período de até sete dias (FOSTER et al., 2009; TEXTOR; TABLIN, 2012). Contudo, devido a seu baixo pH de 6.3, sua administração pode causar dor significativa e uma

sensação de queimação no local (DELONG; RUSSELL; MAZZOCCA, 2012; LANSDOWN; FORTIER, 2016).

Em condições fisiológicas, quando há lesão do endotélio, as plaquetas circulantes são ativadas pela exposição ao colágeno subendotelial. Sua ação sobre as plaquetas ocorre principalmente devido interação com dois receptores: GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_2\beta_1$), que contribui para adesão plaquetária; e GPVI, responsável pela sinalização e ativação plaquetária, levando à formação de tromboxano A₂ (TXA₂) (WATSON; BERLANGA; BEST, 2000). O uso de colágeno tipo 1 como ativador do PRP tem demonstrado potencial semelhante ao da trombina na liberação de fatores de crescimento, porém apresentando um perfil de liberação mais constante ao longo do tempo (KINGSTON et al., 2001; FUFA et al., 2008).

A ativação por meios físicos também pode ser realizada. Submeter o PRP a ciclos de congelamento-descongelamento provoca o rompimento da membrana plaquetária com consequente liberação de seu conteúdo citoplasmático, embora não apresente uma liberação satisfatória de FCs (DUNKEL; BOLT; SMITH, 2011; TEXTOR; TABLIN, 2012). A centrifugação também tem sido apontada como um fator que contribui para a ativação plaquetária, sendo que quanto maior a força utilizada, maior o grau de ativação e auto-agregação plaquetária (BAUSSET et al., 2012; ARORA et al., 2016).

2.1.5 Avaliação da ativação plaquetária

A multifuncionalidade das plaquetas e seu envolvimento em processos patofisiológicos, motivou o principal interesse do estudo da sua atividade e funcionalidade na medicina humana, levando ao desenvolvimento de metodologias específicas para melhor compreensão da resposta plaquetária (KAMATH; BLANN; LIP, 2001; HARRISON, 2005). A utilização dessas técnicas no âmbito dos concentrados de plaquetas pode ser direcionada a observar se há uma melhor resposta na adição de um agonista em relação a outros, ou, se a força gravitacional utilizada nas centrifugações é capaz de diminuir a funcionalidade das plaquetas. Os testes comumente empregados para avaliar a capacidade de resposta das plaquetas do PRP são baseados na capacidade de agregação plaquetária, expressão de

glicoproteínas de membrana e alterações na ultraestrutura celular (SEGURA et al., 2006; ZANDIM et al., 2012).

A agregometria por transmissão de luz foi desenvolvida em meados de 1960, sendo descrita primeiramente por Born (1962). É considerada como “padrão ouro”, e permanece amplamente utilizada (GURNEY; LIP; BLANN, 2002; HARRISON, 2005; PAKALA; WAKSMAN, 2011). É baseada no princípio de que as plaquetas se agregam em resposta à adição de um agonista exógeno, sendo essa resposta detectada e quantificada pela quantidade de luz capaz de passar pela amostra. Agonistas de diferentes potências podem ser utilizados, como trombina, ADP, epinefrina e colágeno (KAMATH; BLANN; LIP, 2001). Para sua realização é necessário utilizar um aparelho denominado agregômetro óptico, dotado de fonte de luz, cuvetes com agitador, espectrofotômetro e conectado a um computador; o que possibilita acompanhar a curva de agregação. Na realização do teste, o PRP é classificado como a amostra mais opaca possível, enquanto o PPP a amostra com maior transparência possível, permitindo maior passagem de luz. À medida que o PRP responde ao agonista utilizado, as plaquetas que estavam inativas começam a ativar e promovem a agregação, permitindo que o feixe de luz atravesse a amostra com maior intensidade (PAKALA; WAKSMAN, 2011). A duração do teste geralmente é em torno de 5 minutos, podendo chegar a 10 em alguns casos, a velocidade e formação da curva deve ser acompanhada, alguns agonistas como ADP e epinefrina podem apresentar curva primária e secundária, enquanto outros, como o colágeno, podem ter uma resposta mais lenta (ZHOU; SCHMAIER, 2005).

A análise por citometria de fluxo é um método sensível e quantitativo para avaliar a função plaquetária. Apresenta como uma de suas vantagens a possibilidade de usar amostras de pouco volume, independente da contagem plaquetária (KAMATH; BLANN; LIP, 2001; PAKALA; WAKSMAN, 2011). Para sua realização, as amostras devem ser marcadas com um anticorpo monoclonal específico, ao passar pela câmara o fluoróforo é ativado pelo laser e emite uma luz que permite caracterizar os marcadores de interesse (MICHELSON et al., 2007). Permite detectar a ativação plaquetária por meio da mudança de forma das plaquetas ativadas, detecção de antígenos específicos da membrana de plaquetas ativadas, como as glicoproteínas P-selectina, GPIIb-IIIa; proteínas de ligação como o fibrinogênio ou expressão de superfície procoagulante (RUF; PATSCHEKE, 1995; LAZARUS et al., 1995). A citometria de fluxo é considerada mais sensível que a agregometria óptica quando se

pretende detectar agregados plaquetários menores ou distúrbios funcionais das plaquetas (JY et al., 1998), porém, de acordo com Landi e Marques Júnior (2003) alguns cuidados devem ser tomados quanto ao preparo das amostras e interpretação dos resultados, pois a expressão das glicoproteínas de membrana pode variar conforme o anticoagulante empregado, solução tampão utilizado no preparo, tempo de processamento da amostra, presença de fibrina ou FvW e natureza do anticorpo monoclonal.

Outra possibilidade é a observação da ultraestrutura plaquetária, sendo necessário o uso de microscópio de transmissão eletrônica. As amostras devem ser fixadas e preparadas previamente, de modo a permitir a visualização de alterações relacionadas à ativação plaquetária, como mudança de forma e degranulação dos alfa grânulos (SEGURA et al., 2006; ZANDIM et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o efeito terapêutico do PRP está relacionado principalmente à presença dos fatores de crescimento, não se restringindo à sua concentração plaquetária de forma isolada. Porém, a quantificação dos fatores de crescimento não tem sido uma prática utilizada frequentemente para classificação do PRP, assegurando-lhe qualidade; provavelmente devido ao custo ou à necessidade de conhecimentos específicos para sua realização, não sendo aplicável na rotina clínica.

Ao se considerar que os fatores de crescimento são derivados das plaquetas, um PRP com maiores contagens plaquetárias resultaria em um produto com maior concentração de fatores de crescimento. Porém, assim como a grande maioria das peculiaridades relacionadas ao PRP, ainda não há um consenso na literatura vigente. A possibilidade de estimar a concentração dos fatores de crescimento por meio da contagem plaquetária permitiria caracterizar os produtos finais de forma pouco onerosa, sendo de fácil realização.

Para que se obtenha um produto final com maior contagem plaquetária, sem aumento do número de leucócitos, ou seja, o almejado para tratamentos intra-articulares, há necessidade de mais de uma centrifugação na metodologia empregada.

Diante do exposto, nossa hipótese é que a partir de uma segunda centrifugação utilizada na metodologia de preparo do PRP em equinos, ocorra maior agregação plaquetária, e assim diminuição da concentração de fatores de crescimento liberados no momento de ativação do produto final no tecido alvo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da dupla centrifugação no preparo de PRP, por meio da comparação entre contagens plaquetárias, concentrações de fator de crescimento TGF- β 1, e grau de ativação das plaquetas por meio da porcentagem de agregação plaquetária.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificação do número de plaquetas e concentração plaquetária obtida após cada centrifugação.
2. Mensuração da agregação plaquetária provocada por cada centrifugação.
3. Quantificação da concentração de fator de crescimento TGF- β 1 em cada produto obtido durante a metodologia de preparo do PRP.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados doze equinos, machos, com intervalo de idade entre 3 a 5 anos, com o intuito de manter um grupo homogêneo, evitando possíveis variações individuais relacionadas a sexo ou faixa etária. Como critério de inclusão, os mesmos deveriam apresentar-se clinicamente sadios, sendo assim, foram avaliados por meio de exame físico completo, hemograma, fibrinogênio, perfil bioquímico, triglicérides e colesterol.

Os animais selecionados foram aqueles encaminhados ao atendimento no Serviço de Clínica Médica de Equinos ou Serviço de Cirurgia de Grandes Animais na FMVZ/USP, após autorização dos proprietários por meio de termo de consentimento, sendo incluídos aqueles destinados a acompanhamento ou portadores de afecções locomotoras localizadas, sem alteração do quadro clínico geral ou hematológico, bem como sem histórico de administração de medicamentos durante 15 dias prévios.

5.2 MÉTODO DE OBTENÇÃO DO PRP

Foram realizados dois protocolos distintos para obtenção do PRP, o primeiro com uma única centrifugação e o segundo com dupla centrifugação (Figura 5). O primeiro protocolo, rotineiramente utilizado no Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, sabidamente produz um PRP com menor concentração plaquetária, mas com ausência de agregação plaquetária. Este protocolo foi utilizado com o intuito de comparação com o de dupla centrifugação, o qual produz um PRP com maior concentração plaquetária, e é indicado para tratamentos articulares em equinos. Os PRPs e seus subprodutos foram comparados quanto ao grau de ativação plaquetária, contagem plaquetária e mensuração da concentração de fator de crescimento TGF- β 1.

Figura 5 - Esquema de realização dos protocolos para obtenção dos hemoderivados.

Fonte: (SEIDEL, 2016)

O primeiro protocolo, realizado segundo técnica descrita por Ottaiano et al. (2016), foi denominado PRP-0. Após prévia preparação asséptica da veia jugular externa, foram coletados 10 ml de sangue total de cada animal com uso de agulha 21G e seringa com capacidade de 10 ml, e seu volume transferido tubos falcon contendo citrato de sódio a 3,8% na proporção 1:10. As amostras foram homogeneizadas e em seguida centrifugadas a 141 x G por 12 min a temperatura ambiente, com aceleração e desaceleração máximas¹. O sobrenadante obtido, considerado PRP que não sofreu ativação das plaquetas durante processo de centrifugação (PRP-0), foi transferido a novo tubo falcon e utilizado no teste de agregação plaquetária.

