

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**POTENCIAL INFLAMATÓRIO DA MEMBRANA
PLAQUETÁRIA NO LÍQUIDO SINOVIAL DE
EQUINOS**

BETSABÉIA HELOISA GENTILHA MILANI

Botucatu, São Paulo
Maio de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA

**POTENCIAL INFLAMATÓRIO DA MEMBRANA
PLAQUETÁRIA NO LÍQUIDO SINOVIAL DE
EQUINOS**

BETSABÉIA HELOISA GENTILHA MILANI

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de mestre.

Orientadora: : Prof^a Dr^a. Ana Liz Garcia
Alves

Botucatu, São Paulo

Maio de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M637p Milani, Betsabéia Heloisa Gentilha, 1991-
Potencial inflamatório da membrana plaquetária no líquido sinovial de equinos / Betsabéia Heloisa Gentilha Milani.
- Botucatu : [s.n.], 2018
60 f.: il. color., grafs., tabs.

Dissertação(Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018

Orientador: Ana Liz Garcia Alves
Inclui bibliografia

1. Equino. 2. Inflamação. 3. Osteoartrite. 4. Líquido sinovial. 5. Plasma. 6. Plaquetas. I. Alves, Ana Liz Garcia .II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

Autor: Betsabéia Heloisa Gentilha Milani

Data: 02 de maio de 2018

Título: Potencial inflamatório da membrana plaquetária no líquido sinovial de equinos

Comissão Examinadora

Profª Dra. Ana Liz Garcia Alves

Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Profª Dra. Elenice Deffune

Membro

Departamento de Urologia

FMB, UNESP, Botucatu

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pelo dom da vida, saúde e pelas oportunidades. Os privilégios que tive nestes últimos anos. Pelo aprendizado, crescimento pessoal e profissional, e também pelas outras inúmeras bênçãos que me concedeu.

A minha família que sempre está do meu lado, especialmente à minha mãe Gentilha pelo amor, o companheirismo, lealdade e incentivo. A senhora é muito amada. A minha irmã Celina, pelo carinho e amor fraterno, principalmente por confiar e acreditar em mim, eu sempre estarei ao seu lado.

Ao meu pai Olympio, que tinha como grande amigo e companheiro, hoje meu ídolo, herói e inspiração de sabedoria. Sinto que me fortalece, me guia e ilumina. Sinto sua falta, com olhos cheios de lágrimas e o coração apertado, algo indescritível dentro de mim, todos os dias desde a sua partida.

A minha orientadora, Professora Ana Liz, pela oportunidade de ingressar no mestrado e toda confiança depositada durante o experimento. Sigo como exemplo de pessoa e de profissional. A Senhora tem a minha admiração.

Aos Cavalos, que prestaram ajuda involuntária, e aceitaram meu pedido de desculpas por ter utilizados como animais de pesquisa.

Aos colegas de pós-graduação, que juntos formamos uma grande equipe. Sem a ajuda de todos não conseguiria este trabalho.

Aos funcionários responsáveis pela alimentação dos animais, secretários, técnicos de laboratório, residentes e demais funcionários do departamento de Cirurgia e Anestesiologia Animal e do Laboratório de Clínico Veterinário, pela colaboração e gratidão.

À CAPES pelo consentimento de bolsa de ensino.

Lista de Figuras

Figura 1.	Indução da sinovite. A) Fracionamento da Aliquota de LPS; B) Passagem da solução- mãe de LPS para frasco de vidroborocilicato; C) Aplicação intra-articular de LPS.....	8
Figura 2.	Processamento do sangue para obtenção do PRP. A) Amostras do sangue total após primeiro descanso; B) PRP pronto, evidenciando o botão plaquetário no fundo do tubo; C) Homogeneização do PRP; D) PRP contido na seringa.....	9
Figura 3.	Aspecto do processamento do Lisado plaquetário pré aplicação.....	9
Figura 4.	Valor das plaquetas obtidas após hemograma individual/animal e comparada com valor obtido no PRP.....	12
Figura 5.	Valor dos leucócitos obtidos após hemograma individual/animal e comparada com valor obtido no PRP.....	12
Figura 6.	Dados da análise estatística de frequência cardíaca.....	14
Figura 7.	Dados da análise estatística de frequência respiratória.....	15
Figura 8.	Dados da análise estatística de temperatura.....	15
Figura 9.	Avaliação do líquido sinovial pelo método de citologia: contagem de células nucleadas.....	16
Figura 10.	Avaliação do líquido sinovial pelo método de citologia: contagem de neutrófilos (valor absoluto).....	16
Figura 11.	Avaliação do líquido sinovial por refratômetro: proteína total.....	17
Figura 12.	Concentração de Dados PGE ₂ em pg/mL do líquido sinovial obtidos após dosagem. Valores obtidos por absorbância e transformados em pg/mL.....	18

Lista de Quadros

Quadro 1.	Diferentes protocolos utilizados na obtenção do PRP, concentrado plaquetário e o LP.....	8
------------------	--	----------

Lista de Siglas e abreviações

CHP	Concentrado de hormônio plaquetário
CTM	Célula tronco mesenquimal
EGF	Fator epidermal
FC	Frequência cardíaca
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FR	Frequência respiratória
IGF- 1	Fator semelhante à insulina
IL-1	Interleucina-1
IL-1ra	Antagonista do receptor de interleucina- 1ra
IL-1 β	Interleucina- 1 β
IL-6	Interleucina- 6
IL-10	Interleucina- 10
LP	Lisado plaquetário
LPS	Lipopolissacarídeo
OA	Osteoartrite
PBS	Solução fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento ativador de plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PRP	Plasma rico em plaquetas
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
VEGF	Fator vascular endotelial

Sumário

Capítulo 1		10
	1.1. Introdução.....	10
	1.2. Justificativa.....	11
	1.3. Revisão de literatura.....	12
	1.3.1. Contextualização temática.....	12
	1.3.2. Lisado plaquetário.....	15
	1.4 Referências.....	20
Capítulo 2		23
Resumo		25
Abstract		26
	1. Introdução.....	27
	2. Material e Métodos.....	28
	2.1. Delineamento experimental.....	28
	2.2. Processamento do indutor de sinovite aguda (LPS).....	29
	2.3. Processamento PRP e LP.....	30
	2.4. Quantificação prostaglandina E ₂	31
	2.5. Análise estatística.....	31
	3. Resultados.....	32
	3.1. Características do PRP e LP.....	32
	3.2. Avaliações físicas.....	34
	3.2.1. Frequência cardíaca.....	34
	3.2.2. Frequência Respiratória.....	35
	3.2.3 Temperatura retal.....	36
	3.3. Avaliação do líquido sinovial.....	37
	3.3.1 Células nucleadas e neutrófilos.....	37
	3.3.2 Proteína total.....	38
	3.3.3 PGE ₂	38

