

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

DISSERTAÇÃO

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM EQUINOS: OBTENÇÃO E
EFEITO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS *IN VITRO***

JANAINA GODINHO LOUZADA

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**“PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM EQUINOS: OBTENÇÃO E
EFEITO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS *IN VITRO*”**

JANAINA GODINHO LOUZADA

Sob a orientação do Professor
Paulo de Tarso Landgraf Botteon

e Coorientação da Dra
Luciana Rodrigues de Almeida Figueiredo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), área de concentração em Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Agosto de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L886p LOUZADA, JANAINA GODINHO, 1976-
PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM EQUINOS: OBTENÇÃO E
EFEITO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS IN VITRO / JANAINA GODINHO LOUZADA. -
2018.
40 f.: il.

Orientador: PAULO DE TARSO LANDGRAF BOTTEON.
Coorientadora: LUCIANA RODRIGUES DE ALMEIDA
FIGUEIREDO.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA/PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS, 2018.

1. EQUINO. 2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS. 3. CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS. 4. OBTENÇÃO DE PRP. 5.
PROLIFERAÇÃO CELULAR. I. BOTTEON, PAULO DE TARSO
LANDGRAF, 1964-, orient. II. FIGUEIREDO, LUCIANA
RODRIGUES DE ALMEIDA, 1976-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PÓS
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA/PATOLOGIA E
CIÊNCIAS CLÍNICAS. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

JANAINA GODINHO LOUZADA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/08/2018

Paulo de Tarso Landgraf Botteon. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Daniel Augusto Barroso Lessa. Dr. UFF

Marta Fernanda Albuquerque da Silva. Dra. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minha avó Maria do Carmo *in memoriam*, a toda minha fé em Deus
e em São Francisco de Assis!

*“Todos os seres são iguais, pela sua origem, seus direitos naturais e divinos e seu
objetivo final”*

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará
fazendo o impossível”*

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Não teria como ser diferente, agradecer a Deus que me deu a chance de tentar, me deu forças para seguir e mais ainda para finalizar.

Agradecer aos meus pais Joaquim e Solange por toda determinação e luta para nos ensinar os passos certos numa vida muitas vezes bem mais difícil que poderia se imaginar, obrigada por vocês estarem na minha vida sempre! Amo vocês mais que tudo!

Um agradecimento muito especial para a melhor pessoa que já conheci na vida, minha avozinha Maria do Carmo, que transbordava em bondade por toda sua existência, graças a você meu amor, aqui estou, terminando mais uma etapa. Te amo para sempre!

Meu orientador, Professor Paulo Botteon, que nunca deixou de me incentivar, me apoiando mesmo nos piores momentos, obrigada por você ter acreditado em mim, simplesmente me fazendo crer que daria certo e guiando os passos dessa jornada, que mais alunos tenham em suas vidas, um professor como você, que entende, orienta e apoia.

Obrigada especial para minha coorientadora Luciana Almeida que foi quem me fisgou num dia comum e me convenceu que era o momento para começar esse sonho, me abriu as portas do seu laboratório, me apresentou pessoas únicas e especiais que fizeram esse trabalho comigo, que você esteja sempre por perto, obrigada Luciana.

Essas pessoas especiais, são vocês: Hélio da Cunha Menezes Neto, Adiléa Cavalcanti Marques e Aline Pimentel, nunca terei como agradecer a vocês, que me apresentaram um novo mundo, aguentaram minhas angústias e dúvidas e me deram as mãos, conhecimento e energia para realizarmos essa dissertação. Obrigada equipe Cellen. Hoje vocês são meus amigos e são muito especiais para mim.

Nunca poderia esquecer da equipe da Cocheira da Vila Lagoa 19 do Jockey Club Brasileiro, em especial, Álvaro Castillo, Zezinho, Paulo, Flávio, Magrão e todos vocês cavaleiros que mesmo na tarefa diária e exaustiva, paravam para me ajudar com os cavalos, carinho todo especial por vocês, obrigada a todos vocês!

Uma equipe muito especial, a do Jockey Club Brasileiro, que desde o início, me apoiou, permitindo o uso do LACVET em nosso trabalho, por isso não posso deixar de citar Dr Felipe Figueira, Dra Juliana Braga, Dra Rosalie Kowal, Dra Lindiane Henriques, Dr Tiago Miglio, Dra Marta, secretária Cristiane, técnica Suzana, D Daise, Jussara Borges, Fabrício, Cidinho, Rafael, Suzana, Daniele, Residentes e Estagiários HOD. Obrigada por estarem presentes e por todo apoio técnico e pessoal. Obrigada Jockey Club Brasileiro, Hospital Octavio Duppont e a todos que neles trabalham.

Dr Flavio Carneiro e Raimundo dos Santos, obrigada por tudo que dividiram comigo ao longo de tantos anos na nossa missão diária, que muitas vezes é pesada, mas que sempre é gratificante, obrigada pelos ensinamentos, amizade e companheirismo, não mudaria nada desses anos, com eles, aprendi e cresci como pessoa e veterinária.

Enfim, obrigada minha Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por novamente me abrir as suas portas, me abraçar como aluna novamente, me fazer sentir feliz por estar ao lado de professores, técnicos, secretárias, amigos, residentes, alunos. Obrigada por mais essa oportunidade, “você”, Rural, novamente conseguiu, aqui estou feliz e agradecida por mais uma etapa na minha carreira que “você” me deu. Obrigada!

Cavalos, vocês estão em último, mas não são os últimos e sim os primeiros, foram vocês que me fizeram acreditar na Veterinária, foram vocês que me deram forças para seguir acordada, quando os olhos caíam pesados depois de noites sem fim, foram vocês e são vocês que me fazem chorar de alegria e também por impotência quando não consigo poupar-lhes da dor, todas as vezes que vocês me olham, me afagam, me enfrentam dentro de toda sua força, todas as vezes, são vocês que me ajudam, são vocês que me apoiam,

me sustentam, obrigada seres incríveis, obrigada por me deixarem viver perto de vocês, por permitirem que eu, ingênua, ache que os estou ajudando, quando na verdade, são vocês que sempre me ajudam.

RESUMO

LOUZADA, Janaina Godinho. **Plasma Rico em Plaquetas em equinos: obtenção e efeito sobre a proliferação celular de células-tronco mesenquimais *in vitro***. p. Dissertação (Mestrado em Patologia e Ciências Clínicas, Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas obtido por meio de uma metodologia simples, com boa relação custo-benefício para obter altas concentrações de fatores de crescimento a partir das plaquetas, que possuem propriedades regenerativas, com ação sobre a angiogênese, proliferação e migração celular. Atualmente o PRP é utilizado na medicina equina como produto autólogo terapêutico, principalmente no tratamento de fraturas ósseas, tendinites, desmites, artropatias e feridas cutâneas. As células-tronco estão presentes em todos os tecidos e órgãos, tendo como função primária a reposição de células perdidas durante o desgaste normal. Elas também estão envolvidas no reparo de tecidos lesionados por doenças e traumas e são, cada vez mais, objeto de estudo e de utilização na medicina equina para tratamentos diversos, visando a regeneração celular, permitindo desta forma recuperações acima da média de tratamentos habituais, onde o retorno à atividade atlética do equino é a principal finalidade de sua utilização. A associação de PRP e células-tronco tem sido cada vez mais empregada em lesões ósseas, ligamentares e tendíneas de forma a obter-se regeneração celular em tais lesões. Vários protocolos para obtenção de PRP têm sido propostos e citados na literatura e isso dificulta a escolha do protocolo mais adequado. Tentando encontrar um PRP com maior concentração plaquetária, demos início ao nosso estudo, onde a partir da avaliação de cinco protocolos citados em literatura e um determinado em nosso laboratório, selecionamos um que atendeu a esse requisito. Após a obtenção do protocolo de PRP, avaliamos o efeito do PRP e do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) em cocultivo com células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo equino (MSCs), a fim de avaliarmos seu possível efeito sobre a proliferação celular das mesmas. Obtivemos um PRP com contagem plaquetária dez vezes o valor médio basal inicial, sendo o protocolo mais eficiente em concentrações plaquetas. Não conseguimos replicar os resultados obtidos em outros laboratórios, indicando a necessidade do desenvolvimento de protocolos adequados para cada laboratório. Diferentes concentrações de PRP e PPP influenciaram a proliferação celular de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo equino. A morfologia fibroblastoide das MSCs foi mantida no cultivo com acréscimo de 2 % de PRP ao meio de cultivo. O PRP na concentração de 2% não inibiu a proliferação celular de MSCs *in vitro* e ainda manteve suas características morfológicas iniciais.

Palavras-chave: PRP, células-tronco, equino.

ABSTRACT

LOUZADA, Janaina Godinho. **Plasma Rico em Plaquetas em equinos: obtenção e efeito sobre a proliferação celular de células-tronco mesenquimais *in vitro***. p. Dissertação (Mestrado em Patologia e Ciências Clínicas, Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Platelet Rich Plasma (PRP) is a platelet concentrate obtained through a simple, cost-effective methodology to obtain high concentrations of platelet growth factors that have regenerative properties, acting on angiogenesis, cell proliferation and migration. Currently PRP is used in equine medicine as an autologous therapeutic product, mainly in the treatment of bone fractures, tendinitis, defects, arthropathies and cutaneous wounds. Stem cells are present in all tissues and organs, with the primary function of replacing cells lost during normal wear and tear. They are also involved in the repair of tissue damaged by diseases and traumas and are increasingly being studied and used in equine medicine for various treatments, aiming at cellular regeneration, allowing in this way recoveries above the average of usual treatments, where the return to athletic activity of the equine is the main purpose of its use. The association of PRP and stem cells has been increasingly employed in bone, ligament and tendinous lesions in order to obtaining cellular regeneration in such lesions. Several protocols for obtaining PRP have been proposed and cited in the literature and this makes it difficult to choose the most appropriate protocol. Trying to find a PRP with higher platelet concentration, we started our study, where from the evaluation of five protocols cited in the literature and one in our laboratory, we selected one that met this requirement. After obtaining the PRP protocol, we evaluated the effect of PRP and Poor Plasma on Platelets (PPP) in cocultivation with mesenchymal stem cells obtained from equine adipose tissue (MSCs), in order to evaluate its possible effect on the cellular proliferation of themselves. We obtained a PRP with platelet count ten times the baseline mean value, being the most efficient protocol in platelet concentrates. We could not replicate the results obtained in other laboratories, indicating the need to develop protocols suitable for each laboratory. Different concentrations of PRP and PPP influenced the cell proliferation of mesenchymal stem cells obtained from equine adipose tissue. The fibroblastoid morphology of the MSCs was maintained in the culture with a 2% increase of PRP to the culture medium. PRP at 2% concentration didn't inhibit cell proliferation of MSCs *in vitro* and still maintained its initial morphological characteristics.