O segundo protocolo realizado apresenta duas centrifugações, dando origem a três produtos distintos: plasma pobre em plaquetas oriundo da primeira centrifugação (PPP-1), plasma pobre em plaquetas oriundo da segunda centrifugação

¹ Eppendorf Centrifuge 5804 R

(PPP-2) e plasma rico em plaquetas final (PRP-1). Para obtenção do mesmo foram coletados 30 ml de sangue total de cada um dos animais por meio de punção da veia jugular externa com uso de vacutainer com agulha calibre 21G após prévia preparação asséptica da região. O sangue foi coletado e distribuído de forma homogênea em tubos com capacidade para 4,5 ml contendo anticoagulante citrato de sódio a 3,8%² de modo a obter a proporção adequada de sangue:anticoagulante. Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para três tubos falcon (Tubo 1, Tubo 2, Tubo 3), sem anticoagulante, com capacidade de 15 ml, permanecendo em repouso durante 25 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente centrifugadas a 300 x G, durante 5 minutos, em centrífuga com aceleração e desaceleração mínimas, seguido de novo repouso de 25 minutos à temperatura ambiente, com o intuito de separar as células vermelhas e brancas das plaquetas e plasma. O sobrenadante do Tubo 1 (PPP-1) foi coletado e reservado para utilização de avaliação plaquetária, contagem plaquetária e análise para quantificação de fator de crescimento TGF- β 1.

Respeitado o período de repouso, o plasma sobrenadante dos tubos 2 e 3 foi coletado por meio de pipeta com ponteira de 1ml e transferido para dois novos tubos falcon, identificados novamente como Tubo 2 e Tubo 3, respectivamente, sem anticoagulante, com 15 ml de capacidade, procedendo-se a nova centrifugação a 700 x G, durante 15 minutos, em centrífuga de aceleração e desaceleração mínimas, seguido de 45 minutos de repouso à temperatura ambiente com o intuito de obter o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP-2) e o Plasma Rico em Plaquetas (PRP-1). Respeitado o período de repouso, um volume aproximado de $\frac{3}{4}$ do plasma do sobrenadante do Tubo 2, referente ao PPP-2 e leucócitos, foi coletado e reservado para avaliação da ativação plaquetária, contagem plaquetária e análise para quantificação de fator de crescimento, sendo o volume restante do mesmo descartado. Da mesma forma, $\frac{3}{4}$ do plasma sobrenadante do Tubo 3, referente ao PPP-2, foi coletado e centrifugado novamente a 1000 x G durante 5 minutos, em centrífuga com aceleração e desaceleração máximas, resultando em plasma com volume mínimo de plaquetas, o qual foi utilizado como branco no experimento de agregação plaquetária (PPP-0). A fração remanescente referente ao PRP-1 foi homogeneizada e reservada para avaliação da ativação plaquetária, contagem plaquetária e análise para quantificação de fator de crescimento TGF- β 1.

² BD Vacutainer®

5.3 CONTAGEM PLAQUETÁRIA E LEUCOCITÁRIA

A contagem das plaquetas foi realizada nas frações PRP-0, PPP-1, PPP-2 e PRP-1; pelo método de contagem manual por meio de microscópio óptico binocular com aumento de 400x em câmara de Neubauer espelhada³. Cada amostra foi diluída em tubos eppendorf sendo 5µl da amostra e 0,5ml de líquido de Brecher com oxalato de amônia a 1%, com repouso de 1 minuto após homogeneização. A concentração plaquetária foi determinada dividindo o número de plaquetas na amostra pelo número de plaquetas no sangue total.

A contagem no sangue total foi realizada em contador automático⁴, com o intuito de obter o basal e demais parâmetros fornecidos pelo hemograma. A contagem de leucócitos foi realizada em contador automático nas frações PRP-0, PPP-1 e PRP-1.

5.4 AVALIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A adesão e agregação plaquetária foi acompanhada pelo método turbidimétrico de Born e Cross (BORN & CROSS, 1963) em aparelho agregômetro da Chrono-Log Corporation, modelo 700, por meio de software Agrolink8, no laboratório do Departamento de Bioquímica – EPM – UNIFESP.

Para realização do teste, 500 µl de PPP-0 foram adicionados a um cuvette e inserido na posição correspondente ao branco do aparelho. Da mesma forma, 498 µl das amostras destinadas a leitura foram adicionadas em cuvetes contendo barra de agitação magnética e inseridas em orifícios de repouso até alcançarem a temperatura de 37°C. Após posicionar as amostras nos orifícios de leitura, foi feita a identificação do teste no software, ajustadas as linhas de base para 0%, adicionados 2 µl do agonista colágeno tipo I⁵ nos cuvetes sob agitação e observada a curva de agregação

³ Neubauer – Hirschmann – EM - Techcolor

⁴ Contador hematológico automático modelo BS 2800 VET, Mindray

⁵ Chrono-Log Corporation

durante 6 minutos a 37°C. O procedimento foi repetido em todas as frações de PRP-0, PPP-1 e PRP-1. Nas amostras referentes ao PPP-2 não foi possível realizar o acompanhamento da curva de agregação devido apresentarem baixo número de plaquetas, sendo interpretadas pelo aparelho como semelhante ao branco, PPP-0, dessa forma, tais amostras foram subdivididas em duas frações, sendo uma submetida à adição do agonista sob agitação durante 6 minutos a 37°C sem leitura no agregômetro, PPP-2A, e a outra armazenada sem adição do agonista, PPP-2NA.

5.5 MENSURAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO TGF-B1

Os sobrenadantes obtidos após o teste de agregação plaquetária, bem como os sobrenadantes de PPP-2 com e sem adição de agonista, foram fracionados em microtubos com capacidade para 0,5 ml e armazenados em freezer a -80°C para posterior quantificação dos fatores de crescimento por meio de *kit* ELISA Human TGF-B1 Quantikine®, validado previamente para a espécie equina (TEXTOR et al., 2011; TEXTOR e TABLIN, 2012; TEXTOR et al., 2013).

Após descongelamento e homogeneização das amostras, realizou-se a ativação das mesmas seguindo instruções do *kit*. Para tanto, 20 µl das mesmas foram coletados e fracionados em eppendorf, seguido da adição de 10 µl de HCl, com homogeneização e repouso de 10 minutos, após o mesmo foram adicionados 10 µl de NaOH e 160 µl de diluente RD5-53.

Para preparação da placa foram adicionados 50 µl de diluente, seguidos de 50 µl de padrão, controle ou amostra, sendo a mesma coberta com filme e incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Após incubação, cada poço foi aspirado e lavado quatro vezes com solução *wash buffer*, sendo invertido sobre papel toalha ao final. Em seguida foram adicionados 100 µl de TGF-β1 em cada poço, coberto com filme e incubado novamente por 2 horas à temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi repetido como descrito anteriormente e após o mesmo foram adicionados 100 µl de solução substrato em cada poço, sendo coberto com papel alumínio e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o período de incubação, foram adicionados 100 µl de *stop solution* em cada poço, homogeneizado e lido a 450 nm em leitor de ELISA.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados pelo programa computacional Instat Graphpad 3 software. Os dados foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, sendo os dados paramétricos submetidos à análise de variância (ANOVA). Para determinação da correlação entre contagem plaquetária e quantificação de TGF- β 1, foi utilizado coeficiente de determinação e coeficiente de correlação de Pearson. O grau de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 CONTAGEM PLAQUETÁRIA E LEUCOCITÁRIA

A contagem das plaquetas foi realizada no sangue total para obtenção do basal, e nas frações obtidas após cada centrifugação. A contagem do número total de plaquetas evidenciou diferença estatística ($p < 0,05$) entre todas as frações analisadas (Tabela 1 e Gráfico 1). Quanto à contagem de leucócitos, a média basal apresentada pelos animais foi de $7,23 \times 10^3$ leucócitos/ μl , permanecendo abaixo dos valores basais em todas as amostras submetidas à leitura, sendo as médias respectivas de $0,23 \times 10^3$ leucócitos/ μl no PRP-0; $0,13 \times 10^3$ leucócitos/ μl no PPP-1 e $4,18 \times 10^3$ leucócitos/ μl no PRP-1.

Tabela 1 - Contagem do número total de plaquetas ($\times 10^3$ plaquetas/ μl) presentes no sangue total e após protocolos de obtenção do PRP – São Paulo – 2016

Animal	Basal	PRP-0	PPP-1	PPP-2	PRP-1
1	169	451	630	73	908
2	223	740	907	72	2112
3	192	516	630	53	1140
4	137	432	602	49	1230
5	143	456	580	32	1253
6	271	880	1282	95	2109
7	220	434	1084	93	1911
8	164	353	658	54	1002
9	177	480	839	43	1323
10	139	371	683	27	1198
11	165	383	561	33	1097
12	163	430	612	33	1164
Média	180 ^A	494 ^B	756 ^C	55 ^D	1371 ^E
DP	40,08	157,35	228,45	23,59	423,53

Legenda: Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Gráfico 1 - Contagem do número total de plaquetas ($\times 10^3$ plaquetas/ μ l) presentes no sangue total e após protocolos de obtenção do PRP – São Paulo – 2016

Legenda: Símbolos diferentes correspondem a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Para obtenção da concentração plaquetária, a contagem de cada fração foi dividida pelo número de plaquetas no sangue total de cada animal. As maiores concentrações foram obtidas no PRP-1, com cinco dos doze animais atingindo concentrações superiores a 8x, seguido do PPP-1 com concentração média de 4,2x, enquanto o PRP-0 obteve a menor média de concentração (Tabela 2). A concentração do PPP-2 não foi mensurada, pois o mesmo apresentou quantidade total de plaquetas menor que o basal.

Tabela 2 - Concentração plaquetária alcançada após protocolos de obtenção do PRP – São Paulo – 2016

Animal	PRP-0	PPP-1	PRP-1
1	2,66	3,72	5,37
2	3,31	4,06	9,47
3	2,68	3,28	5,93
4	3,15	4,39	8,97
5	3,18	4,05	8,76
6	3,24	4,73	7,78
7	1,97	4,92	8,68
8	2,15	4,01	6,1
9	2,71	4,74	7,47
10	2,66	4,91	8,61
11	2,32	3,4	6,64
12	2,63	3,75	7,14
Média	2,7 ^A	4,2 ^B	7,6 ^C
DP	0,43	0,57	1,35

Legenda: Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Todas as frações apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre si tanto referente ao número de plaquetas totais quanto à concentração plaquetária obtida.