4.	Discussão.....	39
5.	Conclusão.....	50
6.	Referências.....	51
7.	Anexo.....	57

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A grande incidência da osteoartrite (OA) em equinos, assim como a utilização desses animais como modelos experimentais resultam em um aumento substancial de diversas pesquisas e estudos pré-clínicos envolvendo a terapêutica de lesões condrais e doenças articulares. Sabe-se da importância do conhecimento da fisiopatologia da sinovite, capsulite e da inflamação da membrana sinovial para o entendimento da evolução da osteoartrite. Tal alteração contribui de forma significativa para a degradação da cartilagem articular, através da manutenção do processo inflamatório articular, consequente da liberação de enzimas catabólicas, mediadores inflamatórios e citocinas no líquido sinovial (McIlwraith et al., 2012). Um dos tratamentos que vem ganhando destaque no cenário da OA é o plasma rico em plaquetas (PRP) e tem sido amplamente utilizado no tratamento das alterações articulares com resultados satisfatórios (Yamada, 2015).

Sabe-se que o PRP é um concentrado de plaquetas autólogo ou alogênico de fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e fibrinogênio. Tendo em vista sua composição, esse produto apresenta efeitos anabólicos, propriedades anti-inflamatórias e capacidade de gelificação. Devido à suas características, atualmente o PRP é considerado potencialmente eficaz no tratamento de enfermidades articulares, sendo suas propriedades requeridas e indicadas principalmente no tratamento de defeitos condrais (Xie et al., 2014). Os fatores de crescimento e as diversas proteínas bioativas presentes no PRP são capazes de estimular a migração e proliferação celular, além da produção de matriz extracelular e reduz a atividade do ciclo inflamatório articular induzido principalmente pela interleucina-1 (IL-1) (Pichereau et al., 2014; Xie et al., 2014; Yamada, 2015).

Porém, após a aplicação de PRP foram observadas a presença de reações adversas locais em equinos, como efusão sinovial, influxo celular e aumento das concentrações de IL-1 e prostaglandina E₂ (PGE₂) sinoviais (Carmona et al., 2007; Maia, 2009; Carmona et al., 2011; Yamada et al., 2012; Yamada et al., 2013; Textor et al., 2014; Yamada, 2015).

A membrana plaquetária expressa inúmeros antígenos, como os eritrocitários e os específicos da membrana plaquetária (Felix, 2009). Em humanos, os antígenos das glicoproteínas da membrana plaquetária podem causar diversas alterações imunológicas e alterar a expressão de várias proteínas (Landau e Rosenberg, 2011).

A exposição a esses antígenos, na aplicação local do PRP (intra-articular), é capaz de levar à uma resposta imune local e humoral (Felix, 2009). Dessa maneira, o concentrado de hormônio plaquetário (CHP) ou lisado plaquetário (LP) é uma alternativa para a eliminação da membrana plaquetária no preparo do PRP. O LP é obtido através de processamento laboratorial, onde *in vitro* é realizada a destruição da membrana plaquetária, porém sem interferência no teor dos fatores de crescimento. Ou seja, esse composto apresenta todos os constituintes dos grânulos potencialmente imunogênico (Salamanna et al., 2015).

Entretanto, devemos considerar que a presença da membrana plaquetária e seu potencial imunogênico dentro da articulação precisam ser investigados. Sendo assim, esse trabalho tem por finalidade a investigação do potencial imunogênico da membrana plaquetária no líquido sinovial equino, após a indução da sinovite experimental aguda e aplicação do PRP autólogo íntegro e do lisado plaquetário via intra-articular. Objetivou-se a padronização e a verificação da eficácia de um método alternativo de tratamento, com todos os benefícios presentes no PRP, porém, sem o risco de reações adversas nos animais.

1.2. JUSTIFICATIVA

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido amplamente utilizado no tratamento de enfermidades articulares dos equinos, apresentando resultados satisfatórios e promissores até o momento. Porém, conforme já mencionado, algumas reações indesejáveis têm sido relatadas após a aplicação desse produto biológico. No entanto, há poucos estudos voltados para a presença da membrana plaquetária dentro da articulação, poderia resultar em uma moderada reação imunológica e inflamatória local, justificando a apresentação de algumas reações indesejáveis após a aplicação intra-articular do PRP.

Sendo assim, é de extrema importância que seja investigado o potencial imunogênico da membrana plaquetária dos equinos, após a aplicação intra-articular do PRP, e que seja estudada uma forma alternativa de aplicação do PRP, nesse caso, pelo lisado plaquetário (LP). A verificação do potencial imunogênico da membrana plaquetária dos equinos irá contribuir de forma significativa para o sucesso da aplicação do PRP em enfermidades articulares, evitando possíveis efeitos indesejáveis e colaborando para o sucesso pleno do tratamento.

1.3. REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1. Contextualização temática

O PRP consiste na concentração plaquetária em um reduzido volume de plasma (Yamada, 2015). As plaquetas presentes no PRP contêm os grânulos- α , que são unidades de armazenamento. Essas unidades armazenam os fatores de crescimento em uma forma inativa, além de uma molécula chamada fibronectina e outras proteínas plasmáticas, que facilitam a adesão celular e a reparação de tecidos conjuntivos (Textor et al., 2014).

A maior parte dos fatores de crescimento é ativada durante ou logo após o processo inflamatório, e atuam principalmente sobre a mitose, secreção e migração celular (Jain et al., 2012; Xie et al., 2014). Já as plaquetas liberam diversos fatores de crescimento, dentre eles: fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que possui um papel importante sobre o processo inflamatório; o fator de crescimento ativador de plaquetas (PDGF); fator transformador (TGF); fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator semelhante à insulina (IGF-1), que atua sobre matriz óssea e cartilaginosa. Na fase de reparo são importantes o fator vascular endotelial (VEGF) e o fator epidermal (EGF). Tais fatores de crescimento são importantes por atuarem na proliferação, diferenciação, modulação e coordenação celular (Carter et al., 2003; Carmona et al, 2007; Lee et al., 2007; Maia, 2009).

Para melhor entendimento do ambiente articular sob a ação do PRP, induz-se a sinovite experimental aguda no ambiente articular, conseqüentemente, promovendo o surgimento de processos inflamatórios vinculados a sinais de dor, exsudação e migração celular, resultando assim, um

quadro clínico mimetizando à AO (Campebell et al., 2004) tendo como reação principal um processo exudativo agudo transitório (Stimpson et al., 1987). Alguns estudos, como de Palmer e Bertone (1994), que testaram doses de indutor de sinovite experimental utilizando a endotoxina derivada da parede celular de *E. Coli* lipopolissacarideo (LPS) injetadas experimentalmente na articulação do carpo de equinos, causando sinovite leve a moderada, e observaram que os sinais clínicos quando usado a dose de 0,25ng/ml evidenciou a semelhança de casos clínicos típicos. Esta aplicação intra-articular estimula macrófagos, aumento de síntese das citocinas pró-inflamatórias (p. ex., TNF α , IL-1 β e IL-6), obtendo um processo inflamatório agudo de curta duração (Stimpson et al., 1987).