Key word: PRP, stem cells, equine.

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

ACD	cido-citrato-dextrose
ACD-A	cido-citrato-dextrose A
ACD-B	cido-citrato-dextrose B
AdMSCs	Células-tronco adiposas
AdMSCs/FVA	Células-tronco derivadas da frao vascular do tecido adiposo
ADSCs	Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
CMO	Concentrado de medula óssea
CTM	Células-tronco mesenquimais
CPD	Citrato fosfato dextrose
CS	Citrato de sódio
CTA	Células-tronco adultas
CTE	Células-tronco embrionárias
DF10	DMEM com 10% de soro fetal bovino
DMEM	Dubelcco' s Modified Eagle Medium
EDTA	cido Etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epitelial
g	Força centrífuga
IFN- γ	Interferon gama
IGF-I	Fator de crescimento insulínico
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-14	Interleucina 14
IL-2	Interleucina 2
L-PRP	Plasma Rico em Plaquetas e em Leucócitos
MO-MSCs	Células-tronco mesenquimais cultivadas de aspirado de medula óssea
MSCs	Células-tronco mesenquimais adultas
PBS	Phosphate Buffered Saline/ Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
P-PRP	Plasma Puro Rico em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
TGF β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Protocolos estudados para obtenção do PRP (plasma rico em plaquetas)	11
Tabela 2 - Concentrações plaquetárias e leucocitárias médias dos protocolos de obtenção de PRP	15
Tabela 3 - Número de MSCs em cultivo com diferentes concentrações de PRP e PPP	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração das etapas para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), utilizadas neste experimento. Fonte: http://hardwickclinic.co.uk/treatments/prp/	10
Figura 2 Coleta de tecido adiposo equino da região glútea para obtenção de células tronco (Fonte: arquivo pessoal)	12
Figura 3 Capacidade de concentração de plaquetas dos protocolos testados para obtenção do PRP, em relação à média basal de plaquetas. Boxplot com * indica diferença estatisticamente significativa entre os protocolos (Valor P=0,000025456). Teste Kruskal-Wallis.	16
Figura 4 Concentração de leucócitos por mm ³ nos diferentes protocolos de obtenção de PRP. Valor P= 0,150369. Teste Kruskal-Wallis.....	17
Figura 7 Cultivo de células tronco mesenquimais (MSCs). Controle positivo “a”. Controle negativo “b”. Cultivo de MSCs com 2 % de plasma rico em plaquetas (PRP) “c”. Cultivo de MSCs com 5 % de plasma rico em plaquetas (PRP) “d”. Cultivo de MSCs com 2 % de plasma pobre em plaquetas (PPP) “e”.	19

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	2
3	REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1	Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	3
3.2	Fatores de Crescimento	4
3.3	Citocinas.....	5
3.4	Coleta	5
3.5	Células-tronco adultas.....	6
3.6	Células-tronco mesenquimais	6
3.7	Combinação do uso de PRP e MSCs	7
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1	Coleta de sangue para obtenção do PRP	9
4.2	Definição do protocolo de obtenção de PRP	9
4.3	Análise hematológica	11
4.4	Coleta de tecido adiposo equino, isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais (MSCs) obtidas a partir do tecido adiposo	11
4.5	Cultivo de PRP com células mesenquimais equinas- Teste de proliferação celular	13
4.6	Estatística	14
	Os dados brutos foram testados pelo método estatístico Shapiro-Wilk e em seguida, os dados foram normalizados aplicando-se transformação logarítmica (Log2), em seguida analisados pelo teste ANOVA e teste de Turkey. Os dados não normais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis com $\alpha = 5\%$	14
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1	Definição do protocolo de obtenção do PRP	15
5.2	Teste de Proliferação de MSCs com diferentes concentrações de PRP e PPP .	18
6	CONCLUSÃO.....	22
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 INTRODUÇÃO

Na busca por tratamentos eficientes, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), ocupa hoje uma posição de grande relevância na recuperação de lesões tendíneas, ligamentares, ósseas e outras. A partir do sangue total com anticoagulante, obtém-se o PRP, um produto biológico autólogo, com baixo custo, que pode ser obtido através de Kits comerciais ou de dupla centrifugação, tendo-se ao final um produto com elevado número de plaquetas e reduzido número de leucócitos, rico em fatores de crescimento e interleucinas, que participam nos processos de angiogênese e reparo tecidual. Devido a todos seus benefícios na regeneração celular, seu emprego é cada vez maior e torna-se de grande valia, que estudos sejam elaborados a fim da obtenção de informações seguras de sua obtenção, momento de aplicação e tipos de PRP baseado em seus fatores de crescimento e interleucinas. O presente trabalho avaliou inicialmente cinco protocolos de obtenção de PRP previamente descritos em literatura ou utilizados em laboratório de rotina e a partir de resultados preliminares propomos um sexto protocolo, que foi incluído no estudo. O critério de escolha para o protocolo de obtenção do PRP, foi o de maior contagem plaquetária.

O estudo de células-tronco data da década de 60 e desde então diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar seus resultados. As células-tronco podem ser de origem embrionária ou adultas, as de origem embrionária possuem sua utilização freada em função de questões éticas e de biossegurança, sendo assim, as células-tronco adultas são as que estudamos e as utilizadas para obtermos regeneração celular. Células-tronco mesenquimais adultas (MSCs) podem ser originárias de medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e etc. Diferenças são encontradas a partir da origem das mesmas, principalmente em relação à quantidade de células obtidas. As MSCs podem diferenciar-se em células do tecido onde se encontram, são envolvidas no processo de reparação de tecidos lesionados e quando ocorre a injúria tecidual, elas se proliferam a partir de pericitos e produzem fatores envolvidos na imunomodulação e fatores tróficos que serão de grande importância na regeneração tecidual.

No contexto da medicina regenerativa, a associação de PRP às MSCs, representa uma possibilidade terapêutica com grandes perspectivas de favorecer a regeneração tecidual. Mesmo com poucos trabalhos na literatura científica nesse aspecto, os mesmos mostram resultados promissores, que justificam maior aprofundamento do estudo dessa associação.

Após a obtenção do PRP e do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), que corresponde à camada superior obtida após a segunda centrifugação para obtenção do PRP, estudou-se o cocultivo de diferentes concentrações de PRP e de PPP com MSCs obtidas de tecido adiposo equino, a fim de avaliar se os mesmos eram capazes de permitir a proliferação celular das MSCs com qualidade semelhante ao meio de cultivo empregado rotineiramente com essa finalidade.

2 OBJETIVOS

Determinar um protocolo de obtenção de PRP equino com a maior concentração plaquetária possível.

Avaliar o efeito do PRP e do PPP sobre a proliferação de células-tronco mesenquimais adultas obtidas de tecido adiposo equino.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O PRP é um volume de plasma autólogo que possui uma concentração plaquetária acima da linha de base, se constituindo num produto seguro e livre de doenças transmissíveis, importante na estimulação e aceleração da cicatrização tecidual de ossos e tecidos moles (MARX, 2001).

Atualmente, na medicina equina, o PRP, é muito utilizado em tratamento de lesões tendíneas (MAIA et al, 2009), ligamentares, osteo-articulares (CARMONA et al, 2009) e cicatrização de feridas (DEROSSI et al, 2009). Estudos clínicos distintos têm avaliado a eficácia do PRP, entretanto, estes ainda não são conclusivos e entre as principais razões, está a variação nos protocolos de obtenção do PRP, determinando diferentes respostas que não podem ser comparadas (AMABLE et al., 2013).

O PRP pode ser obtido após uma centrifugação leve (de menor magnitude gravitacional) do sangue total com anticoagulante, onde separam-se as células vermelhas e em seguida uma segunda centrifugação em alta rotação (maior magnitude gravitacional) para concentrar as plaquetas. A camada inferior (um terço) obtida após a segunda centrifugação é então denominada PRP e a camada superior (dois terços) é o PPP, as plaquetas que estão num botão no final do tubo são então suspensas em um volume pequeno de plasma (2 a 4 ml). Há ainda vários Kits comerciais disponíveis para obtenção de PRP, todos operam com 20 a 60 ml de sangue total e usam centrifugação como princípio, diferem-se bastante entre si, dependendo do tempo e método de centrifugação e por isso são obtidas diferentes concentrações plaquetárias e leucocitárias, o que influencia diretamente as quantidades de fatores de crescimento presentes no PRP, com isso é difícil afirmar onde um Kit é melhor indicado (DHURAT; SUKESH, 2014).

O PRP pode ser classificado como: plasma puro rico em plaquetas (P-PRP), plasma rico em plaquetas e em leucócitos (L-PRP) e plasma rico em fibrina (PRF). O PRF não necessita de anticoagulantes para sua obtenção. Em cavalos, P-PRP apresenta uma leve elevação da contagem plaquetária (1.3- 4.0 vezes) e leucocitária (0.5-2.0 vezes) em comparação ao sangue total, enquanto L-PRP apresenta um elevado contagem plaquetária (5.0 vezes) e leucocitária (3.0 vezes) ou mais quando comparado ao sangue total (GIRALDO et al., 2013).

As plaquetas são as menores células do sangue, são fragmentos de citoplasma de megacariócitos e na sua ativação, mudam seu formato discoidal para esférico e compacto com longas extensões dendríticas facilitando sua adesão, possuem duração aproximada de dez dias e são ditas, multifuncionais, por estarem envolvidas em vários processos patofisiológicos, como: hemostasia e trombose, regulação do tônus vascular, inflamação, defesa do hospedeiro e biologia tumoral (GEORGE, 2000).