7.2 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As três frações submetidas à avaliação da agregação plaquetária apresentaram diferença estatística significativa entre elas ($P < 0,05$) (Tabela 3 e Gráfico 2). O PRP-0 apresentou atividade de agregação mais homogênea e responsiva (Figura 6), seguido do PPP-1 (Figura 7); enquanto o PRP-1 apresentou menor resposta ao agonista e presença de agregados identificáveis por microscopia óptica (Figuras 8 e 9).

Tabela 3 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) da porcentagem (%) de agregação plaquetária após protocolos de obtenção do PRP, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016

Animal	PRP-0	PPP-1	PRP-1
1	117	114	94
2	113	83	22
3	100	97	20
4	117	60	69
5	118	102	69
6	107	101	32
7	110	98	72
8	110	90	84
9	112	90	86
10	119	109	85
11	105	62	83
12	107	85	85
Média	111,3^A	90,9^B	66,8^C
DP	5,88	16,69	26,58

Legenda: Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Gráfico 2 - Porcentagem de agregação plaquetária após protocolos de obtenção do PRP, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016

Legenda: Símbolos diferentes correspondem a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Figura 6 - Resposta plaquetária após adição de agonista em PRP-0, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016

Legenda: Traçados vermelho e verde correspondem a amostra de PRP-0 de um mesmo animal. Resposta rápida a adição do agonista, resultando em linha de decréscimo abrupta, ultrapassando 100% de agregação antes de 4:30.

Fonte: SEIDEL (2016)

Figura 7 - Resposta plaquetária após adição de agonista em PPP-1, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016

Legenda: Traçados vermelho e verde correspondem a amostra de PPP-1 de um mesmo animal. Resposta rápida mais lenta após adição do agonista, chegando ao tempo máximo estimado para monitoramento do teste e alcançando valores próximos a 100%. Traçados azul e preto irresponsivos por falta de amostra.

Fonte: SEIDEL (2016)

Figura 8 - Resposta plaquetária após adição de agonista em PRP-1, mensurada em agregômetro óptico – São Paulo – 2016

Legenda: Traçados azul e preto correspondem a amostra de PRP-1 de um mesmo animal. Resposta rápida mais lenta após adição do agonista, estabilizando após 5 minutos, não ultrapassando 70% de ativação das plaquetas.

Fonte: SEIDEL (2016)

Figura 9 - Enquadramento parcial de câmara de Neubauer contendo amostra de PRP-1 – São Paulo – 2016

Legenda: Presença de aglomerados plaquetários (círculos vermelhos) indicativos de agregação plaquetária em resposta à ativação precoce.

Fonte: SEIDEL (2016)

7.3 MENSURAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO TGF-B1

Os resultados obtidos demonstraram diferença estatística entre o grupo PRP-1 quando comparado aos grupos PRP-0 e PPP-1, bem como dos grupos PPP-2 ativado e não ativado ($P < 0,05$) (Tabela 4 e Gráfico 3). Os valores mais baixos foram observados no PPP-2 ativado, com média de 2942,4 pg/ml, seguido do PPP-2 não ativado, com 3102,4 pg/ml. O PRP-0 e PPP-1 apresentaram resultados similares, com 5537,3 pg/ml e 5539,4 pg/ml respectivamente. O grupo PRP-1 obteve as maiores concentrações, com média de 12407,78 pg/ml (Gráfico 4). Para obter a concentração final de TGF- β 1 obtida no volume total de cada produto gerado após centrifugação, a

concentração média do FC de cada fração foi multiplicada pelo volume final correspondente (Tabela 5).

Tabela 4 - Valores individuais, média e desvio padrão (DP) de TGF- β 1 (pg/ml) resultantes após protocolos de obtenção de PRP – São Paulo – 2016

Animal	PRP-0	PPP-1	PPP-2	PPP-2NA	PRP-1
1	4907	4547	2015	1455	10507
2	4727	7127	4020	3147	17233
3	5940	7140	3233	3960	15393
4	5133	3667	1593	2567	6307
5	5453	7067	2973	3453	15753
6	7460	5967	3713	4113	17547
7	6740	4813	3213	3513	10633
8	5733	4753	3120	2680	13013
9	5373	6000	3793	4533	13947
10	6093	4647	2667	2487	12113
11	4700	5620	2460	2287	6860
12	4187	5127	2507	3033	9587
Média	5537,3 ^A	5539,4 ^A	2942,4 ^B	3102,4 ^B	12407,78 ^C
DP	925,88	1144,95	729,19	870,09	3757,96

Legenda: Letras diferentes correspondem a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Gráfico 3 - Média e desvio padrão de TGF- β 1 (pg/ml) resultantes após protocolos de obtenção de PRP – São Paulo – 2016

Legenda: Símbolos diferentes correspondem a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Gráfico 4 - Box plot contendo mediana e concentração de TGF- β 1 (pg/ml) resultantes após protocolos de obtenção de PRP – São Paulo – 2016

Tabela 5 - Concentração de TGF- β 1 (pg) relacionada ao volume total (ml) obtido após cada centrifugação – São Paulo – 2016

Produto	Volume total (ml)	Média TGF- β 1 (pg/ml)	Média TGF- β 1 total
PRP-0	6,5	5537,3	35992,45
PPP-1	6,5	5539,4	36006,1
PPP-2	4,5	3102,4	13960,8
PRP-1	2	12407,78	24815,56

7.4 CORRELAÇÃO ENTRE CONTAGEM PLAQUETÁRIA E TGF-B1

O coeficiente de determinação encontrado foi de $R^2 = 0,74$; evidenciando quanto do resultado obtido na concentração de TGF- β 1 está relacionado à contagem plaquetária alcançada (Gráfico 5). Ao submeter o valor de R^2 para obtenção do coeficiente de correlação, o valor obtido é de $r = 0,86$; indicando forte correlação positiva entre a contagem plaquetária e de TGF- β 1.

A razão entre concentração de TGF- β 1 e contagem plaquetária foi calculada dividindo os valores do FC pela quantidade de plaquetas obtidas após cada centrifugação. Com exceção do PPP-2, cuja concentração de TGF- β 1 é reflexo do sobrenadante do PRP-1, os demais demonstram proporcionalmente a relação entre o FC e a contagem plaquetária (Tabela 5).

Gráfico 5 - Correlação entre concentração plaquetária e de TGFB-1 – São Paulo – 2016

Tabela 6 - Razão entre concentração de TGF- β 1 e contagem plaquetária obtida após cada centrifugação – São Paulo – 2016

Animal	PRP-0	PPP-1	PPP-2	PRP-1
1	10,9	7,2	27,6	11,6
2	6,4	7,9	55,8	8,2
3	11,5	11,3	61,0	13,5
4	11,9	6,1	32,5	5,1
5	12,0	12,2	92,9	12,6
6	8,5	4,7	39,1	8,3
7	15,5	4,4	34,6	5,6
8	16,2	7,2	57,8	13,0
9	11,2	7,2	88,2	10,5
10	16,4	6,8	98,8	10,1
11	12,3	10,0	74,5	6,3
12	9,7	8,4	76,0	8,2
Média	11,9	7,8	61,6	9,4
DP	3,0	2,4	24,7	2,9

8 DISCUSSÃO

A utilização dos hemoderivados vem se consolidando como prática cada vez mais comum na terapia das afecções locomotoras de equinos, devido principalmente à possibilidade de uso de tratamento não farmacológico, derivado do próprio animal e que não somente proporciona um menor tempo de cicatrização, mas também resulta em um tecido semelhante ao sadio.

O PRP apresenta, dentre suas características, uma ampla versatilidade quanto às suas formas de obtenção, seja por meio de *kits* comerciais ou método de tubos, dando origem a produtos com formulações distintas e consequente resposta terapêutica variada. Tal cenário evidencia a necessidade de um maior conhecimento acerca das especificações dos produtos escolhidos para uso, incluindo sua composição e funcionalidade celular. Dessa forma, no presente estudo buscamos mensurar se a concentração plaquetária obtida refletia em aumento de fator de crescimento TGF- β 1 disponível a despeito da ativação precoce das plaquetas.

A contagem plaquetária, realizada após cada centrifugação, permitiu observar que o protocolo de centrifugação única com menor velocidade concentrou em média 2,7x em relação ao basal, sendo superior aos valores encontrados por Vendruscolo et al. (2012) ao testar dez protocolos, e Rios et al. (2015), todos com centrifugação dupla; Hessel et al. (2015), na centrifugação manual dupla e em dois *kits* comerciais de centrifugação única, Angel® e APC®, porém ambos com maior velocidade; e Fontenot et al. (2012), com quatro protocolos de centrifugação única.

Ao avaliar o resultado da primeira centrifugação do protocolo de centrifugação dupla, obtivemos média de 4,2x em relação ao basal, atingindo a concentração mínima sugerida para que o produto possa ser considerado PRP (MARX, 2001). Além de ser superior às concentrações obtidas por meio de protocolos de dupla centrifugação comumente utilizados na medicina equina, conforme previamente relatado, tal centrifugação foi suficiente para superar a concentração atingida por Textor e Tablin (2013) ao utilizarem o dispositivo E-PET®, resultando em concentração plaquetária média de 3,2x; bem como a de Hessel et al. (2015), que utilizando o mesmo dispositivo alcançaram concentração de 3,8x.

O produto resultante da segunda centrifugação, denominado PRP-1, apresentou a maior concentração plaquetária em comparação aos demais,

corroborando com dados de Arguelles et al. (2006), que ao avaliarem diferentes frações de um protocolo de dupla centrifugação, observaram uma maior concentração plaquetária no produto derivado da segunda centrifugação, após descarte de aproximadamente 75% do sobrenadante. A concentração plaquetária alcançada após a segunda centrifugação em nosso estudo atingiu média de 7,6x, sendo que cinco dos doze animais utilizados obtiveram concentrações acima de 8x; ultrapassando as concentrações encontradas por Pereira et al. (2012) em estudo que avaliou a capacidade de concentração plaquetária de sete protocolos distintos, todos com dupla centrifugação, bem como a concentração obtida por Hessel et al. (2015), utilizando *kit* comercial GPS®. Contudo, permaneceu inferior aos valores encontrados por Textor e Tablin (2011b), alcançando média de 8x com dupla centrifugação; e por Sutter, Kaneps e Bertone (2004), pelos métodos de aférese seguida de filtração e *buffy coat*, com 13 e 9x, respectivamente; permanecendo superior ao método por aférese, com média de 5x.