Comparativamente, o PRP é igualmente capaz de agir de forma positiva no controle da inflamação da osteoartrite, pela inibição da liberação de metaloproteinases, desintegrinas e fator de transcrição NF-kB, responsável por iniciar parte da patogênese da OA (Xie et al., 2014). Além disso, esse produto apresenta diversas citocinas anti-inflamatórias como o antagonista do receptor de interleucina-1ra (IL-1ra) e a interleucina-10 (IL-10) (Textor et al., 2013; Textor, 2014). Mais do que isso, possui uma capacidade anti-inflamatória considerável, suficiente para reduzir a dor (Yamada, 2011).

Em estudo anterior, Yamada et al. (2012) utilizaram injeções de PRP intra-articulares, observando conseqüente redução de claudicação nos animais tratados. Nota-se que este biocomposto apresenta uma ampla variedade de proteínas indutoras e bioativas presentes nos α -grânulos plaquetários, que além de estimular a síntese da matriz extracelular condral, são igualmente capazes de neutralizar o efeito catabólico de diversas citocinas próinflamatórias presentes em uma articulação com OA, como a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Abrams et al., 2013; Xie et al., 2014).

Em relação a sua notável capacidade anti-inflamatória, que pode gerar um potencial influxo celular para dentro da cavidade articular mesmo quando há o descarte da zona de névoa (Yamada, 2011). Esse efeito se deve provavelmente à presença de inúmeras citocinas. E em relação a sua ativação com trombina parece ter um possível efeito imunogênico. Visto que a trombina pode transcurrir efeitos imunológicos subclínicos, decorrentes principalmente de resposta imunológica exacerbada ou hipersensibilidade individual, efeito

proteolítico ou devido a uma resposta articular imediata após a liberação concomitante de altas concentrações dos fatores de crescimento presentes nos grânulos plaquetários (Textor et al., 2013).

Embora haja conhecimento de todos esses dados, são necessários mais estudos em relação ao potencial inflamatório da membrana plaquetária, e sua relação com efeitos adversos e falhas no tratamento. A membrana plaquetária pode ocasionar uma resposta imune e inflamatória local, alterando de forma importante o ciclo inflamatório articular e aumentando os níveis de IL-1 e PGE₂ sinoviais. A PGE₂, utilizada como mediador inflamatório, é liberada quando há distúrbios de homeostase na articulação, e é caracterizada pelo aumento do nível de macrófagos no líquido sinovial e da expressão de proteínas degradantes da matriz dos condrócitos (Wang et al., 2015; Yamada, 2015).

Além disso, o estímulo inflamatório influencia negativamente no processo de reparação condral, pois, na presença de determinadas citocinas pró-inflamatórias, observa-se a degradação contínua da cartilagem articular, morte de condrócitos, manutenção da sinovite e da dor (Yamada, 2015). Yamada et al., (2012) e Yamada (2015) observaram um aumento do influxo celular e aumento da concentração de IL-1 e PGE₂ sinoviais em animais tratados com PRP íntegro.

Já em estudos pré-clínicos, com a utilização de PRP como arcabouço tridimensional para o suporte de células tronco mesenquimais e preenchimento de defeitos condrais, há um questionamento se a membrana plaquetária atrapalha o processo de reparação condral (Yamada, 2015). Browning et al. (2012) relataram que sinoviócitos cultivados junto ao PRP demonstraram maior produção de interleucinas e metaloproteinases, o que poderia levar ao maior catabolismo articular. Drago et al. (2014) relataram que o PRP rico em leucócitos e hemácias demonstraram ser citotóxico para sinoviócitos em humanos, além de serem capazes de ativar a inflamação através da liberação de IL-1, TNF- α e IL-6. Felix (2009) observou um baixo potencial imunogênico em pacientes humanos tratados com biocurativos de PRP. Já Textor et al. (2014) relataram que o PRP ativado com trombina (ou PRP em forma de gel) aplicado via intra-articular, gera discreta resposta inflamatória articular, com efusão, influxo celular, neutrofilia e dor à flexão.

No entanto, Moraes (2013) observou inflamação articular transitória em animais que receberam aplicação intra-articular de PRP, sendo que igualmente, outros autores também relataram pequenas reações inflamatórias clínicas e resposta celular exacerbada após a utilização do PRP na terapia da OA (Carmona et al., 2007; Carmona et al., 2011; Yamada, 2011).

Dessa maneira, o LP seria uma alternativa interessante para o tratamento da osteoartrite, com todos os benefícios apresentado pela aplicação de PRP, porém sem a presença da membrana plaquetária, que pode ser potencialmente inflamatória. Visto que, para o sucesso de sua aplicabilidade, a destruição da membrana plaquetária deve ser realizada *in vitro*, e não modificaria a ação e nem a concentração dos fatores de crescimento e outras proteínas bioativas presentes no conteúdo do PRP. Porém, em equinos, tanto a metodologia de obtenção do LP, quanto sua segurança de utilização e eficácia ainda estão pouco esclarecidas.

1.3.2. Lisado plaquetário

O lisado plaquetário (LP) ou concentrado de hormônio plaquetário, é obtido a partir da lise das membranas das plaquetas. Este concentrado, contém vários fatores de crescimento, como TGF-beta, IGF, FGF e PDGF, semelhante ao PRP. Este subproduto tem sido utilizado nas pesquisas *in vitro* como substituto do soro fetal bovino em culturas de células tronco mesenquimais (CTMs) de humanos e equinos. Quando o soro fetal bovino é substituído pelo LP, observa-se que as culturas apresentam rápido crescimento, expansão e diferenciação além de evitar reações indesejadas causadas pelo produto. Tal fato, pode ser explicado através do resultado satisfatório do uso do LP, devido a alta quantidade de fatores de crescimento presentes no substrato do PRP (Xia et al., 2011).

A lise plaquetaria inclui ciclos de congelamento e descongelamento do subproduto a temperaturas negativas. Após o termino do processamento do PRP, o produto vai para o freezer (-80°C) e posteriormente descongelado a temperatura ambiente ou em banho-maria (+/- 37°C), este processo pode ser repetido por até 5 vezes, visto que, sem choque térmico não ocorre a liberação

e ativação dos fatores de crescimento. Embora o LP seja de fácil processamento e obtenção, sendo capaz de fornecer altos níveis de fatores de crescimento, ainda são necessárias mais pesquisas voltadas para seu uso clínico (Russell e Koch, 2015). Segundo Doucet et al. (2005), a presença dos fatores de crescimento no sobrenadante acontece devido a liberação de grânulos das plaquetas, que ocorre pelo processo dinâmico de armazenamento antes do uso.