Suas funções principais são prevenir a perda aguda de sangue e reparar danos nas paredes vasculares e de tecidos adjacentes após a injúria tecidual. A ativação plaquetária ocorre após o contato com o colágeno, exposto pela lesão endotelial. As plaquetas secretam mediadores intracelulares e citocinas da sua reserva citoplasmática e aumentam seu conteúdo de α grânulos após agregação plaquetária. Tal secreção é intensa na primeira

hora e as plaquetas continuam sintetizando mais citocinas e fatores de crescimento a partir de suas reservas de mRNA ao menos por sete dias (SENZEL et al, 2009). Proliferação celular, angiogênese e migração celular são estimulados pelas plaquetas. Relatos também confirmam que plaquetas secretam peptídeos antimicrobianos, sugerindo efeito antibiótico (DRAGO et al., 2013)

O PRP deve conter em média cinco vezes o valor de plaquetas a partir dos níveis fisiológicos, (MARX et al, 2004) e se constitui numa fonte natural de vários fatores de crescimento, que são peptídeos produzidos por células que podem atuar de maneira autócrina, parácrina e endócrina, são denominados dessa forma, porque ao serem visualizados pela primeira vez, observou-se que produziam proliferação celular. Atualmente são reconhecidos por estimularem a proliferação celular, possuindo participação importante em processos como a cicatrização e a angiogênese (CARMONA; LOPEZ, 2011). Os fatores de crescimento secretados pelas plaquetas, imediatamente se ligam à superfície externa das membranas celulares de células no enxerto, borda ou na ferida via receptores transmembranas. Estudos demonstram que células-tronco mesenquimais adultas, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e epidermais expressam receptores de membrana para os fatores de crescimento presentes no PRP. Os receptores transmembranas induzem a ativação endógena de sinalização proteica, que causa a expressão de uma sequência genética que determina proliferação celular, produção de matriz, de tecido ósseo, síntese de colágeno, etc. Os fatores de crescimento não são mutagênicos, somente atuam através da estimulação da cicatrização normal, mais rápida. O PRP não possui habilidade de indução tumoral e nunca foi relatada tal ocorrência (MARX, 2004).

3.2 Fatores de Crescimento

As plaquetas podem ser consideradas um depósito endógeno de uma variedade de fatores de crescimento. Muitos dos fatores de crescimento estão estocados nos α -grânulos plaquetários, incluindo: Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)- é o primeiro fator de crescimento que surge nos ferimentos e inicia a cicatrização do tecido conectivo através da promoção da síntese de colágeno e proteína. Seu efeito primário aparece com seu efeito mitogênico para células derivadas da mesoderme como os fibroblastos, células musculares vasculares, células da glia e condrócitos. Sua função mais importante inclui a angiogênese e a quimiotaxia para fibroblastos e síntese de colágeno (CIVININI et al, 2013) Fator de crescimento transformador beta (TGF- β)- esse fator quimiotático estimula a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais, estimula quimiotaxia de células endoteliais e angiogênese (CIVININI et al, 2013). Tem sido reportado como angiogênico e inibidos da formação de osteoclastos e proliferação de células epiteliais na presença de outros fatores de crescimento; Fator de crescimento epitelial (EGF)- Fator de efeito quimiotático e mitogênico em fibroblastos e células epiteliais. Foi descrito como indutor de migração celular e estimulador da formação de tecido de granulação; Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)- Provoca hiperpermeabilidade de vasos sanguíneos. Ele é mitogênico, pro-aptóico e promove quimiotaxia e diferenciação de células epiteliais, renais e da glia, assim como fibroblastos. Em adição, o Fator de crescimento insulínico (IGF-I), que circula no sangue na forma de complexo, ligado a proteínas, estimula a formação de matriz óssea, a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais na condrogênese, adipogênese, miogênese, promove a diferenciação neuronal e induz quimiotaxia nas células vasculares endoteliais.(ANITUA; ALKHRAISAT; ORIVE, 2012).

3.3 Citocinas

Citocinas, são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando de 8 a 30 kDa. São produzidas por vários tipos celulares, no local de injúria e por células do sistema imunológico, através de proteínas quinases ativadas por mitógenos. Elas influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência de células imunes, assim como regulam a produção e atividade de outras citocinas que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou diminuir (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (DE OLIVEIRA et al., 2011). Segundo estudos, a regulação do processo inflamatório envolve um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, estas últimas possuem efeito inibitório sobre as primeiras. De um modo geral, a concentração livre de citocinas anti-inflamatórias em indivíduos saudáveis é considerável, enquanto que as citocinas pró-inflamatórias são quase inexistentes, pois sua atividade fica confinada ao local de sua liberação e tem uma vida relativamente curta (MOURA; POMERANTZEFF e GOMES, 2001). As citocinas são liberadas a partir da migração leucocitária para o sítio de lesão. As principais citocinas pró-inflamatórias são: o fator de necrose tumoral (TNF- α), o IFN- γ (Interferon Gama), a interleucina 12 (IL-12), 1 (IL-1), 2 (IL-2) e as citocinas anti-inflamatórias, a interleucina 10 (IL-10), 13 (IL-13), e fator de crescimento β (TGF β).

O IFN- γ , produzido por células Natural Killers e linfócitos T, contribui na resposta inflamatória aguda e principalmente na crônica, atraindo macrófagos e aumentando o número de células fagocitárias no local da inflamação (SILVEIRA et al., 2009). TNF α , também conhecida como caquexina, é produzido por monócitos, macrófagos e linfócitos-T que são abundantes no peritônio e tecido esplâncnico. O TGF β possui ação anti-inflamatória, inibindo a produção de IL-1, IL-2, IL-6 e TNF. IL-1, é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não-imunes, como fibroblastos ativadas e células endoteliais, durante o dano celular, infecção e inflamação. IL-2 é produzida principalmente por células T CD4 e em menor quantidade por células T CD8+, contribui para a geração e propagação das respostas imunológicas antígeno-específicas, com meia-vida curta e geralmente não é detectada em injúrias agudas. IL-10, é sintetizada por células imunes e neuroendócrinas e tecidos neurais, e inibe citocinas pró-inflamatórias. IL-13, citocina anti-inflamatória produzida por linfócitos CD4 células-T, afeta linfócitos-B e monócitos, inibindo a produção de óxido nítrico e várias citocinas (DE OLIVEIRA et al., 2011). IL-12, citocina pró-inflamatória, é induzida em linfócitos e ativa macrófagos (MOURA; POMERANTZEFF e GOMES, 2001).

3.4 Coleta

Um ponto muito abordado na obtenção de PRP, é quanto ao anticoagulante empregado na coleta de sangue para esse procedimento. O Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), apesar de permitir altos números de plaquetas, parece determinar maior lesão às mesmas (LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000) O PRP equino geralmente é preparado a partir de sangue total coletado com citrato de sódio (CS) ou ácido-citrato-dextrose (ACD) sem considerações que justifiquem o uso de um ou outro anticoagulante (GIRALDO; LÓPEZ; CARMONA, 2015).

O anticoagulante citrato-dextrose-A (ACD-A) é preferido e é o melhor para viabilidade plaquetária. O citrato se liga ao cálcio para criar a anticoagulação, enquanto a dextrose, os tamponantes e outros ingredientes criam o suporte para o metabolismo plaquetário. ACD-A é o anticoagulante utilizado para estocar plaquetas viáveis para transfusão de plaquetas em bancos de sangue. Citrato fosfato dextrose (CPD) também é

usado para desenvolvimento de PRP. Ele é similar ao ACD-A, mas tem menos ingredientes de suporte e é portanto 10% menos efetivo na manutenção da viabilidade plaquetária (MARX, 2001)

Após estudos que avaliaram o efeito do citrato de sódio (CS), ácido-citrato dextrose-A (ACD-A) e ácido-citrato dextrose-B (ACD-B) sobre a contagem leucocitária, plaquetometria e parâmetros moleculares, como TGF- β_1 , concluiu-se que os anticoagulantes avaliados não tiveram influência nas contagens celulares ou nas concentrações dos fatores de crescimento avaliados, mas o ACD-B aparentemente foi o pior na avaliação, porque produziu menor contagem celular e de fatores de crescimento quando comparados aos demais anticoagulantes (GIRALDO; ÁLVAREZ; CARMONA, 2015).

3.5 Células-tronco adultas

O principal objetivo da medicina regenerativa, é obter a regeneração dos tecidos e evitar a reparação (cicatrização) dos mesmos (CARMONA; LOPEZ, 2011). As células-tronco são alvo de diversos estudos em regeneração tecidual, pois são capazes de evitar a cicatrização de tecidos lesionados, permitindo seu retorno às suas funções desempenhadas anteriormente à ocorrência de lesão. As células-tronco podem ser classificadas como embrionárias (CTE) ou adultas (CTA). As CTEs são derivadas da massa celular interna do blastocisto cinco dias após fertilização (em humanos) e podem ser expandidas em cultura. As CTAs, no entanto, são obtidas após a fase embrionária (de blastocisto), sejam elas provenientes de organismo adulto, recém-nascido ou do próprio feto (TORRES, 2009).

3.6 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSCs), isoladas e expandidas *in vitro* pela primeira vez na medula óssea por Friedenstein e cols. (1966), foram caracterizadas por sua capacidade de formar colônias aderentes *in vitro*, as quais, fenotipicamente, assemelham-se a unidades formadoras de colônia de fibroblastos (UFC).

As células-tronco possuem quatro qualidades que as tornam atraentes para a medicina regenerativa e seu uso clínico, tais como: quando aplicadas por via intravenosa, elas se ligam aos tecidos lesionados; podem se diferenciar em diversos tipos celulares; secretam moléculas bioativas, capazes de estimular a recuperação de células lesionadas e inibir a inflamação e ainda por possuírem propriedades imunomoduladoras (KIM.; CHO, 2013).

As MSCs podem ser obtidas a partir da medula óssea, do sangue do cordão umbilical e do tecido adiposo, onde sua coleta é mais facilmente realizada, além da obtenção de maior número de células quando comparado à medula óssea, constituindo-se num procedimento de execução simples e com resultados satisfatórios. A fração estromal do tecido adiposo é constituída de pré-adipócitos, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e também por MSCs, que quando apropriadamente estimuladas, dão origem a osso, cartilagem e adipócitos (CLAUDIO-da-SILVA et al, 2009). A partir da descoberta de que as MSCs derivam do tecido perivascular, dos pericitos, ocorreram mudanças significativas em como elas se originam e sua função *in vivo* durante a resposta do corpo às injúrias e sua demanda por regeneração/repouso. Após a lesão tecidual, os pericitos são liberados de sua associação com a lâmina basal do vaso sanguíneo situado no local de lesão ou inflamação e essa célula agora, funciona como uma MSC, com um fenótipo de

MSC ativado, que é a chave nas alterações químicas que ocorrem nesse microambiente. Essa é a primeira linha de defesa contra reações imunes na região da lesão e áreas vizinhas e em coordenação com essa defesa, as MSCs iniciam a secreção de moléculas (fatores) que iniciam o processo de regeneração tecidual (não o reparo) da lesão e regiões vizinhas à mesma (CAPLAN, 2015). Uma vez no local da injúria, as MSCs, promovem a inibição da formação de fibrose (cicatriz), inibem a apoptose por isquemia tecidual, promovem a angiogênese e a mitose celular, todas essas ações mediante a produção de fatores tróficos (CAPLAN; DENNIS, 2006).