Com a dosagem de leucócitos foi possível constatar que não houve enriquecimento leucocitário em nenhuma das frações avaliadas, permanecendo a todo momento com valores inferiores aos apresentados pela média do sangue total. As frações resultantes de centrifugação única apresentaram as menores quantidades de leucócitos, diferindo dos resultados obtidos por Fontenot et al. (2012), que ao avaliarem protocolos de centrifugação única com velocidade elevada, obtiveram produtos ricos em leucócitos; bem como os de Argüelles et al. (2006), que apesar de produzirem um PRP com concentração leucocitária abaixo da basal, resultante de um protocolo com centrifugação única com baixa velocidade e curto tempo, apresentaram valores superiores aos atingidos no presente trabalho.

A quantidade de leucócitos presente no PRP-1 mostra-se superior à média obtida por Vendruscolo et al. (2012) em avaliação de 10 protocolos de centrifugação dupla, todos com velocidades inferiores às utilizadas no presente estudo; sendo também superior à média obtida por Pereira et al. (2012) em avaliação de 7 protocolos, dentre os quais, apenas um resultou em concentração leucocitária levemente superior à obtida em nosso experimento. A profundidade do local de coleta do PRP se constitui como um dos fatores que pode influenciar na concentração leucocitária final, ao se considerar que plaquetas maiores, devido à sua densidade, se localizam mais próximo da zona de névoa, fazendo com que o PRP coletado logo acima dessa área possa apresentar uma quantidade mais significativa de leucócitos.

Apesar dos leucócitos apresentarem um efeito antimicrobiano devido à mieloperoxidase presente em monócitos e neutrófilos (CIESLIK-BIELECKA et al., 2009), bem como atuarem no debridamento de tecidos lesionados e influenciarem na liberação de FCs (BOSWELL et al., 2012); seu enriquecimento no PRP destinado ao uso intra-articular não é um fator desejável, sendo relacionado a um aumento do catabolismo e diminuição da síntese de matriz extracelular nos tecidos, e apresentando ainda correlação positiva com TNF α e IL-1 (MCCARREL; FORTIER, 2009).

A mensuração da agregação plaquetária, acompanhada por meio de agregômetro óptico, permitiu estimar quanto das plaquetas mostravam-se responsivas após adição de agonista exógeno, inferindo que a porcentagem não responsiva já havia sido ativada previamente, provavelmente por meio de estímulo físico durante a centrifugação. O primeiro protocolo, de única centrifugação, foi utilizado como parâmetro de método que não promove agregação precoce das plaquetas durante a centrifugação, conseqüentemente o resultado apresentado pelo mesmo foi de média superior a 110%, inferindo que todas as plaquetas presentes na amostra estavam em seu estado inativo até o momento de adição do agonista. O fato de sua resposta ultrapassar o limite de 100% está relacionado à funcionalidade das plaquetas presentes, que, por se apresentarem em forma inativa e com maior capacidade de resposta, estão mais sensíveis ao agonista, aglomerando-se com maior força e velocidade, o que permite que uma maior quantidade de feixe de luz atravesse a amostra, resultando em uma resposta exacerbada; bem como deve-se levar em consideração que embora o plasma utilizado como branco para leitura no agregômetro seja pobre em plaquetas, ainda há a presença de uma ínfima quantidade das mesmas, contribuindo para que ocorra um pequeno grau de turbidez.

O sobrenadante obtido após a primeira centrifugação do protocolo duplo já apresenta certa porcentagem de plaquetas agregadas antes da adição do agonista, apresentando uma média de 90,9% de agregação plaquetária durante a realização do teste, portanto, em torno de 10% das plaquetas presentes na amostra foram ativadas previamente. Porém a menor resposta plaquetária no teste de agregação surge com o PRP resultante da segunda centrifugação, do qual apenas 66,8% das plaquetas respondem em média após a adição do agonista. Na medicina equina alega-se que o PRP é, na grande maioria dos casos, utilizado em sua forma inativa, baseando-se no pressuposto que ocorrerá a ativação plaquetária ao entrar em contato com o tecido

alvo (LOPEZ-VIDRIERO et al., 2010); porém tal afirmação não considera a possível ativação sofrida pelas plaquetas durante o preparo.

Na literatura vigente há poucos trabalhos que utilizem métodos de avaliar a ativação plaquetária no PRP equino. O presente estudo constatou que o aumento da força e tempo de centrifugação refletem em maior porcentagem de ativação das plaquetas, corroborando com o observado por Bausset et al. (2012) e Arora et al. (2016). A influência da centrifugação sobre a quantidade e qualidade das plaquetas foi avaliado por Bausset et al. (2012) em estudo com PRP humano. Para mensurar a ativação plaquetária, os autores utilizaram citometria de fluxo, agregometria e análise de ultraestrutura morfológica. O PRP foi obtido por meio de dupla centrifugação, com diferentes forças na segunda centrifugação, sendo ativado com ADP. A citometria de fluxo evidenciou que valores superiores a 250G já apresentam menor expressão de P-Selectina após adição de ADP, porém não há diferença quando se usa 400 ou 1000G. Resposta semelhante foi encontrada no teste de agregometria, demonstrando que velocidades acima de 400G já apresentam maior impacto na atividade de agregação, e quando a segunda centrifugação foi realizada a 1000G induzia autoagregação espontânea. A análise da ultraestrutura permitiu observar que mesmo acima de 250G algumas plaquetas já apresentam características morfológicas de ativação, e que com o aumento da velocidade, há um aumento significativo das plaquetas ativadas. Tais resultados estão de acordo com o observado no presente estudo, em que maior agregação plaquetária foi observada com o aumento da força de centrifugação.

Contudo, Arguelles et al. (2006), em estudo no qual foram avaliados parâmetros indicadores de ativação plaquetária por meio de citometria de fluxo em um protocolo de dupla centrifugação, aferiram quatro frações distintas, coletando dois sobrenadantes de diferentes profundidades dos produtos obtidos após cada centrifugação, e, diferentemente do resultado obtido no presente estudo, os maiores valores relativos à ativação plaquetária foram observados após a primeira centrifugação, sendo que os produtos da segunda centrifugação apresentaram menor ativação plaquetária. Os autores acreditam que tal resposta possa ser devido ao uso do citrato de sódio, o qual poderia promover um efeito reverso parcial no processo de agregação plaquetária. Uma agregação reversível pode ser induzida por baixas concentrações de estímulo na presença de cálcio ou magnésio extracelular, enquanto altas concentrações promovem uma reação irreversível (HAMBERG et al., 1974), e o

citrato mesmo quando adicionado a uma amostra durante processo de agregação com ADP pode causar uma reversão parcial do processo de agregação (KINGSTON et al., 2001).

De fato, tanto a escolha do anticoagulante quanto do ativador exógeno pode influir no perfil de ativação plaquetária e consequente liberação dos fatores de crescimento. Textor e Tablin (2012) compararam diferentes metodologias de ativação plaquetária com uso de trombina bovina e autóloga em concentrações distintas, cloreto de cálcio e sequência de congelamento e descongelamento. A trombina autóloga apresentou menor potência de ativação plaquetária ao ser comparada com a trombina bovina em agregômetro óptico. Apesar da ativação por cloreto de cálcio não ter sido acompanhada em agregômetro devido a formação de gel, os autores consideram esse agonista como mais forte em relação aos outros métodos de ativação. Possivelmente essa decisão foi baseada no perfil de liberação de PDGF-BB, que atingiu valores maiores e estatisticamente significativos quando comparado ao demais; todavia, ao observar o perfil de liberação de TGF- β 1 não houve diferença estatística entre as metodologias analisadas, sendo que o congelamento seguido de descongelamento obteve maior quantidade do FC.

A escolha do colágeno como agonista propiciou resultados mais consistentes de agregação plaquetária no presente estudo. O uso desse ativador exógeno se caracteriza não somente por ser semelhante ao que supostamente ocorre *in vivo*, mas também por induzir a agregação irreversível das plaquetas, enquanto a resposta obtida por outros ativadores tende a variar, podendo inclusive resultar em uma agregação reversível (SEGURA et al., 2005).

Essa possibilidade foi constatada por Kingston et al. (2001), cujo estudo buscou avaliar os efeitos do citrato de sódio, heparina de baixo peso molecular e prostaglandina na agregação, ligação de fibrinogênio e contagem de plaquetas equinas; utilizando como ativadores exógenos ADP e colágeno. A adição de PGE1 foi eficiente em inibir a resposta de agregação plaquetária de modo concentração-dependente quando utilizada antes dos agonistas. Porém, quando a mesma dose de PGE1 foi acrescentada em até 4 minutos após a adição dos agonistas, a amostra ativada com ADP apresentou reversão na agregação, enquanto a amostra com colágeno permaneceu com sua agregação inalterada. Textor, Norris e Tablin (2011) também fizeram uso do colágeno como ativador exógeno, utilizando diferentes concentrações do agonista, sendo de 10 e 20 μ g/ml, e observaram que para a mesma

concentração plaquetária, a maior concentração de colágeno ocasionou em uma maior liberação de TGF- β 1, contudo esse aumento não foi significativo.

A mensuração dos FCs presentes no PRP, embora de extrema importância para estimar se há presença de quantidade que resulte em resposta terapêutica, não é rotineiramente realizado na prática clínica, sendo ausente mesmo em alguns estudos que objetivam analisar o potencial terapêutico do PRP. Essa circunstância pode ser devido aos custos elevados dos *kits*, bem como a falta de praticidade em seu uso para poucas amostras. A necessidade de utilizar *kits* específicos para humanos também se enquadra nessa realidade, sendo preciso validar os *kits* utilizados para se obter um resultado confiável, como ocorrido no estudo em questão, em que foi utilizado *kit* previamente validado para espécie equina (TEXTOR et al., 2011; TEXTOR e TABLIN, 2012; TEXTOR et al., 2013). Ressalta-se que apesar da possibilidade de ocorrer a forma latente do FC avaliado, o *kit* utilizado realiza leitura apenas do TGF- β 1 ativado, sendo que a ativação ocorre durante a execução do *kit*, tornando o FC detectável pelo mesmo.