A fim de tornar a sua elaboração adequada para o ambiente articular, é importante que a membrana plaquetária seja quebrada, de forma que os fatores de crescimento se mantenham preservados. Para isso é importante que o processo de rompimento plaquetário com o choque osmótico seja efetivo. No quadro 1, podemos observar diferentes protocolos utilizados na obtenção do PRP, o concentrado plaquetário e o LP, tanto em estudos de ambiente articular, com o substrato para cultura de células tronco CTMs de equinos *in vitro* como substituto do soro fetal bovino (Seo et al., 2013).

Autor	PRP	Congelamento	Descongelo	LP
Del Blue et al. (2007)	1° Centrifugação 350G por 10 minutos; 2° Centrifugação 510G por 10 minutos	- 80°C	37°C Após descongelamento o produto foi lavado com DMEM;	20000g por 10 minutos
Kol et al. (2013)	1° Centrifugação 420G por 15 minutos; 2° Centrifugação 100G por 15 minutos	-	Encubação à 37° por 1 hora;	1800g por 8 minutos
Seo et al., 2013	1°Centrifugação: 230G por 10 minutos; 2° Centrifugação: 900G por 15 minutos;	- 80°C	37°C;	1600g por 30 minutos
Mojica-Henshaw et al. (2013)	-	-80°C	4°C até descongelamento	4000g por 20 minutos
Russell e Koch (2015)	1°Centrifugação: 200G por 15 minutos; 2° Centrifugação: 400G por 15 minutos;	- 80°C 1 ciclo <i>overnight</i> ;	37°C 1 ciclo;	4000G por 15 minutos
Tyrnenopoulou et al. (2016)	1° Centrifugação: 270G por 7 minutos; 2° Centrifugação: 1000G por 5 minutos;	-80 ° C durante 30 minutos;	Descongelado à temperatura ambiente;	-
Vanni (2016)	1° Centrifugação: 1500RPM por 10 minutos; 2° Centrifugação: 3000RPM por 20 minutos.	- 80°C	Diversos ciclos de congelamento e descongelamento em temperatura ambiente	3000RPM por 5 minutos

Quadro 1 - Diferentes protocolos utilizados na obtenção do PRP, concentrado plaquetário e o LP.

Kol et al. (2013) utilizaram o LP em cultivo autólogo de células tronco mesenquimais de equinos provenientes de 4 origens distintas, sendo avaliado a proliferação e expressão de citocinas *in vitro*. Tais achados foram positivos ao se tratar de proliferação de células *in vitro*. Porém, a comparação sobre a migração e liberação dos mediadores com o meio enriquecido com soro fetal bovino, os resultados não foram positivos. Nesse caso, o esperado seria que por conta dos fatores de crescimento presentes no LP, este cultivo teria melhor desempenho.

Del Blue et al. (2013) utilizaram o LP autólogo para estudo *in vitro* de proliferação de CTM derivada de tecido adiposo e tenócitos de equinos que apresentaram enfermidades do aparelho locomotor com o objetivo de obter maior taxa de regeneração tecidual. Porém, seus resultados demonstraram que houve dose dependente, provavelmente ocorrido pelos fatores de crescimento, liberados na lise das plaquetas. Além disso, foi possível estimular a proliferação de tecidos com resistência ou dificuldade de expansão em cultivos.

Seo et al. (2013), consideraram que pode haver um crescente aumento na substituição do soro fetal bovino por LP devido a sua alta capacidade de expansão das CTMs. Em seu estudo, o objetivo foi a expansão de CTM derivadas de medula óssea equina. Os autores citados à cima propõem que o LP possa ser uma alternativa ao soro fetal bovino, visto que para obtenção do LP não precisa de sacrifício do animal, e o soro fetal bovino sim. Além disso, destacaram que é preciso estipular um protocolo único para a obtenção do LP. A separação das plaquetas, lise e fragmentação para remoção da membrana plaquetária por centrifugação, influenciariam na quantidade de fatores de crescimento, proliferação e diferenciação da CTMs quando protocolos diferentes são utilizados, e conclui que o LP é adequado para a substituição do soro fetal bovino.

No estudo de Mojica- Henshaw (2013), processaram o LP com soro ou com plasma, e testarem a efetividade do processo, também verificaram a substituição do soro fetal bovino em cultivos de células estromais humanas. O resultado deste estudo confirmou que o LP auxiliou a proliferação e expansão do cultivo de 2-5 vezes mais que o soro fetal bovino.

Russell e Koch (2015) propuseram a determinar como as células do cordão umbilical equino proliferam em meio de cultivo enriquecido com LP. Mas de acordo com seus resultados, não houve relevância significativa na substituição do soro fetal bovino por LP. Assim, é de total relevância, que haja espaço para que o LP seja estudado em cultivos de outros tipos de tecidos, como o adiposo e medula óssea, e a sua avaliação no efeito de proliferativo, para que tais justificativas do seu uso sejam esclarecidas.

Diferentemente dos outros autores, Tyrnenopoulou et al. (2016), tiveram como principal objetivo de estudo a aplicação intra-articular de LP em 10 cavalos com OA da articulação interfalângica distal. Os resultados foram semelhantes ao tratamento com CTM e controle de solução salina, com melhora clínica significativa da claudicação.

Vanni (2016) em uma parte do seu experimento testou a técnica do hormônio derivado de plaquetas após obter o LP associado com a membrana de quitosana em feridas de humanos. Dosou os fatores de crescimento do PRP, concentrado plaquetário e do hormônio derivado de plaquetas e seu resultado foi superior comparado ao PRP.

Desta maneira, a investigação teve por objetivo obter respostas sobre a membrana plaquetaria na ação do processo inflamatório da sinovite induzida em equinos.