As técnicas utilizadas para obtenção de MSCs equinas são: aspirado de medula óssea realizado no esterno ou na tuberosidade coxal, que pode ser cultivado para obtenção das MSCs (MO-MSCs) ou imediatamente processadas para obtenção do concentrado de medula óssea (CMO), que pode ser aplicado no paciente sem o prévio cultivo celular; coleta de tecido adiposo da região da base da cauda, que pode ser cultivado para obtenção das células-tronco adiposas (Ad-MSCs) ou por processo de digestão ser obtida uma população celular heterogênea nomeada células-tronco derivadas da fração vascular do tecido adiposo (Ad-MSCs/FVA) (SCHNABEL et al., 2013).

Células-tronco são rotineiramente empregadas na medicina regenerativa equina, em tratamentos de lesões tendíneas discretas sendo aplicadas diretamente no local da lesão com injeção guiada pela ultrassonografia (GODWIN et al, 2012), também por perfusão regional intravenosa em casos de múltiplas lesões tendíneas ou ligamentares na mesma estrutura lesionada (SOLE et al, 2012). Muitos protocolos de tratamento são baseados numa aplicação única de células-tronco, mas é importante salientar a necessidade do exame físico e ultrassonográfico no acompanhamento do tratamento, pois pode ser necessário outra aplicação se em 30 dias após a primeira injeção, não ocorrer melhora de no mínimo 50% nos graus de claudicação e achados ultrassonográficos, sendo também de grande importância o protocolo de reabilitação para o sucesso do tratamento (SCHNABEL et al., 2013).

A busca atual por fármacos ou compostos biológicos com efeitos regenerativos tem causado a substituição de terapias com efeitos sintomáticos, como o emprego de anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais, aplicações de ácido hialurônico, entre outros por tais compostos. (CARMONA; LOPEZ, 2011).

3.7 Combinação do uso de PRP e MSCs

O uso da associação de PRP e MSCs tem-se mostrado promissor na prática clínica em diferentes tipos de lesões musculoesqueléticas e tem se observado efeitos aditivos das técnicas na regeneração tecidual dessas lesões. Assim, as pesquisas buscam respostas quanto à interação do PRP e das MSCs.

A quimiotaxia e a quimiocinese de células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea equina foram maiores no concentrado de medula óssea e no PRP com alto número de leucócitos que no PRP com baixo número de leucócitos, entretanto, os 3 agentes biológicos recrutaram o mesmo número de células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea equina, sugerindo que as diferenças entre os efeitos regenerativos, como os fatores de crescimento devem ser fortemente considerados para a escolha de um agente biológico para tratamento de lesões musculoesqueléticas (HOLMES et al, 2018).

A indução da linhagem condrogênica pode ser atingida a partir do uso de MSCs e quando empregado PRP e MSCs, ocorreu melhora da funcionalidade e sustentabilidade

de articulações lesionadas em cavalos com média a moderada claudicação, devido à osteoartrite na articulação metacarpo-falangeana em até doze meses após o tratamento (BROECKX et al., 2014).

A associação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (AdMSCs/FVA) com o PRP mostrou sucesso na reabilitação de tendinites em 14 de 16 cavalos que mostraram recuperação funcional e retorno às suas atividades. As AdMSCs/FVA foram inoculadas no tendão lesionado após sua dispersão em PRP, um arcabouço fisiológico que teve papel importante no desenvolvimento e manutenção das células nos sítios de lesões, contribuindo para o processo de reparação tecidual (DEL BUE et al., 2008). Em outro estudo com nove cavalos atletas, em que se realizou a terapia combinada de AdMSCs/FVA e PRP, os achados ultrassonográficos das lesões tendíneas após o tratamento combinado, demonstraram sinais indicativos de reparação tecidual morfológica comparável, em termos de tamanho e alinhamento das fibras tendíneas, com o tecido saudável (GÜERCIO et al., 2015).

É comum na prática clínica para o tratamento de tendinites, o uso da aplicação do PRP assim que se estabeleceu a lesão com concomitante realização do aspirado de medula-óssea e em uma segunda etapa do tratamento, com injeção de MO-MSCs e PRP após o cultivo celular do aspirado. Células-tronco e PRP não devem ser misturados numa mesma seringa, pois o PRP pode formar um coágulo que não permite a injeção, para evitar esse problema, injeta-se o PRP e a MO-MSCs sequencialmente, usando a mesma agulha, mas não misturados juntos antes da aplicação (SCHNABEL et al., 2013).

A avaliação *in vitro* da associação de lisado de plaquetas (PL), que se difere do PRP pela presença do plasma no mesmo e AdMSC, mostrou que o lisado de plaquetas foi capaz de promover a proliferação de AdMSC, provavelmente como consequência de seu alto teor de fatores de crescimento e diferenciação, indicando seu potencial como um suplemento promotor de crescimento para MSC equinas como substituto do soro fetal bovino ou equino (DEL BUE et al., 2008).

Mesmo o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) não sendo tão concentrado em plaquetas, ele foi capaz de sustentar efetivamente o crescimento e a sobrevivência de células-tronco derivadas de tecido adiposo. Como subproduto, pode ser útil em aplicações onde é desejável cultivar células autólogas para aplicações terapêuticas. Usando PPP, seria possível cultivar células-tronco derivadas de tecido adiposo sem soro de origem bovina ou outras fontes xenogênicas e, portanto, nos fornecer a oportunidade para produtos de engenharia de tecidos que podem ser usados em pacientes sem o risco de xenoimunização de proteínas bovinas acumuladas ou contaminação por príons (SCHALLMOSER et al., 2007) (TAVAKOLINEJAD et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de sangue para obtenção do PRP

O sangue para obtenção do PRP foi coletado de seis equinos, provenientes do Jockey Club Brasileiro (Rio de Janeiro-RJ), da raça Puro Sangue Inglês, hípidos, com idade entre 3 a 5 anos de idade, machos e fêmeas. Os animais foram previamente submetidos a exame clínico (anamnese, exame de mucosas, frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de perfusão capilar, ausculta intestinal, respiratória e cardíaca) e avaliação hematológica (hemograma completo) previamente à coleta, para então serem qualificados para inclusão no experimento.

Foram coletados cerca de 45 ml de sangue total na veia jugular de cada animal, após antissepsia da pele. Para a coleta foram utilizados tubos para coleta de sangue a vácuo com 0,5ml do anticoagulante citrato de sódio.¹

4.2 Definição do protocolo de obtenção de PRP

O PRP foi obtido (Figura 1), após adaptações de protocolos de duas centrifugações descritos por Argüelles et al, (2006), Amable et al, (2013), DeRossi et al, (2009) e Venddramin et al, (2006). A partir das frações obtidas nas variações da técnica, quantificou-se o número de plaquetas e de leucócitos através do contador de células², no Laboratório de Análises Clínicas do Jockey Club Brasileiro (LACVET) de onde obtivemos o protocolo número 4 incluído no estudo³. O protocolo 6 foi determinado após execução do primeiro estudo, quando resolvemos combinar as técnicas de número 1 e 2, a fim de obtermos maior concentração plaquetária e menor leucocitária, assim como é preconizado na literatura como sendo o protocolo ideal para obtenção de PRP.

Cada protocolo foi repetido cinco vezes. Em cada repetição, o sangue utilizado era de um único doador para a execução de todos os protocolos estudados.

¹ Vacuplast

² HORIBA ABC Vet/ ABX Diagnostics

³ Fornecido pela médica-veterinária responsável técnica do LACVET, Rosalie Joslin Kowal

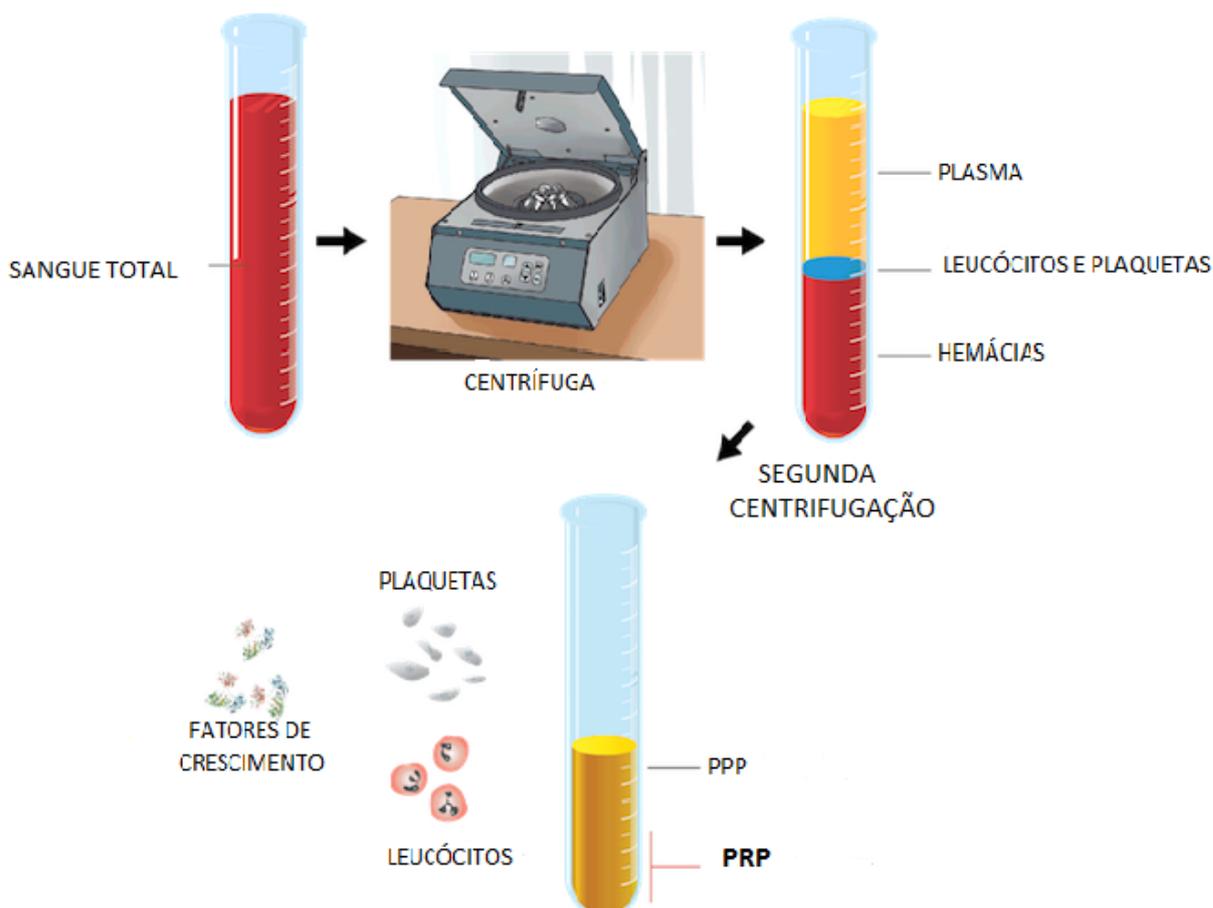


Figura 1 Ilustração das etapas para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), utilizadas neste experimento. Fonte: <http://hardwickclinic.co.uk/treatments/prp/>

O concentrado de plaquetas que obtivemos após as duas centrifugações estipuladas em cada protocolo, foi ressuspensionado em 8% do volume inicial de sangue total em Phosphate Buffered Saline/ Tampão Fosfato-Salino (PBS). Toda manipulação dos produtos obtidos após cada centrifugação, foi realizada em capela de fluxo laminar, sob condições ideais para evitar a contaminação de quaisquer tipos de contaminantes externos.