A quantificação de TGF- β 1 obtida tanto após o protocolo de centrifugação única quanto após a primeira centrifugação do segundo protocolo apresentaram valores próximos, mesmo com a diferença de contagem plaquetária entre as médias das amostras. Isso pode ter ocorrido devido a prévia ativação sofrida pelas plaquetas na centrifugação utilizando força maior, que liberaram parte de seus FCs no sobrenadante, o qual possuindo maior volume leva a uma diluição desses componentes; somado a uma resposta mais intensa das plaquetas presentes na amostra não ativada durante a centrifugação, por apresentarem maior integridade e consequente funcionalidade em resposta ao agonista; o que explicaria também o comportamento mais homogêneo apresentado por suas amostras.

Os valores obtidos em ambas as amostras submetidas a uma centrifugação mostraram-se superiores aos alcançados por Textor, Norris e Tablin (2011), com PRP produzido utilizando *kit* comercial, chegando a 3.707 pg/ml; embora sua contagem plaquetária seja superior, com 951×10^3 plaquetas/ μ l, enquanto nossas médias foram de 494 e 756×10^3 plaquetas/ μ l, para o PRP-0 e PPP-1 respectivamente. Ao comparar com outro estudo, quando a trombina autóloga foi utilizada para ativar um PRP oriundo de dupla centrifugação, no qual a contagem plaquetária foi corrigida para 770×10^3 plaquetas/ μ l, a quantificação de TGF- β 1 foi ainda menor, alcançando 3.263 pg/ml (TEXTOR; TABLIN, 2012).

No estudo supracitado, ao utilizar outros agonistas, os autores obtiveram diferentes mensurações do FC, sendo de 9.528 pg/ml quando o agonista foi trombina bovina; 8.808 pg/ml com a utilização de cloreto de cálcio a 10% e 10.928 pg/ml ao submeter as amostras a uma sequência de congelamento e descongelamento (TEXTOR; TABLIN, 2012). Tais valores mostram-se inferiores à média obtida no presente estudo quando se quantificou o PRP-1, resultante da segunda centrifugação, o qual atingiu contagem plaquetária de 1.371×10^3 plaquetas/ μ l e TGF- β 1 de 12.407,78 pg/ml.

Por outro lado, em experimento realizado por Arguelles et al. (2006), embora as contagens plaquetárias finais tenham sido baixas, chegando no máximo a 272×10^3 plaquetas/ μ l, a quantificação de TGF- β 1 atingiu 10.500 pg/ml no protocolo com dupla centrifugação; chegando a 10.300 pg/ml resultante do protocolo de centrifugação única, com contagem plaquetária final de 228×10^3 plaquetas/ μ l; ambas ativadas com cloreto de cálcio a 10%. Para os autores, não houve diferença nos resultados apresentados entre os produtos da primeira e segunda centrifugação, considerando ainda que o método de simples centrifugação mostrou maior eficiência tanto na concentração plaquetária quanto na do FC mensurado.

Nossa média de TGF- β 1 obtida no PRP1 foi semelhante à encontrada por Pereira et al. (2012), embora os autores não tenham detalhado a contagem plaquetária final, as concentrações alcançadas na execução de sete protocolos de dupla centrifugação variaram de 4,1 a 5,4x em relação ao basal, e em sua maioria apresentaram quantificação de TGF- β 1 inferior a 12.397 pg/ml. Curiosamente, no mesmo trabalho, o maior valor obtido na mensuração do FC, e o único que ultrapassou a média do presente estudo, foi de 14.053 pg/ml, sendo relacionado a uma concentração de 4,1x, ao testar o protocolo utilizado por Arguelles et al. (2006). Nosso resultado foi inferior aos obtidos por Sutter, Kaneps e Bertone (2004), que atingiram altas contagens plaquetárias e de FC com método de aférese seguido de filtração, com 2.172×10^3 plaquetas/ μ l, e 57.900 pg/ml de TGF- β 1. No mesmo trabalho, ao utilizar somente a aférese, foi alcançada contagem plaquetária de 855×10^3 plaquetas/ μ l e 23.600 pg/ml de TGF- β 1.

Ao realizarmos a leitura das amostras de PPP-2, ativadas e não ativadas, foi possível constatar que mesmo com a baixíssima contagem plaquetária, já que se refere ao sobrenadante da segunda centrifugação, chegando a no máximo 55×10^3 plaquetas/ μ l, havia quantidade considerável de TGF- β 1, com média de 2.942 e 3.102

pg/ml para as amostras ativadas e não ativadas, respectivamente. Esses valores, apesar de superiores aos encontrados por Textor, Norris e Tablin (2012) em PRP de dupla centrifugação ativado com colágeno; Vendruscolo et al. (2012) sem uso de ativador exógeno e com baixa concentração plaquetária; e Hessel et al. (2014) tanto com PRP oriundo de *kits* comerciais quanto de dupla centrifugação. Esse resultado vai de acordo com o de que não somente parte das plaquetas sofreram ativação durante a segunda centrifugação, mas também que parte dos fatores de crescimento liberados permanecem dispersos no sobrenadante, o qual geralmente é desprezado para obtenção do PRP.

A preocupação em buscar identificar o momento de ativação plaquetária durante a obtenção do PRP não se baseia somente em utilizar o produto em sua forma inativa, até porque para que haja a liberação dos FCs é preciso que as plaquetas sofram ativação. Porém faz-se necessário saber se o produto final obtido apresenta plena função das plaquetas concentradas em sua totalidade, bem como, caso já tenham sido ativadas no decorrer do processo de obtenção, qual seria o tempo hábil para sua utilização sem danos na resposta terapêutica do mesmo. Os FCs em geral apresentam uma meia-vida curta, sendo de minutos a horas, e caso não sejam utilizados imediatamente após a sua liberação podem ser degradados antes de atingirem os receptores do tecido alvo (HARRISON et al., 2011); logo, uma rápida ativação ou ativação precoce quando não seguida de utilização do produto leva a uma diminuição dos FCs disponíveis ao longo do tempo (DELONG; RUSSELL; MAZZOCCA, 2012).

Apesar de ter sido constatado a ativação precoce das plaquetas durante o processo de obtenção do PRP, sendo essa ativação mais significativa após a segunda centrifugação, não houve prejuízo na quantificação de TGF- β 1 realizada no produto final, PRP-1, mas deve-se ressaltar que após a obtenção e ativação total, as amostras foram armazenadas e congeladas a -80°C em ato contínuo, o que contribuiu para manter os níveis do FC. Em estudo realizado por Hauschild et al. (2016) em que os autores buscaram avaliar a estabilidade de dois PRPs obtidos por meio de *kits* comerciais, ACP® e E-PET, quando mantidos em temperatura ambiente. Dois FCs, PDGF e TGF- β 1, foram quantificados ao longo do tempo, nos momentos 0, 1, 5 e 30 minutos, 1, 2 e 6h. Os autores observaram que os FCs não apresentaram decréscimo de sua concentração, mantendo-se estáveis durante todo o tempo avaliado; e dessa

forma sugerem que o PRP obtido por essas metodologias, mantém o nível inicial dos FCs por até 6 horas após a sua produção.

Embora a quantidade ideal de plaquetas no PRP não tenha sido estabelecida, Mazzoca et al. (2012) realizou um experimento *in vitro* em que PRPs com diferentes contagens plaquetárias e leucocitárias foram aplicados em culturas de osteoblastos, miócitos e tenócitos de humanos. As melhores respostas observadas em relação à proliferação celular foram obtidas com PRP de baixa concentração plaquetária e leucocitária, evidenciando que mesmo com contagens em torno de 380.000 plaquetas/ μ l já há uma resposta tecidual.

Em relação à quantidade necessária de TGF- β 1 para obter resposta anabólica em ambiente articular, estudos *in vivo* e *in vitro* têm trabalhado com valores entre 10-200 ng/ml (BRANDL et al., 2010; van BEUNINGEN et al., 1998), sendo possível alcançar o limite inferior com o PRP-1, oriundo da nossa segunda centrifugação. Os efeitos do TGF- β 1 sobre condrócitos de equinos foram demonstrados na década de 90 em estudo *in vitro* com cartilagens articulares provenientes de potros (Fortier et al., 1997). Os autores observaram efeitos benéficos do TGF- β 1 sobre os condrócitos quando utilizados com concentrações de 5-10 ng/ml em até sete dias de cultivo, passando a concentrações de 1 ng/ml a partir do 14^a dia de cultivo.

Com o objetivo de avaliar clinicamente os efeitos do PRP em cavalos acometidos por osteoartrite, Carmona et al. (2007) utilizaram quatro animais de diferentes modalidades esportivas e com diferentes articulações acometidas, e realizaram três aplicações intra-articulares de PRP com intervalo de duas semanas entre as mesmas. O PRP utilizado, embora com baixa concentração plaquetária (média de 250×10^6), apresentava concentração média de TGF- β 1 de 12.515 pg/ml. Os animais apresentaram remissão total da claudicação e do grau de efusão, mantendo a clínica da avaliação final por até 8 meses.

A eficiência em concentrar TGF- β 1 foi alcançada nos produtos obtidos, sendo possível observar que mesmo quando baixas velocidades foram utilizadas, levando a uma menor contagem plaquetária, as plaquetas apresentaram uma liberação satisfatória do FC. Ao considerarmos o volume total do concentrado plaquetário resultante de cada centrifugação, é possível observar diferenças nos valores de TGF- β 1, sendo que quando for favorável a utilização de um maior volume do produto, a maior concentração do FC está presente no PRP-0 e PPP-1, enquanto que ao ser necessário fazer uso de volumes menores, indica-se o uso do PRP-1.