Referências

- Abrams, G.D.; Frank, R.M.; Fortier, L.A.; Cole, B. J., 2013. Platelet-rich Plasma for Articular Cartilage Repair. *Sports Med Arthrosc Rev*, v.21, n.4, p.213–219.
- Browning, S.R.; Weiser, A.M.; Woolf, N.; SanGiovanni, T. P.; Scuderi, G. J.; Carballo, C.; Hanna, L. S., 2012. Platelet-rich plasma increases matrix metalloproteinases in cultures of human synovial fibroblasts. *J Bone Joint Surg Am*, v.94, p.1721-1727.
- Campebell, R.C.; Peiró, J.R.; Valadão, C.A.A; Santana, A.E.; Cunha, F.Q., 2004. Effects of lidocaine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.3, p.281-291.
- Carmona, J.U.; Argüelles, D.; Climent F.; Prades, M., 2007. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: A preliminary pilot clinical study. *J. Equine. Vet. Sci*, v.27, n.4, p.167-170.
- Carmona, J.U.; Lopez, C.; Giraldo, C.E., 2011. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermidades crônicas del aparato musculoesquelético equino. *Arch Med Vet*, v. 43, p.1- 10.
- Carter, C. A.; Jolly, D. G.; Worden, C. E.; Hendren, D. G.; Kane, C. J. M., 2003. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol*, v.74, p.244–255.
- Del Bue, M.; Riccò, S.; Conti, V.; Merli, E.; Ramoni, R.; Grolli, S., 2007. Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet Res Commun*, v. 31, p.289–292.
- Dragoo, J. L.; Wasterlain, A. S.; Braun, H. J.; Nead, K. T., 2014. Platelet-Rich Plasma as a Treatment for Patellar Tendinopathy A Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med*, v.42(3), p.610-8.
- Felix, M.C., 2009. “Potencial imunogênico dos biocurativos: aspectos imunohematológicos e leucoplaquetários”. 2009. 96p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- Jain, P.; Jain, R.; Jain, A. K.; Jindal, M.; Dixit, R., 2012. Autologous platelet gel and its clinical application. *NJIRM* v. 3, n.3, p. 164-168, 2012.
- Landau, M., Rosenberg, N., 2011. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion*, 51(3), 558-569.
- Lee, K. B. L.; Hui, J. H. P.; Song, I. C.; Ardany, L.; Lee, E. H., 2007. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects—a porcine model. *Stem Cells.*, v.25, p.2964-2971.
- Kol, A.; Walker, N. J.; Galuppo, L. D.; Clark, K. C.; Buerchler, S.; Bernanke, A; Borjesson, D. L., 2013. Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. *Equine Vet J* , v.45, p.193–198.
- Maia, L., De Souza, M. V., Alves, G. E.; Júnior; J. I.R.; Oliveira; A. C.; Zandim; B. M.; Silva, Y. F.R.S., 2009. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica. *Pesq Vet Bras*, 29, 241-245.
- McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D.; Kawcak. C.E., 2012. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res*, v.1, n.11. p.297–309.
- Mojica-Henshaw, M.P.; Jacobson, P.; Morris, J.; Kelley, L.; Pierce, J.; Boyer, M.; Reems, J.A., 2013. Serum-converted platelet lysate can substitute for

- fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*, v.15, p.1458–1468.
- Moraes, A.P.L., 2013. “Resposta ao uso intra-articular de plasma rico em plaquetas em equinos hígidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos”. 2013. 130p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP).
- Palmer, J.L.; Bertone, A.L., 1994. Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. *Equine Vet J*, v. 26, p.492-495.
- Price, J.; Marques, J.M.; Welsh, E.M., 2002. Pilot epidemiological study of attitudes towards pain in horses. *Vet Res*, p.151:570.
- Russell, K. A.; Koch, T. G., 2016. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture – too much of a good thing. *Equine Vet J*, v.48, p.261–264.
- Salamanna, F., Veronesi, F., Maglio, M.; Della Bella, E.; Fini, M., 2015. New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: General overview on still open questions and outlook. *Biomed Res Int*, v.2015.
- Seo, J.; Tsuzuki, N.; Haneda, S.; Yamada, K.; Furuoka, H.; Tabata, Y.; Sasaki, N., 2013. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for *in vitro* expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*, v.95, p.693–698.
- Stimpson, S.A.; Esser, R.E.; Carter, P.B.; Sartor, R.B.; Cromartie, W.J.; Schwab J.H. 1987. Lipopolysaccharide induces recurrence of arthritis in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. *J Exp Med*, v. 165, p.1688–1702.
- Textor, J., 2014. Platelet-Rich Plasma (PRP) as a therapeutic agent: platelet biology, growth factors and a review of the literature. In: platelet-rich plasma. Springer Berlin Heidelberg, p. 61-94.
- Textor, J.A.; Tablin, F., 2013. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. *Veterinary Surgery*, v.42, n.6, p.499–510.
- Textor, J.A.; Willits, N.H.; Tablin, F., 2013. Synovial fluid growth factor and cytokine concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *Vet J*, v.198, n.1, p.217–223.
- Tyrnenopoulou, P.; Diakakis, N.; Karayannopoulou, M.; Savvas L.; Koliakos, G., 2016. Evaluation of intra-articular injection of autologous platelet lysate (PL) in horses with osteoarthritis of the distal interphalangeal joint. *Vet Q*, v.36.
- Van Loon, J. P.; De Grauw, J.C.; Van Dierendonck, M.; L'ami, J.J.; Back, W.; Van Weeren, P.R., 2010. Intra-articular opioid analgesia is effective in reducing pain and inflammation in an equine LPS induced synovitis model. *Equine Vet J*, v.42(5), p.412-9.
- Vanni, I.S.R., 2016. Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades dos Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela técnica de Lisado Plaquetário. 2016, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Xia, W.; Li, H.; Wang, Z.; Xu, R.; Fu, Y., Zhang, X.; Ye, X.; Huang, Y.; Xiang, A.P.; Yu, W., 2011. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived stem cells. *Cell Biol. Int*, v.35, p.639-643.

- Xie, X.; Zhang, C.; Tuan, R.S., 2014. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther* v.16, n.204, p1-15.
- Yamada, A. L. M., Carvalho, A. M. D., Oliveira, P. G. G., Felisbino, S.L.; Queiroz, D.L.; Watanabe, M.J.; Hussni, C. A.; Alves, A.L.G., 2012. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzida experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.2, p. 318-322.
- Yamada, A.L.M., 2015. Células tronco mesenquimais em gel de plasma rico em plaquetas associados com microfraturas no tratamento de lesões condrais articulares em equinos. 2015. 136p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- Yamada, A.L.M.; Carvalho, A.M.; Moroz, A.; Deffune, E.; Watanabe, M. J.; Hussni, C. A.; Rodrigues, C. A.; Alves, A. L. G., 2013. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects healing in horses. *Stem Cell Discovery*, v.3, n.4, p.218-225.
- Wang, G.; Li, X.; Jiang, R.; Li, Y.; Fan, X.; Zheng, Y.; Gao, L., 2015. Changes in synovial fluid inflammatory mediators and cartilage biomarkers after experimental acute equine synovitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, v.59, p.129-134.

Revista: Research in Veterinary Science

Qualis: A2

Fator de impacto: 1,298



ISSN 0034-5288



RESEARCH IN
VETERINARY
SCIENCE

Título: Potencial inflamatório da membrana plaquetária no líquido sinovial de equinos

Autores: Betsabéia Heloisa Gentilha Milani^a, Jaqueline Brandão de Souza^a, João Pedro Hubbe Pfeifer^a, Vitor Hugo dos Santos^a, Gustavo dos Santos Rosa^a, André Massahiro Teramoto KriECK^a, Mariana Correa Rossi^a, Lucas Fernando Sérgio Gushiken^b, Regina Kiomi Takahira^c, Marcos Jun Watanabe^a, Carlos Alberto Hussni^a, Ana Liz Garcia Alves^a.