Toda execução dos protocolos foi realizada no laboratório de Biologia da Matriz Extracelular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LBMEC/ICB/UFRJ).

Na tabela a seguir (Tabela 1), estão demonstrados os tempos de centrifugação e velocidades estudados para obtenção do PRP equino.

Tabela 1 Protocolos estudados para obtenção do PRP (Plasma Rico em Plaquetas)

Protocolo	Força (g) da 1ª centrifugação	Tempo da 1ª centrifugação (minutos)	Força (g) da 2ª centrifugação	Tempo da 2ª centrifugação (minutos)	Autores
1	114	5	247	5	(ARGÜELLES et al., 2006)
2	293	5	697	16	(AMABLE et al., 2013)
3	293	5	624	5	(DEROSSO et al., 2009)
4	203	10	400	10	LACVET
5	293	10	660	10	VENDDRAMIN et al., 2006)
6	114	5	697	16	(Protocolo proposto)

4.3 Análise hematológica

Uma amostra de sangue total foi coletada em tubo a vácuo com EDTA⁴ e destinada à análise hematológica para conhecimento da linha de base leucocitária e plaquetária dos animais.

A análise hematológica foi realizada através do contador de células¹ no Laboratório de Análises Clínicas do Jockey Club Brasileiro (LACVET).

4.4 Coleta de tecido adiposo equino, isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais (MSCs) obtidas a partir do tecido adiposo

Cinco equinos da raça Puro Sangue Inglês, provenientes do Jockey Club Brasileiro de ambos os sexos, de dois a cinco anos de idade, foram sedados com cloridrato de xilazina 10%⁵ (1 mg/Kg, via intravenosa), mantidos em estação num tronco para contenção.

O tecido adiposo para obtenção das MSCs, foi coletado da região localizada sobre a superfície dorsal do músculo glúteo, na base da cauda próximo à inserção da mesma. Após a tricotomia e antisepsia da região, infiltrou-se pele e tecido subcutâneo com cloridrato de lidocaína 2%⁶. Realizou-se uma incisão de aproximadamente 5 cm de comprimento e divulsão do tecido subcutâneo, que permitiu a visualização do tecido adiposo entre a pele e a musculatura para a coleta do mesmo. Aproximadamente 5 ml de tecido adiposo foi coletado e estocado em um tubo cônico de 50 ml contendo meio RPMI⁷, onde a amostra foi totalmente imersa e mantida sob refrigeração num recipiente

⁴ BD Vacutainer

⁵ Xilazina 10% Venco

⁶ Xylestesin 2%

⁷ RPMI-1640⁷ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)

térmico até ser encaminhada ao laboratório para o processamento da amostra. A pele foi suturada com fio nylon 0⁸ com pontos simples separados (RIBEIRO et al, 2013). A região da base da cauda, foi o local de coleta por ser uma área de fácil acesso com ausência de vasos importantes e ótima visualização e obtenção de tecido adiposo (Figura 2) (DE MATTOS CARVALHO et al, 2009). Uma dose única de 1,1mg/kg de peso do anti-inflamatório não esteroidal flunixin-meglumine⁹ foi aplicada por via intravenosa para efeitos anti-inflamatórios.



Figura 2 Coleta de tecido adiposo equino da região glútea para obtenção de células tronco (Fonte: arquivo pessoal)

Para o isolamento da fração vascular do tecido adiposo foram realizadas 3 lavagens da amostra do tecido adiposo com PBS em tubos Falcon para eliminar as células vermelhas (AMABLE et al, 2013). Para o isolamento da fração vascular estromal, as amostras de tecido adiposo foram submetidas a picotes do tecido em fragmentos de 1 a 2 mm, usando lâmina de bisturi nº 15¹⁰ (RIBEIRO et al, 2013) e ação digestiva da colagenase tipo IA¹¹ 0,1% p/v em meio de cultivo¹², pré-incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, seguido de 15 minutos em banho maria a 37° C com agitação (AMABLE et al, 2013). Efetuou-se a neutralização do agente proteolítico adicionando 1 volume de DMEM suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino¹³ e posteriormente

⁸ Shalon

⁹ Flunixin Injetável Chemitech

¹⁰ Solidor

¹¹ Sigma, C9891

¹² Dubelcco' s Modified Eagle Medium - DMEM

¹³ vitroccl

realizamos a filtragem com cell strainer 10 micras¹⁴. A suspensão de células foi centrifugada a 697xG durante 10 minutos e o pellet de células obtido, foi ressuspensão em DMEM¹⁵ suplementado com 10% de soro fetal bovino⁵ (DF10) e plaqueado em garrafas de cultivo com concentração de 2g de tecido inicial para cada 25 cm² de área de cultivo (AMABLE et al, 2013).

As garrafas de cultivo celulares foram mantidas em temperatura de 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana e quando a confluência máxima de 75% foi atingida, as células aderentes foram soltas usando uma solução de tripsina¹⁶ 0,125% PBS EDTA tetrassódico 0,02% em PBS e em seguida quantificadas em Câmara de Neubauer através da técnica de exclusão de células não viáveis coradas pelo corante azul de tripan¹⁷ 0,4% em PBS (“dye exclusion method”), a fim de obtermos o total de células viáveis (AMABLE et al, 2013). Após esse processo, as MSCs foram criopreservadas em botijão de nitrogênio líquido em pellets contendo 5 milhões de células, que posteriormente foram colocadas em novo cultivo celular e quando atingiram a confluência máxima de 75%, eram tripsinizadas como descrito acima e mantidas em cultivo até obtermos o número final de 20 milhões de células para serem utilizadas no teste de proliferação celular.

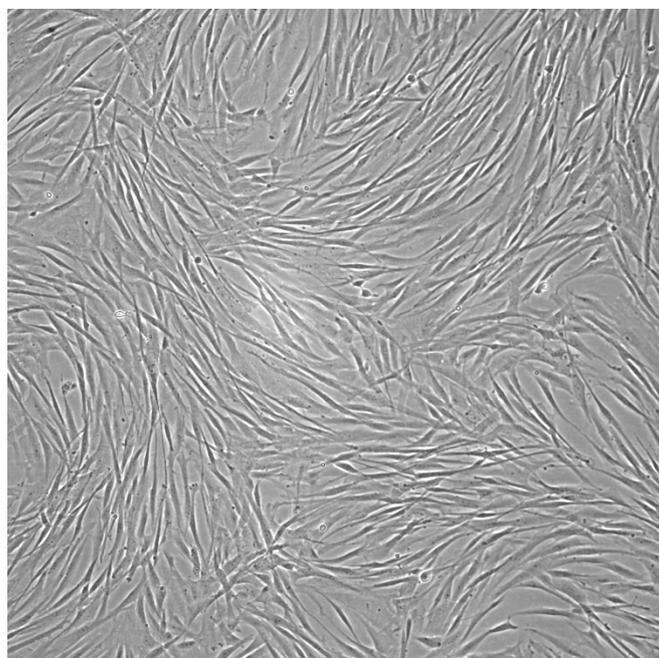


Figura 3 – Células-tronco mesenquimais obtidas a partir de tecido adiposo equino. Fotografia de microscópio óptico invertido, aumento de 100 X. (Fonte: arquivo Cellen)

4.5 Cultivo de PRP com células mesenquimais equinas- Teste de proliferação celular

Avaliou-se a proliferação celular de MSCs cultivadas em conjunto com o protocolo de obtenção de PRP que proporcionou a obtenção de maior concentração plaquetária. Os cultivos celulares foram mantidos em garrafas de cultivo celular com volume de 5 ml, em

¹⁴ CLS431752 Sigma

¹⁵ Vitrocell

¹⁶ SIGMA

¹⁷ Azul de tripan Vetec

temperatura de 37°C e 5% de CO₂, durante dez dias até obtermos o total de 20 milhões de células.

Realizamos o estudo com três diferentes concentrações de PRP e de PPP, que foram respectivamente de 2; 5 e 10%. A concentração de PRP e PPP nos cultivos foi determinada em v/v e os valores escolhidos foram determinados em razão de normalmente utilizar-se em meios de cultivo de MSCs, como suplemento, a concentração de soro fetal bovino a 10%, sendo assim, abordamos três concentrações diferentes de PRP tendo como valor máximo 10%. Estabeleceu-se ainda os grupos de Controle Positivo (CP) e Controle Negativo (CN).

Os grupos foram assim denominados:

- 1- Controle Positivo (CP)- meio DF 10 sem cálcio e 2 X 10⁵ MSCs
- 2- Controle Negativo (CN)- meio DMEM com cálcio e 2 X 10⁵ MSCs
- 3- Grupo 1- DMEM sem cálcio com 2% de PRP e 2 X 10⁵ MSCs
- 4- Grupo 2- DMEM sem cálcio com 5% de PRP e 2 X 10⁵ MSCs
- 5- Grupo 3- DMEM sem cálcio com 10% de PRP e 2 X 10⁵ MSCs
- 6- Grupo 4- DMEM sem cálcio com 2% de PPP e 2 X 10⁵ MSCs
- 7- Grupo 5- DMEM sem cálcio com 5 % de PPP e 2 X 10⁵ MSCs
- 8- Grupo 6- DMEM sem cálcio com 10% de PPP e 2 X 10⁵ MSCs

DF 10 constitui-se num meio já estabelecido para cultivo celular, composto de meio DMEM (Dubelcco' s Modified Eagle Medium) acrescido de 10 % de soro fetal bovino, por isso foi estabelecido controle positivo. O controle negativo foi estabelecido como o meio DMEM com cálcio, sem o acréscimo de soro fetal bovino.

Nos grupos onde o PRP e o PPP foram usados como suplementos dos meios de cultivo, utilizou-se o DMEM sem cálcio para evitar a formação de rede de fibrina, que inviabilizava os cultivos.

Toda execução dos cultivos celulares foi realizada no laboratório de Biologia da Matriz Extracelular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LBMEC/ICB/UFRJ).