No presente trabalho é evidente a correlação positiva entre a concentração plaquetária e a de TGF- β 1, com exceção dos sobrenadantes obtidos após a segunda centrifugação, nos quais há a presença de FC derivado da ativação das plaquetas de outra fração. Esse resultado está de acordo com o postulado por Sutter, Kaneps e Bertone (2004), McCarrel e Fortier (2009), Sundman, Cole e Fortier (2011) e McLellan e Plevin (2014). Porém, respostas distintas foram obtidas por Arguelles et al. (2006), Vendruscolo et al. (2012) e Pereira et al. (2012), o que evidencia a necessidade do controle de qualidade, ou seja, caracterização e classificação do PRP escolhido para ser utilizado no tratamento das diferentes enfermidades.

9 CONCLUSÕES

O protocolo de dupla centrifugação estudado produz PRP com contagem plaquetária e concentração de TGF- β 1 maiores do que protocolo de centrifugação única, porém com concomitante aumento da agregação plaquetária.

A mensuração da agregação plaquetária comprovou prévia ativação de parte das plaquetas durante o processo de preparo, sendo essa ativação maior na medida em que houve aumento da força e tempo de centrifugação, bem como número de centrifugações. Contudo, ao quantificar o FC, nota-se que mesmo com a ativação prévia das plaquetas, não houve prejuízo da quantidade contida no produto, sendo possível obter uma correlação positiva entre a concentração de plaquetas e de TGF- β 1 presente no produto obtido.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, L. D.; RAUB, R. H.; GRIEGER, D. M.; MORRIS, J.; WEBER, J. D. Transforming growth factor-81 concentrations in equine synovial fluid. **European Heart Journal**, v. 18, n. 2, p. 109–113, 1998.

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

ANITUA, E.; PRADO, R.; SANCHEZ, M.; ORIVE, G. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 22, n. 1, p. 25–32, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.oto.2012.01.004>>.

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

ARORA, S.; DODA, V.; KOTWAL, U.; DOGRA, M. Quantification of platelets and platelet derived growth factors from platelet-rich-plasma (PRP) prepared at different centrifugal force (g) and time. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 54, n. 1, p. 103–110, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2016.01.028>>.

ASFAHA, S.; CENAC, 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. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 176-85, 2007.

ASSOIAN, R. K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C. A.; MILLER, D. M.; SPORN, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 11, p. 7155–7160, 1983.

BAKKER, A. C.; VAN DE LOO, F. A.; VAN BEUNINGEN, H. M.; SIME, P.; VAN LENT, P. L.; VAN DER KRAAN, P. M.; RICHARDS, C. D.; VAN DEN BERG, W. B. Overexpression of active TGF- β 1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 9, n. 2, p. 128-36, 2001.

BANKS, R. E.; FORBES, M. A.; KINSEY, S. E.; STANLEY, A.; INGHAM, E.; WALTERS, C.; SELBY, P. J. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 6, p. 956–964, 1998.

BAUGE, C.; DUVAL, E.; OLLITRAULT, D.; GIRARD, N.; LECLERCQ, S.; GALERA, P.; BOUMÉDIENE, K. Type II TGF β receptor modulates chondrocyte phenotype. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 4, p. 1105–16, 2013. doi: 10.1007/s11357-012-9433-7 PMID: 22653295

BAUGE, C.; LEGENDRE, F.; LECLERCQ, S.; ELISSALDE, J. M.; PUJOL, J. P.; GALERA, P.; BOUMÉDIENE, K. Interleukin-1 β impairment of transforming growth factor β 1 signaling by down-regulation of transforming growth factor β receptor type II and up-regulation of Smad7 in human articular chondrocytes. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 9, p. 3020-32, 2007.

BAUSSET, O.; GIRAUDO, L.; VERAN, J.; MAGALON, J.; COUDREUSE, J. M.; MAGALON, G.; DUBOIS, C.; SERRATRICE, N.; DIGNAT-GEORGE, F.; SABATIER, F. Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product. **BioResearch open access**, v. 1, n. 3, p. 115–23, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3559222&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BEARER, E.L. Structure-function of the platelet cytoskeleton. In: QUINN, M.; FITZGERALD, D. **Platelet function: assessment, diagnosis, and treatment**. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 2005. Cap. 4, p. 71-114.

BECK, L. S.; DE GUZMAN, L.; LEE, W. P.; YVETTE, X. U.; SIEGEL, M. W.;

AMENTO, E. P. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age or glucocorticoid- impaired wound healing. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 2841-9, 1993.

BELL, D. N.; SPAIN, S.; GOLDSMITH, H. L. Extracellular-free Ca^{++} accounts for the sex difference in the aggregation of human platelets in citrated platelet-rich plasma. **Thrombosis Research Journal**, v. 58, p. 47–60, 1990.

BLANEY DAVIDSON, E. N.; VAN DER KRAAN, P. M.; VAN DEN BERG, W. B. TGF-beta 1 and Osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, p. 597-604, 2007.

BLANEY DAVIDSON, E. N.; SCHARSTUHL, A.; VITTERS, E. L.; VAN DER KRAAN, P. M.; VAN DEN BERG, W. B. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 6, p. R1338–R1347, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1186/ar1833>>.

BLANEY DAVIDSON, E. N.; VAN DER KRAAN, P. M.; VAN DEN BERG, W. B. TGF-beta and osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 597–604, 2007.

BORN, G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nauchni Trudove na Visshia Meditsinski Institut, Sofiia**, v. 194, p. 927-929, 1962.

BLAKYTNY, R.; LUDLOW, A.; MARTIN, G. E.; IRELAND, G.; LUND, L. R.; FERGUSON, M. W.; BRUNNER, G. Latent TGF-beta1 activation by platelets. **Journal of Cellular Physiology**, v. 199, n. 1, p. 67–76, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1002/jcp.10454>>.

BORN, G. V.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **The Journal of Physiology**, v. 168, p. 178-195, 1963.

BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T. M.; DE 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, v. 28, n. 2, 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. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 28, n. 3, p. 429–439, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2011.10.018>>.

BRANDL, A; ANGELE, P; ROLL, C.; PRANTL, L.; KUJAT, R.; KINNER, B. Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, p. 354-60, 2010.

BROSSI, P. M.; MOREIRA, J. J.; MACHADO, T. S. L.; BACCARIN, R. Y. A. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 98, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4449579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BRUNNER, G.; NGUYEN, H.; GABRILOVE, J.; RIFKIN, D. B.; WILSON, E. L. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. **Blood**, v. 81, n. 3, p. 631–638, 1993.

CALLAN, M. B.; SHOFRER, F. S.; CATALFAMO, J. L. Effects of anticoagulant on pH, ionized calcium concentration, and agonist-induced platelet aggregation in canine platelet-rich plasma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 472-7, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.70.4.472>>.

CALS, F. L.; HELLINGMAN, C. A.; KOEVOET, W.; BAATENBURG DE JONG, R. J.; VAN OSCH, G. J. Effects of transforming growth factor-beta subtypes on in vitro cartilage production and mineralization of human bone marrow stromal-derived mesenchymal stem cells. **J Tissue Eng Regen Med**. v. 6, n. 1, p. 68–76, 2012. doi: 10.1002/term.399 PMID: 21305699

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous Platelet Concentrates as an Adjunctive Treatment for Chronic Laminitis in a Mare with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 191–195, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.068>>.

CARMONA, J. U.; ARGU, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M.; ACVS, D. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis : A Preliminary Pilot Clinical Study. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 27, n. 4, p. 167–170, 2007.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders; 2003: p. 572–591.

CAVALLO, C.; ROFFI, A.; GRIGOLO, B.; MARIANI, E.; PRATELLI, L.; MERLI, G.; KON, E.; MARCACCI, M.; FILARDO, G. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

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.

CIFERRI, S.; EMILIANI, C.; GUGLIELMINI, G.; ORLACCHIO, A.; NENCI, G.G.; GRESELE, P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. **Thromb Haemost**, v. 83, p. 157-164, 2000.

CUGAT, R.; CUSCÓ, X.; SEIJAS, R.; ÁLVAREZ, P.; STEINBACHER, G.; ARES, O.; WANG-SAEGUSA, A.; GARCÍA-BALLETBÓ, M. Biologic enhancement of cartilage repair: The role of platelet-rich plasma and other commercially available growth factors. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 31, n. 4, p. 777–783, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2014.11.031>>.

DELONG, J. M.; RUSSELL, R. P.; MAZZOCCA, A. D. Platelet-rich plasma: The PAW

classification system. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 28, n. 7, p. 998–1009, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2012.04.148>>.

DENKER, A. E.; NICOLL, S. B.; TUAN, R. S. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. **Differ Res Biol Divers**, v. 59, p. 25–34, 1995.

DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. **Journal of cutaneous and aesthetic surgery**, v. 7, n. 4, p. 189–97, 2014. Disponível em: <http://encore.fama.us.es/iii/encore/plus/C__SEffectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers__Orightresult__X0?lang=spi&link=http://0-search.ebscohost.com.fama.us.es/login.aspx?direct%25>.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; ANDIA, I.; ZUMSTEIN, M. A.; ZHANG, C.-Q.; PINTO, N. R.; BIELECKI, T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 4, n. 1, p. 3–9, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4049647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DOYLE, J. J.; GERBER, E. E.; DIETZ, H. C. Matrix-dependent perturbation of TGFbeta signaling and disease. **FEBS Letters**, v. 586, n. 14, p. 2003–2015, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.027>>.

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, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00431.x>>.

EFEUGLU, C.; AKÇAY, Y. D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-

rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Greenville**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, 2004.

EVERTS, P. A. M. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. In: EVERTS, P. A. M. (ed.). **Platelet-leukocyte enriched gel. basic and efficacy**. The Netherlands: D&L Graphics, 2007. p. 23-60.

FAN, H.; TAO, H.; WU, Y.; HU, Y.; YAN, Y.; LUO, Z. TGF- β 3 immobilized PLGA gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid hybrid scaffold for cartilage regeneration. **J Biomed Mater Res A**, v. 95, p. 982– 992, 2010.

FONTENOT, R. L.; SINK, C. A.; WERRE, S. R.; WEINSTEIN, N. M.; DAHLGREN, L. A. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 12, p. 1266–1272, 2012.

FONTENOT, R. L.; SINK, C. A.; WERRE, S. R.; WEINSTEIN, N. M.; DAHLGREN, L. A. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 12, p. 1266–1272, 2012.