^aDepartment of Veterinary Surgery and Anesthesiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP, 18618-9070, Brazil. E-mail address: anaalves@fmvz.unesp.br

^bDepartment of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, Campus Botucatu, Botucatu, SP, Brazil.

^cDepartment de Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP, 18618-9070, Brazil.

Observação

O capítulo 2 foi redigido sobre as normas da revista **Research in Veterinary Science**, mas para facilitar o entendimento e dar sequência ao texto, os itens numerados, gráficos e figuras foram inseridas no corpo do texto. Após a avaliação e correção da banca examinadora, o artigo será reorganizado no formato e normas da revista.

RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é utilizado no tratamento de enfermidades articulares, porém, após a aplicação de PRP intra-articular, observa-se se observa algumas reações adversas locais em equinos, como efusão sinovial, influxo celular e aumento da concentração de PGE₂ sinoviais. Os antígenos da membrana plaquetária podem causar diversas alterações imunológicas e alterar a expressão de proteínas. O lisado plaquetário (LP) seria uma alternativa para a aplicação do conteúdo íntegro do PRP, porém sem a membrana plaquetária. Portanto, esse trabalho tem por finalidade a investigação do possível potencial inflamatório da membrana plaquetária no líquido sinovial e comparação com o PRP, após a indução de sinovite experimental aguda. Foram utilizadas 20 articulações radiocárpicas de equinos hígidos. Cada grupo foi composto por 5 articulações sendo eles: o grupo controle, grupo PRP, grupo LP e grupo LPS. O grupo PRP recebeu o tratamento com plasma rico em plaquetas, o grupo LP recebeu o lisado plaquetário e o grupo LPS recebeu o tratamento com lipopolissacarídeo. Todos os grupos, menos o controle, receberam a dose de 0,25 ng/mL intra-articular, e foi colhido amostras de líquido sinovial em seriados momentos (0,4,8,24, 48 horas e 7 dias) e exame físico individual de cada animal. Além disso, foi feita a dosagem de PGE₂. Os resultados após indução da sinovite experimental aguda e a aplicação do LP e PRP, apontaram que houve alterações semelhantes no líquido sinovial e redução dos sinais de inflamação da mesma forma em ambos os grupos ($P < 0,05$). Desta maneira, o uso do LP foi semelhante em comparação com o PRP intra-articular, na redução da inflamação articular local.

Palavras-chave: equino, lisado plaquetário, inflamação, osteoartrite, plasma rico em plaquetas.

ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP) is used in the treatment of joint diseases, however, after administered of intra-articular PRP, there are some local adverse reactions in horses, as synovial effusion, cellular influx and increased concentration of synovial PGE₂. Antigens of the platelet membrane can cause various immunological changes and alter the expression of proteins. Platelet lysate (LP) would be an alternative for the application of the full content of PRP, but without the platelet membrane. Therefore, this work is to investigate the possible inflammatory potential of the platelet membrane in the synovial fluid and to compare it with PRP after the induction of acute experimental synovitis. Twenty radiocarpal joints of healthy horses were used. Each group consisted of 5 joints: the control group, the PRP group, the LP group and the LPS group. The PRP group received treatment with platelet rich plasma, the LP group received the platelet lysate. All groups, except the control, received the intra- (0,4,8,24, 48 hours and 7 days) and physical examination of each animal. In addition, PGE₂ was dosed. The results after induction of acute experimental synovitis and the application of LP and PRP, indicated that there were similar alterations in the synovial fluid and reduction of the signs of inflammation in the same way in both groups ($P < 0,05$). In this method, the use of LP was similar in comparison to the intra-articular PRP, in the reduction of local inflammatory joint.

Keywords: equino, lisado plaquetário, inflamação, osteoartrite, plasma rico em plaquetas.

Introdução

A incidência da osteoartrite (OA) em equinos, assim como a utilização desses animais como modelos experimentais resultam em um aumento substancial de pesquisas e estudos pré-clínicos envolvendo a terapêutica de lesões condrais e doenças articulares (McIlwraith et al., 2012). Sendo assim, o plasma rico em plaquetas (PRP) é utilizado no tratamento das alterações articulares com resultados satisfatórios (Yamada, 2015).

O PRP é um concentrado de fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e fibrinogênio (Xie et al., 2014). Porém, existem relatos que descrevem a presença de reações adversas locais em equinos, como efusão sinovial, influxo celular e aumento das concentrações de IL-1 e PGE₂ sinoviais (Carmona et al., 2007; Maia, 2009; Carmona et al., 2011; Yamada et al., 2012; Yamada et al., 2013; Textor et al., 2014; Yamada, 2015), após a aplicação de PRP. A membrana plaquetária expressa inúmeros antígenos, como os eritrocitários e os específicos da membrana plaquetária (HPA em humanos) (Felix, 2009). Em humanos, os antígenos das glicoproteínas da membrana plaquetária (HPA) podem causar diversas alterações imunológicas e alterar a expressão de determinadas proteínas (Landau e Rosenberg, 2011). O potencial imunogênico da membrana pode igualmente levar à formação de antígenos contra fatores de coagulação, decorrendo em graves alterações sistêmicas, como as coagulopatias. O lisado plaquetário (LP) é um derivado plaquetário rico em fatores de crescimento e citocinas que estimulam a reparação tecidual, que é impulsionada por uma variedade de fatores de crescimento (Bieback et al., 2009), e obtido através de processamento laboratorial, onde é realizado a destruição da membrana plaquetária, porém sem interferência no teor dos fatores de crescimento (Salamanna et al., 2015). Sendo assim, o LP seria uma alternativa para a aplicação do conteúdo íntegro do PRP.

A OA é estudada a anos na área da veterinária nos cães e cavalos. E no modelo experimental nos equinos, o lipopossacarídeo (LPS) é usado como indutor de sinovite e capsulite inflamatória transitória. Este modelo experimental, incluiu a reação inflamatória primária para avaliar o potencial e o benefício de uma terapêutica específica.

Neste estudo, o objetivo foi verificar o potencial inflamatório da membrana plaquetária dos equinos na articulação do carpo induzindo uma reação inflamatória local com LPS, para mimetizar a sinovite, e relacionar se o LP em relação ao PRP teria um potencial anti-inflamatório maior comparando o número de células características da articulação, PGE₂ e avaliação clínicas dos equinos após receber o tratamento, e também caracterizar o protocolo do PRP utilizado de forma efetiva, além de conhecer melhor o efeito do PRP e LP em enfermidades articulares, evitando efeitos indesejáveis.