4.6 Estatística

Os dados brutos foram testados pelo método estatístico Shapiro-Wilk e em seguida, os dados foram normalizados aplicando-se transformação logarítmica (**Log₂**), em seguida analisados pelo teste ANOVA e teste de Turkey. Os dados não normais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis com $\alpha = 5\%$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Definição do protocolo de obtenção do PRP

A partir da avaliação de seis protocolos de obtenção do PRP, cinco utilizados em outros laboratórios e um protocolo proposto pelo presente estudo após observação das diferentes concentrações plaquetárias e leucocitárias em cada fase de obtenção do PRP nos cinco protocolos já descritos, obtivemos os seguintes resultados referentes às concentrações plaquetárias e leucocitárias (Tabela 2):

Tabela 2 - Concentrações plaquetárias e leucocitárias médias dos protocolos de obtenção do PRP

Protocolo	Conc plaquetária	Conc leucocitária	Autores
1	479.000/ mm ³	467/ mm ³	(ARGÜELLES et al., 2006)
2	644.000/ mm ³	333/ mm ³	(AMABLE et al., 2013)
3	512.000/mm ³	934/ mm ³	(DEROSSO et al., 2009)
4	467.000/ mm ³	1.296/ mm ³	Laboratório JCB-LACVET
5	376.000/ mm ³	69/ mm ³	(VENDDRAMIN et al., 2006)
6	1.173,000/mm ³	600/ mm ³	(Protocolo proposto)

Comparando a capacidade de concentração plaquetária nos diferentes protocolos de PRP, em relação à concentração plaquetária basal, observamos o seguinte gráfico (Figura 3):

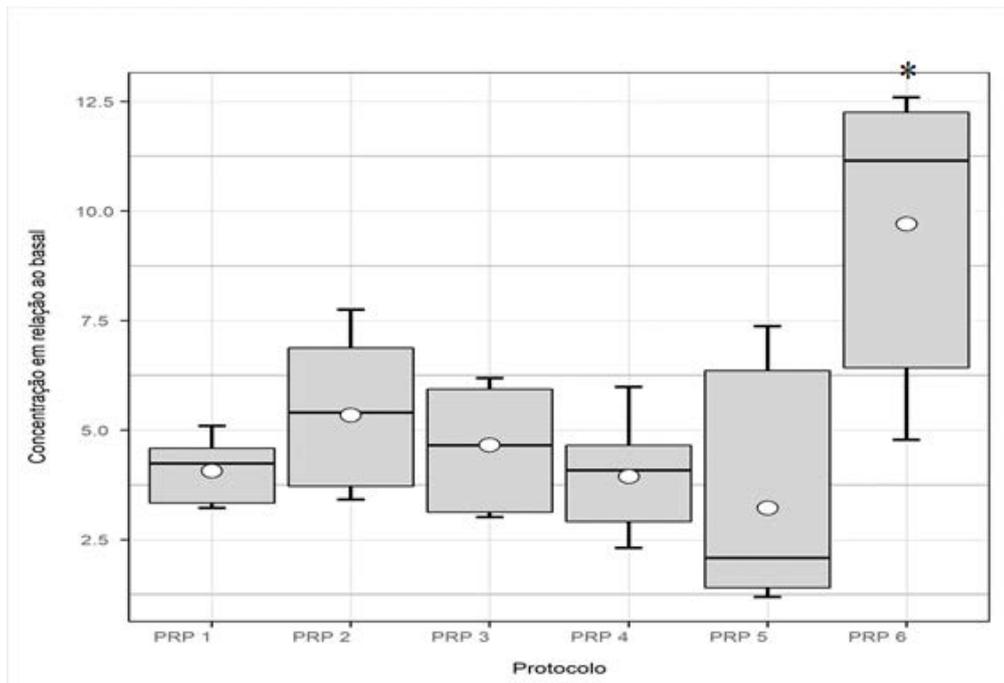


Figura 3 Capacidade de concentração de plaquetas dos protocolos testados para obtenção do PRP, em relação à média basal de plaquetas. Boxplot com * indica diferença estatisticamente significativa entre os protocolos (Valor $P=0,000025456$).
Teste Kruskal-Wallis.

Em relação à contagem leucocitária nos diferentes grupos, temos o gráfico abaixo (Figura 4), que indica a concentração leucocitária nos diferentes grupos de PRP:

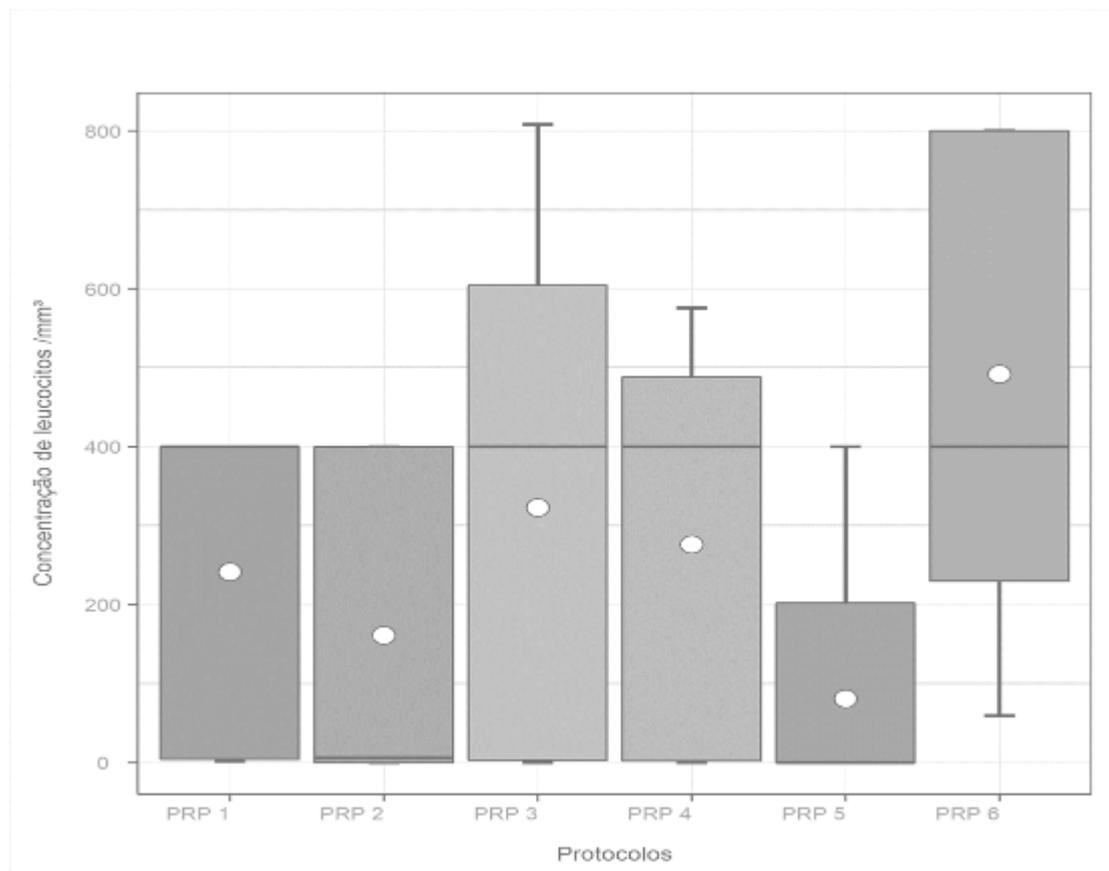


Figura 4 Concentração de leucócitos por mm^3 nos diferentes protocolos de obtenção de PRP. Valor $P=0,150369$. Teste Kruskal-Wallis.

A partir dos resultados iniciais de cinco protocolos de obtenção de PRP já descritos na literatura, nos foi possível propor um novo protocolo e assim avaliamos seis protocolos para obtenção de PRP equino. O parâmetro de concentração plaquetária final no PRP, foi o principal em nosso estudo, permitindo em nosso trabalho, elegermos o melhor protocolo dentre os seis estudados, aquele que obtivesse maior concentração plaquetária final.

O PRP humano deve conter em média, cinco vezes o valor de plaquetas a partir dos níveis fisiológicos, (MARX et al, 2004). O protocolo 6 produziu concentração de plaquetas de $1.173,000/\text{mm}^3$, sendo 10,2 vezes maior que o valor da plaquetometria basal de $115.000/\text{mm}^3$.

Em relação à concentração leucocitária, o protocolo 6 mostrou perfil similar aos demais, não apresentando diferença significativa dos demais protocolos estudados. A concentração leucocitária no PRP, é um ponto de discussão comum sendo abordado com recorrência na literatura pertinente. Carmona et al (2005), descrevem que concentrados plaquetários com maiores concentrações de leucócitos, produziram reações inflamatórias nos primeiros dias após a aplicação intra-articular em cavalos com degeneração articular, provavelmente devido ao efeito quimiotático dos leucócitos presentes nesse concentrado. Argüelles et al (2005), não encontraram reações inflamatórias após aplicações de similar concentrado plaquetário em tecidos moles. Argüelles et al (2006), relatam que essa observação clínica pode sugerir que os componentes celulares de concentrados de plaquetas de equinos podem ter uso terapêutico modificado dependendo do tipo de lesão a ser tratada.

Em consideração ao uso de protocolos de medicina humana para obtenção de PRP equino, Argüelles et al (2006), descrevem que protocolos humanos não devem ser adotados para cavalos, pois o efeito da sedimentação no citoplasma das plaquetas entre essas espécies, é diferente. O protocolo 2, que é de medicina humana, teve como resultado em nossas condições de estudo, uma concentração de 5,6 vezes o valor médio basal de 115.000/ mm³, podendo desta forma ser utilizado em medicina equina de forma eficiente quando o único parâmetro adotado é a contagem plaquetária final do PRP.

Apenas o protocolo 5 em nossas condições de estudo, não obteve a concentração plaquetária final nos níveis recomendados de 5 vezes o valor basal em humanos (MARX, 2004). Vendramin et al (2006), relataram que alcançaram concentração plaquetária de 4,5 vezes o valor basal médio, entretanto, em nossas condições de estudo, conseguimos com adaptação da técnica descrita pelos autores, o valor de 3,3 vezes o valor basal plaquetário médio de 115.000/ mm³.

O protocolo de número 3 em nosso trabalho, foi adaptado com redução dos tempos de centrifugação empregados em relação ao protocolo original de De Rossi et al (2009). Reduzimos os tempos de centrifugação pela metade e observamos como resultado final uma concentração plaquetária de 4,5 vezes o valor médio basal de nosso estudo. De Rossi et al (2009), obtiveram concentração plaquetária de 4 vezes o valor basal em seu estudo. Diante desse resultado, podemos sugerir que o tempo de centrifugação é um importante parâmetro nas técnicas de obtenção de PRP e pode determinar variações na concentração plaquetária final do PRP obtido.