FORTIER, L.A.; BARKER, J.U.; STRAUSS, E.J.; McCARREL, T.M.; COLE, B.J The role of growth factors in cartilage repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 489, n.10, p. 2706-2715, 2011.

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, n. 3, p. 154–159, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.otsm.2011.03.004>>.

FORTIER, L. A; MOHAMMED, H. O.; LUST, G.; NIXON, a J. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. **J Bone Joint Surg Br.**, v. 84, n. 2, p. 276–88, 2002.

FORTIER, L. A.; NIXON, A. J.; MOHAMMED, H. O.; LUST, G. Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and

supplemented with transforming growth factor β -1. **American journal of veterinary research**, v. 58, n. April 2015, p. 66–70, 1997.

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

FREYRIA, A.M.; MALLEIN-GERIN, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. **Injury**, v. 43, n. 3, p. 259–265, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.injury.2011.05.035>>.

FUFA, D.; SHEALY, B.; JACOBSON, M.; KEVY, S.; MURRAY, M. M. ACTIVATION OF PLATELET-RICH PLASMA USING SOLUBLE TYPE I COLLAGEN. **Journal Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 4, p. 684–690, 2008.

GELB, D. E.; ROSIER, R. N.; PUZAS, J. E. The production of transforming growth factor-b by chick growth plate chondrocytes in short term monolayer culture. **Endocrinology**, v. 127, p. 1941–1947, 1990.

GENTRY, P.A. Platelet Biology. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 459-466.

GIRALDO, C.E.; LOPEZ, C.; ALVAREZ, M.; SAMUDIO, I.J.; PRADES, M.; CARMONA, J.U. Effects of breed, sex and age on cellular content of growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 29–39, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1186/1746-6148-9-29>>.

GROZOVSKY, R.; HOFFMEISTER, K.M.; FALET, H. Novel clearance mechanisms of platelets. **Current Opinion in Hematology**, v. 17, n. 6, p. 585–589, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1097/MOH.0b013e32833e7561>>.

GURNEY, D.; LIP, G. Y. H.; BLANN, A. D. A reliable plasma marker of platelet

activation: Does it exist? **American Journal of Hematology**, v. 70, n. 2, p. 139–144, 2002.

HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; WAKABAYASHI, T.; SAMUELSSON, B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 71, p. 345–9, 1974.

HARRISON, P. Platelet function analysis. **Blood Reviews**, v. 19, n. 2, p. 111–123, 2005.

HARRISON, S.; VAVKEN, P.; KEVY, S.; JACOBSON, M.; ZURAKOWSKI, D.; MURRAY, M. M. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. **The American journal of sports medicine**, v. 39, n. 4, p. 729–34, 2011. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3176726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HARTLEY, P.S. Platelet senescence and death. **Clinical laboratory**, v. 53, n.3–4, p. 157–166, 2007.

HARTWIG, J. H. Platelet structure. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

HARTWIG, J.; ITALIANO, I. The birth of the platelet. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 7, p.1580- 1586, 2003.

HEATH, K. E.; CAMPOS-BARROS, A.; TOREN, A.; ROZENFELD-GRANOT, G.; CARLSSON, L. E.; SAVIGE, J.; DENISON, J. C.; GREGORY, M. C.; WHITE, J. G.; BARKER, D. F.; GREINACHER, A.; EPSTEIN, C. J.; GLUCKSMAN, M. J.; MARTIGNETTI, J. A. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. **Am J Hum Genet**, v. 69, n. 5, p. 1033-45, 2001.

HEEMSKERK, J. W.; BEVERS, E. M.; LINDHOUT, T. Platelet activation and blood coagulation. **Thromb Haemost**, v. 88, p. 186–193, 2002.

HESSEL, L. N.; BOSCH, G.; VAN WEEREN, P. R.; IONITA, J. C. Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 3, p. 319–325, 2015.

HOLMSEN, H. Platelet secretion and energy metabolism. In: HIRSH, J.; MARDER, V.; SALZMAN, E.W. **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**, 3. ed. 1993.

HUNZIKER, E.; ROSENBERG, M. Induction of repair in partial thickness articular cartilage lesions by timed release of TGF-B. **Trans Orthop Res Soc**, v. 19, p. 236, 1994.

HUNZIKER, E.; SCHENK, R. A differential treatment protocol for inducing cartilage and bone repair in full-thickness articular cartilage defects. **Trans Orthop Res Soc**, v. 20, p. 170, 1995.

ITALIANO, J.E. JR; RICHARDSON, J.L.; PATEL-HETT, S.; BATTINELLI, E.; ZASLAVSKY, A.; SHORT, S.; RYEOM, S.; FOLKMAN, J.; KLEMENT, G.L. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1227–1233, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1182/blood-2007-09-113837>>.

JY, W.; HORSTMAN, L. L.; PARK, H.; MAO, W. W.; VALANT, P.; AHN, Y. S. Platelet aggregates as markers of platelet activation: Characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications. **American Journal of Hematology**, v. 57, n. 1, p. 33–42, 1998.

KAMATH, S.; BLANN, A. D.; LIP, G. Y. H. Platelet activation: Assessment and quantification. **European Heart Journal**, v. 22, n. 17, p. 1561–1571, 2001.

KAPLAN, D.R.; CHAO, F.C.; STILES, C.D.; ANTONIADES, H.N.; SCHER, C.D. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. **Blood**, v. 53, n. 6, p. 1043–1052, 1979.

KAREY, K.P.; SIRBASKU, D.A. Human platelet-derived mitogens. II. Subcellular localization of insulinlike growth factor I to the alpha-granule and release in response to thrombin. **Blood**, v. 74, n. 3, p. 1093–1100, 1989.

KARPATKIN, S. Heterogeneity of human platelets. VI. Correlation of platelet function with platelet volume. **Blood**, v. 51, n. 2, p. 307–316, 1978.

KINGSTON, J. K.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. C.; MEYERS, K. M.; WARDROP, K. J. Effects of sodium citrate, low molecular weight heparin, and prostaglandin E1 on aggregation, fibrinogen binding, and enumeration of equine platelets. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 547–554, 2001.

KISSICH, C.; GOTTSCHALK, J.; LOCHMANN, G.; EINSPANIER, A.; BÖTTCHER, P.; WINTER, K.; BREHM, W.; IONITA, J. Biochemische Eigenschaften des equinen Autologous Conditioned Plasma® (ACP). **Pferdeheilkunde**, v. 28, p. 258-267, 2012.

KURTH, T.; HEDBOM, E.; SHINTANI, N.; SUGIMOTO, M.; CHEN, F. H.; HASPL, M.; MARTINOVIC, S.; HUNZIKER, E. B. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, p. 1178–1189, 2007.

LANDESBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R.S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, p. 297-300, 2000.

LANDI, E. P.; MARQUES JÚNIOR, J. F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 1, p. 39–46, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842003000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

LANSDOWN, D. A.; FORTIER, L. A. Platelet Rich Plasma: Formulations, Preparations, Constituents, and Their Effects. **Operative Techniques in Sports Medicine**, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1060187216300582>>.

LAZARUS, A.H.; WRIGHT, J.F.; BLANCHETTE, V.; FREEDMAN, J. Analysis of platelets by flow cytometry. **Transfusion Science**, v. 16, p. 353–61, 1995.

LEE, C. H.; COOK, J. L.; MENDELSON, A.; MOIOLI, E. K.; YAO, H.; MAO, J. J. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. **Lancet**, v. 376, p. 440–448, 2010.

LEHMANN, M.; MARTIN, F.; MANNIGEL, K.; KALTSCHMIDT, K.; SACK, U.; ANDERER, U. Three-dimensional scaffold-free fusion culture: The way to enhance chondrogenesis of in vitro propagated human articular chondrocytes. **Eur J Histochem**, v. 57, n. 4, p. 206–16, 2013.

LIPPI, G.; SALVAGNO, G.L.; MONTAGNANA, M.; POLI, G.; GUIDI, G.C. Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 17, p. 557-561, 2006.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 5 ed. New York: W. H. Freeman, 2004, 961p.

LUBKOWSKA, A.; DOLEGOWSKA, B.; BANFI, G. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 26, n. 2 Suppl 1, 2012.

MAGALON, J.; CHATEAU, A. L.; BERTRAND, B.; LOUIS, M. L.; SILVESTRE, A.; GIRAUDO, L.; VERAN, J.; SABATIER, F. DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. **BMJ Open Sport & Exercise Medicine**, v. 2, n. 1, p. e000060, 2016. Disponível em: <<http://bmjopensem.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjsem-2015-000060>>.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000300009&script=sci_arttext>. doi:10.1590/S0100- 736X2009000300009.

MALEMUD, C. J. The role of growth factors in cartilage metabolism. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 19, p. 569–580, 1993.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v.10, n.4, p. 225-228, 2001. Disponível em: <<http://www.dierenartshoegaerts.be/nl/therapie/injecties/documents/prpwhatisprpandwhatisnot.pdf>>.

MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEORGEFF, K.R. Platelet- rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 85, n. 6, p. 638–646, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi:S1079-2104\(98\)90029-4](http://dx.doi:S1079-2104(98)90029-4)>.

MAUTNER, K.; MALANGA, G.A.; SMITH, J.; SHIPLE, B.; IBRAHIM, V.; SAMPSON, S.; BOWEN, J.E. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. **PM&R Journal**, v. 7, p. 553–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.pmrj.2015.02.005>>.

MAYNARD, D.M.; HEIJNEN, H.F.; HORNE, M.K.; WHITE, J.G.; GAHL, W.A. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spec- trometry. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 1945-1955, 2007.

MAZZOCA, A. D.; MCCARTHY, M. B. R.; CHOWANIEC, B. S.; DUGDALE, E. M.; HANSEN, D.; COTE, M. P.; BRADLEY, J. P.; ROMEO, A. A.; ARCIERO, R. A.; BEITZEL, K. The positive effects of diferente platelet-rich plasma methods on human

muscle, bone, and tendo cells. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1742-1749, 2012.

MCCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 8, p. 1033–1042, 2009.

McILWRAITH, C. W. Principles and practices of joint disease treatment. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Elsevier, 2011. p. 840-852.

MCLELLAN, J.; PLEVIN, S. Temporal release of growth factors from platelet-rich Fibrin (PRF) and Platelet-rich Plasma (PRP) in the horse: A comparative in vitro analysis. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 12, n. 1, p. 48–57, 2014.