2. Material e Métodos

2.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas as articulações radiocárpicas de 20 equinos hípidos, idade entre 5 e 8 anos, peso em torno de 350kg. Os animais não apresentaram histórico de doenças articulares, foram utilizados machos e fêmeas, alojados individualmente em baias na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. A Comissão de Ética no Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia aprovou todos os procedimentos contidos neste estudo (Aprovação CEUA 157/2016).

O estudo foi dividido em quatro grupos, sendo o grupo controle (GC) apenas com a punção da articulação para coleta de líquido sinovial (controle negativo), o grupo LPS (controle positivo), grupo plasma rico em plaquetas (PRP) e o grupo lisado plaquetário (LP). Cada articulação do grupo LPS, PRP e LP recebeu inicialmente uma aplicação intra-articular de LPS (0,25 ng/mL) no momento 0 hora (excluindo o grupo controle). Após 2 horas da indução, 2 mL de PRP ou LP foram aplicados em 10 articulações dos grupos designados. Os momentos de coletas foram 0 hora, 4, 8, 24 e 48 horas, e 7 dias. Além das coletas de líquido sinovial, foram realizadas avaliações físicas, exames de claudicação e análise laboratorial do LS.

A técnica utilizada para o processamento do PRP foi escolhida devido a sua efetividade em concentrar plaquetas (Yamada et al., 2015), e a técnica do LP, foi adaptada após uma vasta revisão de literatura e adequação à espécie equina. Foi coletado sangue total autólogo para o processamento do plasma rico

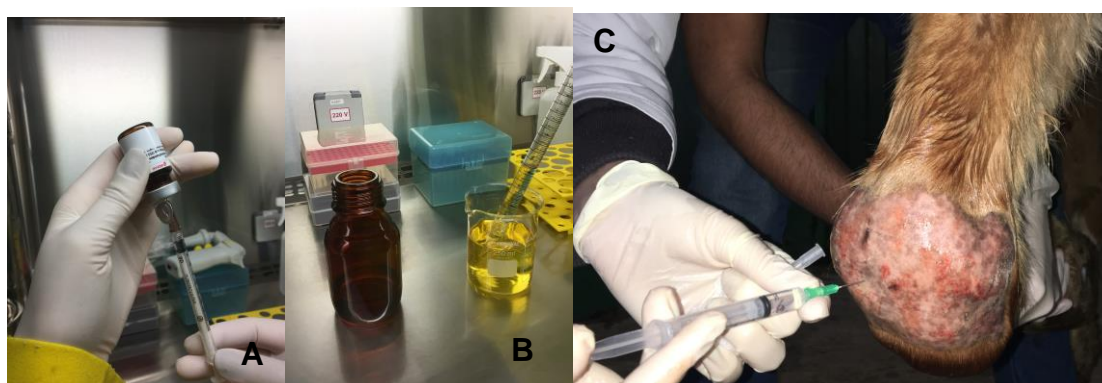
em plaquetas (PRP) de dez animais, tanto para o grupo PRP quanto para o grupo do LP.

O líquido sinovial coletado nos diferentes momentos e passou por centrifugação a 2000G, por 15 minutos a 4°C (com exceção do exame citológico). O sobrenadante foi alíquotado e congelado em criotubos a -80° C.

2.2 Processamento do Indutor agudo de sinovite (LPS)

Utilizou-se produto comercial *Lipopolysaccharide E. coli*¹ (O55:B5; Sigma – Aldrich; L5418) com concentração de 1mg/mL. Para obter a solução mãe, diluiu-se 0,05 mL de LPS em 250 mL de RPMI 1640 Medium² (Gibco), atingindo a concentração de 200ng/mL e esta solução foi armazenada em frasco de vidroborocilicato à 4°C. A solução intermediária foi obtida com a diluição de 10µl da solução mãe em 990µl de solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2³(Gibco) atingindo a concentração de 2ng/mL. Para a solução final (solução de trabalho), a obtenção foi a partir da diluição de 500µl da solução intermediária em 3500µl de PBS pH 7,2, obtendo assim, concentração de 0,25 ng de LPS/ mL. As etapas para a obtenção da diluição e concentração ideal de LPS foram realizadas em cabine de segurança biológica e utilização de matérias estéreis (Figura 1).

Fig.1.Indução da sinovite. A) Fracionamento da Aliquota de LPS; B) Passagem da solução- mãe de LPS para frasco de vidroborocilicato; C) Aplicação intra-articular de LPS.



¹ O55:B5; Sigma – Aldrich; L5418 -

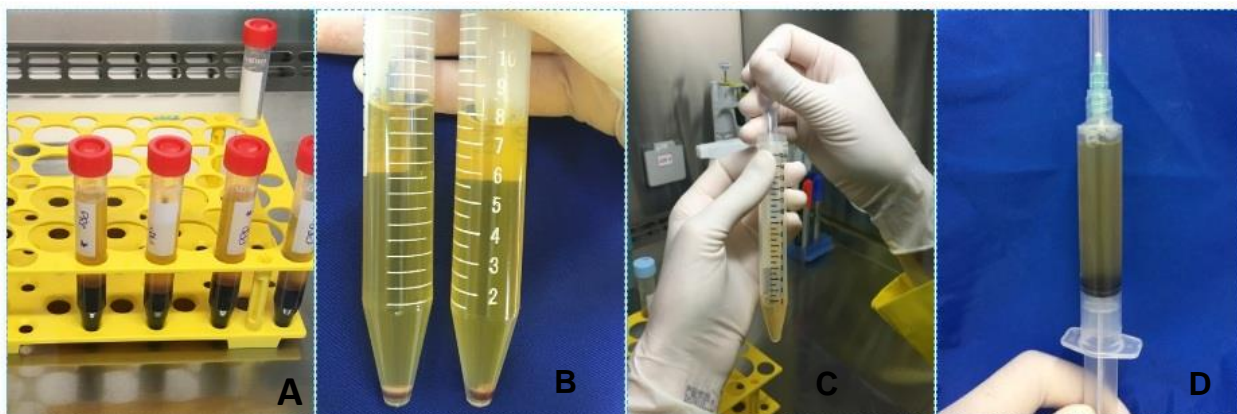
² RPMI 1640 Medium² - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

³ Solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2³- Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

2.3 Processamento PRP e LP

O PRP foi processado pelo método de centrifugação dupla, com sangue total autólogo coletado através de venopunção jugular em 16 tubos de citrato de sódio a 3,8% (em torno de 60 mL)⁴, adaptado de Vendruscolo et al. (2014) e Yamada (2015), dos equinos do Grupo PRP e Grupo LP. O sangue total foi centrifugado⁵ refrigerado pela primeira vez à 300G por 5 minutos após passar 30 minutos em descanso. Após mais 30 minutos de descanso, o plasma sobrenadante foi removido totalmente e transferido a tubos tipo falcon de 15 mL e submetidos à nova centrifugação refrigerada à 700G por 15 minutos. Assim, 75% do plasma sobrenadante foram descartados, e os 25% restantes foram agitados resultado no PRP (Figura 2). Foi desprezada a zona de névoa (“Buffy Coat”). A contagem plaquetária foi por contagem microscópica em câmara de Neubauer espelhada.