O protocolo 4, utilizado na rotina do LACVET, apesar de não possuir referências anteriores na literatura, foi incluído em nosso trabalho, pois acreditamos ser relevante seu estudo, visto ser um protocolo adotado em um laboratório de relevância na medicina equina de cavalos de corrida em especial. Obtivemos nesse protocolo, concentração de 4,1 vezes o valor plaquetário basal médio, sendo considerado apropriado seu uso para obtenção de PRP equino.

5.2 Teste de Proliferação de MSCs com diferentes concentrações de PRP e PPP

A caracterização das MSCs em medicina veterinária, baseia-se nos mesmos critérios adotados em medicina humana, sendo eles, sua capacidade de proliferação como células aderentes, sua capacidade de diferenciar-se em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica e seu imunofenótipo (MARX et al, 2015). Também se sabe que o cultivo de MSCs com outros produtos, afeta seu potencial de diferenciação (CASTRO et al, 2014) e por acharmos de extrema importância a compreensão dos possíveis efeitos *in vitro* do PRP e do PPP sobre as MSCs, estudamos o efeito dos mesmos sobre a proliferação celular das MSCs.

Após o cultivo de MSCs em conjunto com diferentes concentrações de PRP e PPP durante dez dias, avaliamos em câmara de Neubauer a contagem celular final de MSCs e assim concluímos como a concentração de PRP e PPP influenciou a proliferação de tais células *in vitro* quantitativamente (Tabela 3) e qualitativamente (Figura 7).

Somente foi possível quantificar o total de células nos grupos: controle positivo (CP)- DF 10, 2 % de PRP, 5 % de PRP e 2 % de PPP, os demais grupos (controle negativo (CN), 10% de PRP, 5 % de PPP e 5 % de PPP) não apresentaram proliferação celular suficiente para contagem em câmara de Neubauer.

Tabela 3 - Número de MSCs em cultivo com diferentes concentrações de PRP e PPP

Grupo	Média do número de MSCs /(Log ₂)	Teste de Tukey
CP	1,21 x 10 ⁶ (19,3)	a
PRP 2%	1,99 x 10 ⁵ (16,2)	ab
PPP 2 %	3,34 x 10 ⁴ (14,3)	ab
PRP 5 %	2,36 x 10 ⁴ (13,8)	b

Dados convertidos no log base 2 (Parênteses) para normalização e posterior análise de variância, teste de Tukey, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. Valor P = 0,029426016

Nossos resultados demonstraram que o acréscimo de PRP nas concentrações de 2 e 5 % e de PPP a 2%, não inibiram a proliferação celular das MSCs. A proliferação das MSCs exibida pelo acréscimo de PRP e PPP na concentração de 2 % foi estatisticamente comparável à proliferação observada no grupo controle positivo, onde sabidamente a proliferação celular é estimulada, ou seja, os grupos CP, PRP e PPP na concentração de 2% foram quantitativamente semelhantes estatisticamente.

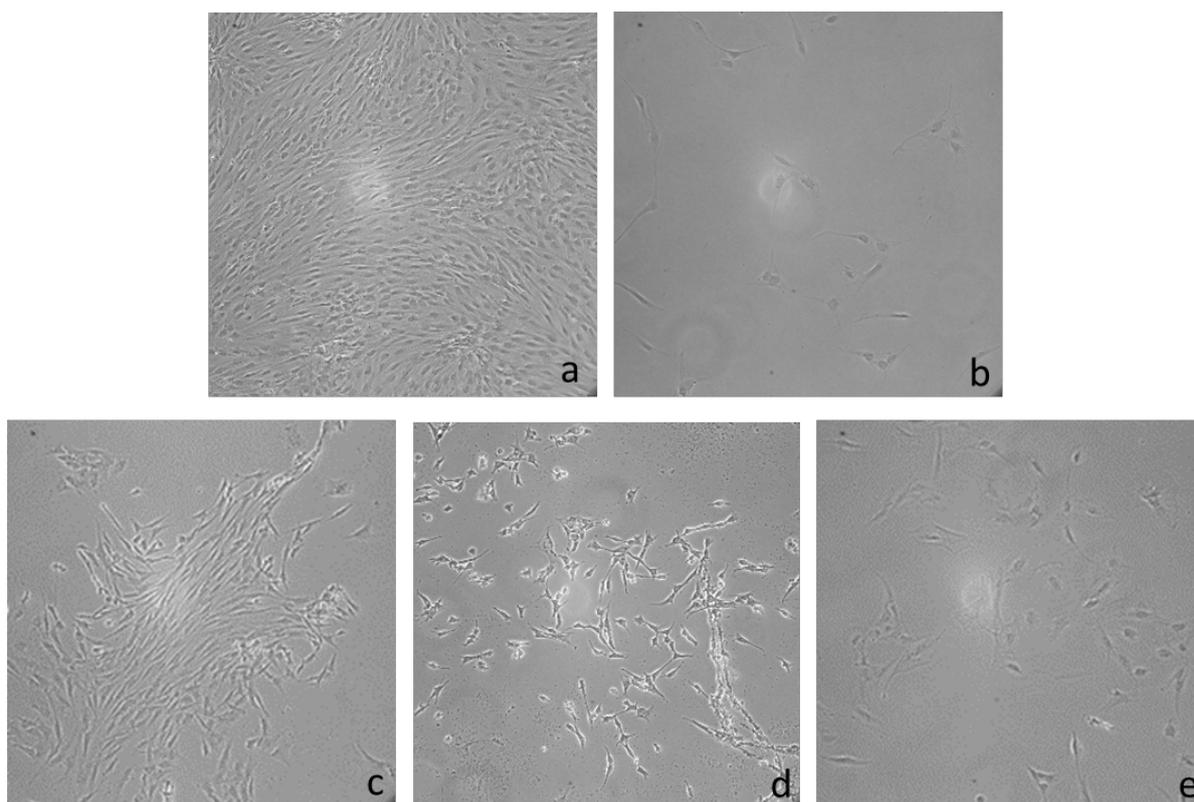


Figura 5 Cultivo de células tronco mesenquimais (MSCs). Controle positivo “a”. Controle negativo “b”. Cultivo de MSCs com 2 % de plasma rico em plaquetas (PRP) “c”. Cultivo de MSCs com 5 % de plasma rico em plaquetas (PRP) “d”. Cultivo de MSCs com 2 % de plasma pobre em plaquetas (PPP) “e”.

Observamos que inicialmente o Grupo PRP nas concentrações de 5 e 10% exibiam maior proliferação celular das MSCs ao visualizarmos os meios de cultivo ao

microscópio. Essa proliferação diminuía de forma considerável a partir da segunda troca de meio com notada redução de sua morfologia fibroblastoide. O cultivo das MSCs com PRP a 2 % demonstrou não alterar a morfologia celular inicial, indicando que este meio além de não inibir a proliferação, também foi capaz de manter a sua morfologia.

Nos cultivos com PRP a 5% e PPP a 2 %, as células perdiam suas características morfológicas iniciais, demonstrando alteração fenotípica, de fibroblastoide, para células aparentemente de maior área citoplasmática, sugerindo que ocorreram alterações de morfologia, que podem estar associadas à diminuição da proliferação celular *in vitro*, assim como recentemente, Yang et al (2018), observaram o comprometimento da capacidade replicativa de células-tronco mesenquimais conforme aumentou-se o número de passagens das mesmas, com perda de suas características fibroblastoide inicial, tornando-se mais achatadas e maiores nas últimas passagens.

Amable et al (2014), estudaram diferentes concentrações de PRP humano (de 1 até 50 % de PRP) sobre a proliferação celular de células-tronco mesenquimais. O PRP na concentração de 10% obteve o efeito máximo no aumento da proliferação celular. Concluíram também, que células mesenquimais estromais derivadas de diversos tecidos, possuem propriedades diferentes quanto à diferenciação, angiogênese, inflamação e potencial de remodelamento da matrix extracelular quando cultivadas em meio com suplementação de PRP. Nosso estudo em medicina equina, demonstrou que a concentração de 10% de PRP não foi capaz de estimular a proliferação celular das MSCs, impossibilitando inclusive a contagem de células ao final do experimento nessa concentração de PRP equino.

Naskou et al (2018), obtiveram após o cultivo de MSCs com lisado de plaquetas, proliferação celular comparável à obtida com soro fetal bovino utilizado rotineiramente com a finalidade de suplementar o meio de cultivo de MSCs e sugeriram inclusive, que o soro fetal bovino poderia ser substituído pelo lisado de plaquetas.

Stessuk et al (2015), avaliaram a proliferação celular de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSCs) sob influência de diferentes concentrações de PRP e observaram que a concentração de PRP é inversamente proporcional à proliferação celular de ADSCs, ou seja, menores concentrações de PRP determinaram maior proliferação celular. Os resultados obtidos em medicina humana por esses autores, se assemelham aos nossos em medicina equina, entretanto, os mesmos obtiveram melhor proliferação no grupo PRP 10% e trabalharam com concentrações de PRP até 100%, em nosso estudo, a proliferação celular foi inibida na concentração de 10% de PRP e este foi o valor máximo de concentração por nós avaliada. A diferença entre os estudos que pode justificar tal diferença, refere-se ao tempo escolhido para os ensaios, que em nosso caso, foi de dez dias de cultivo e pelos pesquisadores acima, após dois dias de cultivo. O cultivo em dez dias justifica-se pela rotina de aplicação das MSCs para seu uso *in vivo*.

Felthaus et al (2017), em seu estudo sobre diferentes concentrações de PRP e de PPP sobre a vitalidade e diferenciação de células-tronco autólogas derivadas de tecido adiposo, observaram que tanto o PRP como o PPP poderiam ser usados pra expandir as células-tronco sem aditivos xenogênicos na cultura das células e que o PRP na concentração de 20 % tem efeitos inibitórios. Também descrevem que o PPP embora possua muito menos plaquetas que o PRP, ainda é um suplemento valioso para promover o crescimento e diferenciação celular sem aditivos xenogênicos, além de ser obtido em

um volume maior do que o PRP. Em nossa avaliação, obtivemos resultados semelhantes, tendo sido o PPP também capaz de promover a proliferação celular.

A continuidade de nossos estudos pode esclarecer algumas perguntas sobre o uso combinado de PRP e MSCs em equinos. Realizamos, a avaliação *in vitro* do efeito do PRP sobre a proliferação celular de MSCs, mais abordagens da combinação PRP e MSCs podem elucidar melhor tal associação e contribuir para o uso clínico direcionado e mais eficiente dessa combinação.