MICHELSON, A.D.; LINDEN, M.D.; BARNARD, M.R.; FURMAN, M.I.; FRELINGER, A.L. Flow cytometry. In: **Platelets**. Michelson, editor. 2nd ed. San Diego (CA): Elsevier/Academic Press, 2007. p. 545–64

MISHRA, A.; HARMON, K.; WOODALL, J.; VIEIRA, A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1185-1195, 2012.

MORALES, T. I.; JOYCE, M. E.; DANIELPOUR, D.; ROBERTS, A.B. Transforming growth factor- β in calf articular cartilage organ cultures: synthesis and distribution. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 288, n. 2, p. 397–405, 1991.

MURUGAPPAN, S.; SHANKAR, H.; KUNAPULI, S.P. Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A₂. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 30, n. 4, p. 411–418, 2004. DOI: 10.1055/s-2004-833476 12, 23

NIKOLIDAKIS, D.; JANSEN, J.A. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. **Tissue Engineering Part B Reviews**, v. 14, p. 249-258, 2008.

ORTEL, T.L.; MERCER, M.C.; THAMES, E.H.; MOORE, K.D.; LAWSON, M.D. Immunologic Impact and Clinical Outcomes After Surgical Exposure to Bovine Thrombin. **Annals of Surgery**, v. 233, n. 1, p. 88-96, 2001.

OTTAIANO, T. F.; ANDRADE, S. S.; DE OLIVEIRA, C.; SILVA, M. C. C.; BURI, M. V.; JULIANO, M. A.; GIRÃO, M. J. B. C.; SAMPAIO, M. U.; SCHMAIER, A. H.; WLODAWER, A.; MAFFEI, F. H. A.; OLIVA, M. L. V. Plasma kallikrein enhances platelet aggregation response by subthreshold doses of ADP. **Biochimie**, v. 135, p. 72-81, 2017.

PAKALA, R.; WAKSMAN, R. Currently available methods for platelet function analysis: Advantages and disadvantages. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v. 12, n. 5, p. 312–322, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carrev.2010.09.005>>.

PELAGALLI, A.; BELISARIO, M.A.; TAFURI, S.; LOMBARDI, P.; D'ANGELO, D.; AVALLONE, L.; STAIANO, N. Adhesive properties from different animal species. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 127-131, 2003.

PEREIRA, J. Estructura, producción, cinética y función de las plaquetas. En: Mezzano, D.; Pereira, J. **Fisiología de la Sangre**. Santiago: Ediciones Universidad Católica de Chile, 1993, p.145-176.

PEREIRA, J. La Fisiopatología de la hemostasia: algunos aspectos sobre la vida y muerte de las plaquetas en la circulación. **Boletín Escuela de Medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile**, v. 33, p. 5-19, 2008.

PEREIRA, R. C. D. F.; ZACARIAS, G. V. F.; CANTARELLI, C.; CORRÊA, M. M. B.; SILVA, G. B.; BARBOSA, A. L. T.; BRASS, K. E.; CÔRTE, F. D. Avaliação De Sete Protocolos De Obtenção De Plasma Rico Em Plaquetas. **Ciência Rural**, p. 6, 2012.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2010.06.003>>.

PLAAS, A.; VELASCO, J.; GORSKI, D. J.; LI, J.; COLE, A.; CHRISTOPHERSON, K.; SANDY, J. D. The relationship between fibrogenic $\text{tgf}\beta 1$ signaling in the joint and cartilage degradation in post-injury osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, n. 9, p. 1081–1090, 2011.

RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, v. 12, n. 5, p. 61–273, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1080/09537100120068170>>.

RINNOVATI, R.; ROMAGNOLI, N.; GENTILINI, F.; LAMBERTINI, C.; SPADARI, A. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 45, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27377748>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4932754>>.

RÍOS, D. L.; LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. E.; SAMUDIO, I. J.; CARMONA, J. U. Effects over time of two platelet gel supernatants on growth factor, cytokine and hyaluronan concentrations in normal synovial membrane explants challenged with lipopolysaccharide. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 16, p. 153, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4475292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B.; HARKER, L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 71, n. 4, p. 1207–1210, 1974.

RUDKIN, G. H.; MILLER, T. A. Growth factors in surgery: Review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 97, p. 469-76, 1996.

RUF, A.; PATSCHEKE, H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 21, p. 146–51, 1995.

RUTGERS, M.; SARIS, D.B.; DHERT, W.J.; CREEMERS, L.B. Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 3, p. R114, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1186/ar3050>>.

RUMBAUT, R. E.; THIAGARAJAN, P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. In: GRANGER, D. N.; GRANGER, J. P. **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. v. 2, p. 1-75.

SEHGAL, S.; STORRIE, B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 10, p. 2009–2016, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02698.x> JTH02698>.

SEGURA, D.; MONREAL, L.; ESPADA, Y.; PASTOR, J.; MAYÓS, I.; HOMEDES, J. Assessment of a platelet function analyser in horses: Reference range and influence of a platelet aggregation inhibitor. **Veterinary Journal**, v. 170, n. 1, p. 108–112, 2005.

SEGURA, D.; MONREAL, L.; PÉREZ-PUJOL, S.; PINO, M.; ORDINAS, A.; BRUGUÉS, R.; WHITE, J. G.; ESCOLAR, G. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 581–588, 2006.

SHADEMAN, M.; PARHAM, A.; DEGHANI, H. Enhancement of chondrogenic differentiation potential of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using TGF- β 3 and BMP-6. v. 368, p. 360–368, 2016.

SPENCER, F. A.; BECKER, R. C. Platelets: Structure, Function, and Their Fundamental Contribution to Hemostasis and Pathologic Thrombosis. In: BECKER, R.C. (ed). **Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis**, Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 31-49.

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

TABLIN, F. Platelet structure and function. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.448-452.

TAKAHASHI, T., OGASAWARA, T., ASAWA, Y., MORI, Y., UCHINUMA, E., TAKATO, T., HOSHI, K. Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. **Tissue Engineering**, v. 13, p. 1583-1592, 2007.

TCHETINA, E. V.; ANTONIOU, J.; TANZER, M.; ZUKOR, D. J.; POOLE, A. R. Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production. **Am J Pathol**, v. 168, p. 131-40, 2006.

TEXTOR, J. Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 275–298, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2011.05.001>>.

TEXTOR, J. Platelet-Rich Plasma (PRP) as a Therapeutic Agent: Platelet Biology, Growth Factors and a Review of the Literature. In: LANA, J.F.S.D.; ANDRADE

SANTANA, M.H.; DIAS BELANGERO, W.; MALHEIROS LUZO, A.C. (eds.). **Platelet-Rich Plasma. Regenerative Medicine: Sports Medicine, Orthopedic, and Recovery of Musculoskeletal Injuries**. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2014; p 61-94.

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 of Veterinary Research**, v. 72, n. 2, p. 271–278, 2011.

TEXTOR, J. A.; TABLIN, F. Activation of equine platelet-rich plasma: Comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. **Veterinary Surgery**, v. 41, n. 7, p. 784–794, 2012.

VAN BEUNINGEN, H. M.; GLANSBEEK, H. L.; VAN DER KRAAN, P. M.; VAN DEN BERG, W. B. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 6, p. 306-7, 1998.

VAN BEUNINGEN, H. M.; VAN DER KRAAN, P. M.; ARNTZ, O. J.; VAN DEN BERG, W. B. Protection from interleukin 1 induced destruction of articular cartilage by transforming growth factor β : studies in anatomically intact cartilage *in vitro* and *in vivo*. **Ann Rheum Dis**, v, 52, n. 3, p. 185-91, 1993.

VAN BEUNINGEN, H. M.; VAN DER KRAAN, P. M.; ARNTZ, O. J.; VAN DEN BERG, W. B. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. **Lab Invest**, v. 71, p. 279-290, 1994.

VAN DER KRAAN, P. M.; BLANEY DAVIDSON, E. N.; BLOM, A.; VAN DEN BERG, W. B. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17, n. 12, p. 1539-45, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.joca.2009.06.008>>.

VARGA-SZABO, D.; BRAUN, A.; NIESWANDT, B. Calcium signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 1057–1066, 2009. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x 23

VENDRUSCOLO, C. P.; ALVES, A. L. G.; BROSSI, P. M.; BACCARIN, R. Y. A. Uso do soro autólogo condicionado e do plasma rico em plaquetas na terapia ortopédica de equinos. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 35, n. 5, p. 2607–2624, 2014.

VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. de M.; MORAES, L. F.; MAIA, L.; QUEIROZ, D. L.; WATANABE, M. J.; YAMADA, A. L. M.; ALVES, A. L. G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 106–110, 2012.

VIDAL, M. A.; ROBINSON, S. O.; LOPEZ, M. J.; PAULSEN, D. B.; BORKHSENIUS, O.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 8, p. 713–724, 2009.

WASELAU, M.; SUTTER, W. W.; GENOVESE, R. L.; BERTONE, A. L. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 10, p. 1515–1520, 2008.

WASTERLAIN, A. S.; BRAUN, H. J.; DRAGOO, J. L. Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 22, n. 1, p. 33–42, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.oto.2011.11.001>>.

WATSON, S.; BERLANGA, O.; BEST, D.; FRAMPTON, J. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? **Platelets**, v. 11, n. 5, p. 252-258, 2000.

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. **Internal Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 16, p. 693-699, 2001.

WEYRICH, A. S.; SCHWERTZ, H.; KRAISS, L. W.; ZIMMERMAN, G. A. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 2, p. 241–246, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03211.x>>.

WHITE, J. A. **Current Concepts of Platelet Structure**. American Society of Clinical Pathologists. p. 363-378, 1979.

WHITE, J.G. Platelet Structure. In: Michelson, A.D. (ed). **Platelets**, 2nd edn. Burlington: Academic Press, Elsevier, 2007, p. 45–71.

WITTE, L.D.; KAPLAN, K.L.; NOSSEL, H.L.; LAGES, B.A.; WEISS, H.J.; GOODMAN, D.S. Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 42, n. 3, p. 402–409, 1978.

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

ZHOU, L.; SCHMAIER, A. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 123, n. 2, p. 172–183, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1309/Y9EC63RW3XG1V313>>.