6 CONCLUSÃO

O protocolo de obtenção de PRP proposto nesse estudo, foi mais eficaz em concentrar plaquetas que os demais protocolos estudados.

Os resultados dos protocolos para obtenção de PRP de outros estudos, não se repetiram nas nossas condições de estudo, indicando a necessidade de adequação de um protocolo próprio para cada laboratório.

As concentrações de PRP e de PPP no meio de cultivo celular, influenciaram a taxa de proliferação das células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo equino.

O PRP na concentração de 2%, não inibiu a proliferação celular e nem prejudicou a sua morfologia, sendo esses resultados comparáveis aos obtidos no grupo controle positivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMABLE, P. R.; TEIXEIRA, M. V. T.; CARIAS, R. B. V.; GRANJEIRO, J. M.; BOROJEVIC, R. Identification of appropriate reference genes for human mesenchymal cells during expansion and differentiation. **PLoS one**, v. 8, n. 9, 2013.
- AMABLE, P. R.; CARIAS, R. B. V.; TEIXEIRA, M. V. T.; DA CRUZ PACHECO, I.; CORRÊA DO AMARAL, R. J. F.; GRANJEIRO, J. M.; BOROJEVIC, R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 3, p. 67, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3706762&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- AMABLE, P. R.; TEIXEIRA, M. V. T.; CARIAS, R. B. V.; GRANJEIRO, J. M.; BOROJEVIC, R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- ANITUA, E.; ALKHRAISAT, M. H.; ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 157, n. 1, p. 29–38, 10 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911004810>>. Acesso em: 7 abr. 2016.
- ARGUELLES, D., CARMONA, J.U., CLIMENT, F, PRADES.M. Platelet rich plasma as a treatment of tendon and ligament injuries in the horse. **Proceedings of the 14th Annual Scientific Meeting European College of Veterinary Surgeons**, p. 217–222, 2005.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTÍNEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 237–245, 2006.
- BROECKX, S.; ZIMMERMAN, M.; CROCETTI, S.; SULS, M.; MARIËN, T.; FERGUSON, S. J.; CHIERS, K.; DUCHATEAU, L.; FRANCO-OBREGÓN, A.; WUERTZ, K.; SPAAS, J. H. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: A preliminary study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2014.
- CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. **Stem Cells International**, v. 2015, n. Article ID 628767, p. 6, 2015.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076–1084, 2006.
- CARMONA, J.U., ARGUELLES, D., CLIMENT, F, PRADES, M. Report of the intraarticular treatment with platelet rich plasma in 7 horses with joint disease. **Proceedings of the 14th Annual Scientific Meeting of European College Veterinary Surgery**, p. 68–71, 2005.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Use of autologous platelet concentrates obtained by the tube method as a treatment for arthropathies in horses. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 41, p. 175–179, 2009. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

70349770899&partnerID=40&md5=68740f3df76a72a8fe991e8e346c64e6>.

- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C. Tendinopatía del tendón flexor digital superficial y desmopatía del ligamento suspensorio en caballos: Fisiopatología y terapias regenerativas. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 43, n. 3, p. 203–214, 2011.
- CASTRO, F. O.; TORRES, A.; CABEZAS, J. Research in Veterinary Science Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 95–101, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.005>>.
- CIVININI, R.; NISTRI, L.; MARTINI, C.; REDL, B.; RISTORI, G.; INNOCENTI, M. Growth factors in the treatment of early osteoarthritis. **Clin Cases Miner Bone Metab**, v. 10, n. 1, p. 26–29, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23858307> %5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3710006/pdf/26-29.pdf>>.
- CLAUDIO-DA-SILVA, C.; BAPTISTA, L. S.; CARIAS, R. B. V.; MENEZES NETO, H. D. C.; BOROJEVIC, R. Cultura autóloga de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para o tratamento de ríides faciais. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 36, n. 4, p. 288–291, 2009.
- DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; DE OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n. 2–4, p. 303–306, 2009.
- DE OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70029-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70029-0)>.
- DEROSS, R.; COELHO, A. C. A. D. O.; MELLO, G. S. De; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, G. G.; BRUM, K. B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 24, n. 4, p. 276–281, 2009.
- DEL BUE, M.; RICCÒ, S.; RAMONI, R.; CONTI, V.; GNUDI, G.; GROLLI, S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: Their association in vitro and in vivo. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. SUPPL. 1, 2008.
- DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. **Journal of cutaneous and anesthetic 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__Orighresult__X0?lang=spi&link=http://0-search.ebscohost.com.fama.us.es/login.aspx?direct%25>.
- DRAGO, L.; BORTOLIN, M.; VASSENA, C.; TASCHIERI, S.; DEL FABBRO, M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 47,

2013.

- FELTHAUS, O.; PRANTL, L.; SKAFF-SCHWARZE, M.; KLEIN, S.; ANKER, A.; RANIERI, M.; KUEHLMANN, B. Effects of different concentrations of Platelet-rich Plasma and Platelet-Poor Plasma on vitality and differentiation of autologous Adipose tissue-derived stem cells. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 66, n. 1, p. 47–55, 2017.
- GEORGE, J. N. Platelets. **The Lancet**, v. 355, n. April, p. 1531–1539, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801186>>.
- GIRALDO, C. E.; LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. E.; SAMUDIO, I. J.; PRADES, M.; CARMONA, J. U. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 29, 2013.
- GIRALDO, C. E.; ÁLVAREZ, M. E.; CARMONA, J. U. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. **BMC Veterinary Research**, 2015.
- GIRALDO, C. E.; LÓPEZ, C.; CARMONA, J. U. Efectos de dos anticoagulantes sobre el recuento celular y parámetros de activación plaquetaria de plasma rico en plaquetas de equinos Effect of two anticoagulants on the cell count and platelet activation parameters from equine platelet-rich plasma. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 346, p. 341–346, 2015.
- GODWIN, E. E.; YOUNG, N. J.; DUDHIA, J.; BEAMISH, I. C.; SMITH, R. K. W. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 1, p. 25–32, 2012.
- GÜERCIO, A.; DI MARCO, P.; CASELLA, S.; RUSSOTTO, L.; PUGLISI, F.; MAJOLINO, C.; GIUDICE, E.; DI BELLA, S.; PURPARI, G.; CANNELLA, V.; PICCIONE, G. Mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat and platelet-rich plasma used in athletic horses with lameness of the superficial digital flexor tendon. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 1, p. 19–26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.10.006>>.
- HOLMES, H. L.; WILSON, B.; GOERGER, J. P.; SILVERBERG, J. L.; COHEN, I.; ZIPFEL, W. R.; FORTIER, L. A. Facilitated recruitment of mesenchymal stromal cells by bone marrow concentrate and platelet rich plasma. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–12, 2018.
- KIM, N.; CHO, S.-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 28, n. 4, p. 387, 2013. Disponível em: <<http://kjim.org/journal/view.php?doi=10.3904/kjim.2013.28.4.387>>.
- 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, n. 3, p. 297–300, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239100900582>>

- MAIA, L.; DE SOUZA, M. V.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; DE OLIVEIRA, A. C.; ALVES, G. E. S.; DOS ANJOS BENJAMIN, L.; SILVA, Y. F. R. S.; ZANDIM, B. M.; MOREIRA, J. do C. L. Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Induced Tendinopathy in Horses: Histologic Evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 8, p. 618–626, 2009.
- MARX RE; CARLSON ER; EICHSTAEDT RM; SCHIMMELE SR; STRAUSS JE; GEORGEFF KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 6, p. 638–646, 1998.
- 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.
- MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489–496, 2004.
- MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; BEYER NARDI, N. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. **Stem cells and development**, v. 24, n. 7, p. 803–13, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556829>>.
- MOURA, H. V. De; POMERANTZEFF, P. M. a; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas *. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 16, n. 4, p. 376–386, 2001.
- NASKOU, M. C.; SUMNER, S. M.; CHOCALLO, A.; KEMELMAKHER, H.; THORESEN, M.; COPLAND, I.; GALIPEAU, J.; PERONI, J. F. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.
- RIBEIRO, G; MASSOCO, C. O.; NETO, L.; CULTURE, J. C. Culture of equine bone marrow mononuclear fraction and adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells in different media. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, suppl.1, p. 20–24, 2013.
- SCHALLMOSER, K. , BARTMANN, C. , ROHDE, E. , REINISCH, A. , KASHOFER, K. , STADELMEYER, E. , DREXLER, C. , LANZER, G. , LINKESCH, W. AND STRUNK, D. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. **Transfusion**, 47: 1436-1446, 2007. doi:[10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x)
- SCHNABEL, L. V.; FORTIER, L. A.; WAYNE MCILWRAITH, C.; NOBERT, K. M. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? **Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 570–577, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.018>>.
- SENZEL, L.; GNATENKO, D. V; BAHOU, W. F. The platelet proteome. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 5, p. 329–333, 2009. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00062752-200909000-00003>>.
- SILVEIRA, D. M. Da; FRANCO, F. C. M.; NASCIMENTO, I. L. D. O.; SALOMÃO, M. D. F. L.; ARAUJO, T. M. De. Pesquisa de interferon gama em tecido periodontal de ratos submetidos à movimentação dentária induzida. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 2, p. 39–44, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-

54192009000200005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

- STESSUK, T.; PUZZI, M. B.; CHAIM, E. A.; ALVES, P. C. M.; DE PAULA, E. V.; FORTE, A.; IZUMIZAWA, J. M.; OLIVEIRA, C. C.; FREI, F.; RIBEIRO-PAES, J. T. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 7, p. 511–520, 2016.
- TAVAKOLINEJAD, S.; KHOSRAVI, M.; MASHKANI, B.; BIDESKAN, A. E.; MOSSAVI, N. S.; PARIZADEH, S. M. R.; ALAMDARI, D. H. The effect of Human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation. **Iranian Biomedical Journal**, v. 18, n. 3, p. 150–156, 2014.
- TORRES FC. Panículo adiposo inter escapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Clínica Cirúrgica) São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
- VENDDRAMIN, F. C.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. M. Plasma Rico Em Plaquetas E Fatores De Crescimento: Técnica Platelet-Rich Plasma and Growth Factors : Processing Technique and. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 33, n. 1, p. 24–28, 2006.
- VENDRUSCOLO C.P, CARVALHO A.M., MORAES L.F., MAIA L ,QUEIROZ D. L., WATANABE M. J., YAMADA A. L.M., ALVES A. L. G. Evaluating the effectiveness of diferents protocols for preparation of platelet rich plasma for use in equine medicine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 32, v. 2, p. 106-110.
- YANG, Y.-H. K.; OGANDO, C. R.; WANG SEE, C.; CHANG, T.-Y.; BARABINO, G. A. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 131, 2018. Disponível em: <<https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-018-0876-3>>.