Fig. 2. Processamento do sangue para obtenção do PRP. A) Amostras do sangue total após primeiro descanso; B) PRP pronto, evidenciando o botão plaquetário no fundo do tubo; C) Homogeneização do PRP; D) PRP envasado para aplicação.



O lisado plaquetário foi obtido a partir do PRP, e processado pelo método modificado de Mojica-Henshaw et al. (2013) e Vanni (2014) e semelhante ao Schallmoser e Strunk (2009). Após obter o PRP (em torno de 6 mL), a amostra foi congelada a -80° e depois aquecido em banho-maria à 37°C por 5 minutos, com posterior centrifugação a 4000G por 20 minutos para eliminação

⁴ BD Vacutainer - Brasil

⁵ Centrifuge 5804R - Eppendorf, Hamburg, Germany

das membranas plaquetárias (Figura 3). Na aplicação intra-articular foi utilizado o sobrenadante, o pellet foi descartado.

Fig. 3. Aspecto do processamento do Lisado plaquetário pré aplicação.



2.4 Quantificação prostaglandina E₂

A determinação da concentração da prostaglandina E₂ (PGE₂) sinovial foi realizada em M0, M4, M8, M24, M48 e M7D através de teste imunoenzimático utilizando “kit” ELISA comerciais, de acordo com as instruções observadas na bula dos produtos. A sensibilidade do “kit” foi de 0,140 pg/mL e a densidade óptica de 450 pg/mL a 540 pg/mL) e volume da amostra de 150 microlitros. O líquido sinovial foi coletado nos diferentes momentos do experimento e foi congelado a -80°C, após centrifugação 2000G por 15 minutos a 4°C, e armazenados em tubos Eppendorfs® a -80° C até o momento da quantificação.

2.5 Análise estatística

Foi realizada análise de medidas repetidas no tempo (One Way Repeated Measures) dentro de cada grupo individualmente para avaliação proteína total, frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura e PGE₂ no decorrer do tempo. Para células nucleadas e valor absoluto de linfócitos e neutrófilos, dentro de cada grupo no decorrer dos momentos, foi realizado o teste não paramétrico de medidas repetidas no tempo (Teste de Friedman) (P<0,05). Para comparação

dos grupos, dentro de cada momento separadamente, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando houve significância ($P < 0,05$) foi realizado o Teste de Tukey para comparação das médias e medianas ($P < 0,05$). Foi realizado o Teste de Correlação de Pearson ($P < 0,05$) entre plaquetas basal e plaquetas PRP e Leucócitos basal e Leucócitos PRP. A análise de PGE2 foi entre as médias e desvio padrão entre cada momento dos grupos.

3. Resultados

3.1 Características do PRP e LP

Os resultados da análise de plaquetas e leucócitos, e os valores referenciais do hemograma estavam dentro da normalidade, sem alterações dos valores plaquetários do sangue total. A média das plaquetas basal foi de $174.470 \pm 18.081,7$ plaquetas/ μL , e a média de concentração de plaquetas no PRP foi de $925.200 \pm 257.100,5$ plaquetas/ μL (média de 5,3 vezes a concentração basal) (Figura 4). Sendo que, a média dos leucócitos encontrados no PRP destes mesmos animais foi $2665,0 \pm 2074,4/\text{dL}$., e a média basal de leucócitos foi $8928,5 \pm 1561,6/\text{dL}$ aproximadamente 3,3 vezes menores que a concentração basal (Figura 5).

A análise estatística da relação entre a contagem plaquetas basal e a contagem de plaquetas presentes no PRP foi obtida a partir do Teste de Correlação de Pearson (Figura 4), com r (coeficiente de correlação de $-0,381$ e $P = 0,277$. Ou seja, observou-se correlação fraca e negativa, indicando que o valor de concentração de plaquetas no PRP não depende da concentração basal do PRP. Desta forma, conclui-se que independente da contagem basal plaquetária basal, o protocolo foi efetivo em concentrar plaquetas.

Na correlação entre os leucócitos basal e os leucócitos do PRP, realizada também pelo Teste de Correlação de Pearson (Figura 5) sugere que a contagem de leucócitos PRP depende da contagem do basal, porém, não concentrando os leucócitos no PRP ($r = 0,347$ e $P = 0,327$). Este resultado sugere que a contagem de leucócitos PRP depende da contagem do basal.

Plaquetas Basal x Plaquetas PRP

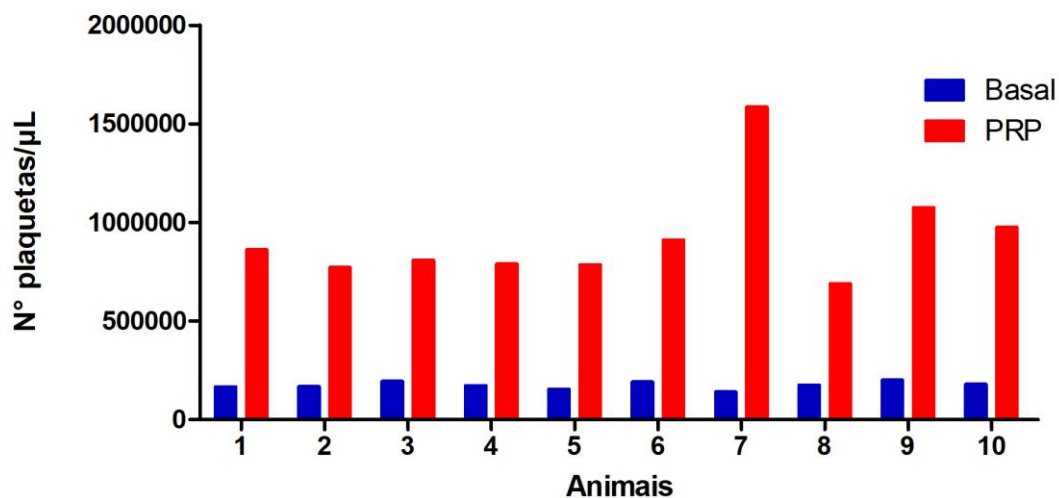


Fig. 4. Valor das plaquetas obtidas após hemograma individual/animal e comparada com valor obtido no PRP. O r (coeficiente de correlação) foi $-0,381$ e $P=0,277$.

Leucócitos Basal x Leucócitos PRP

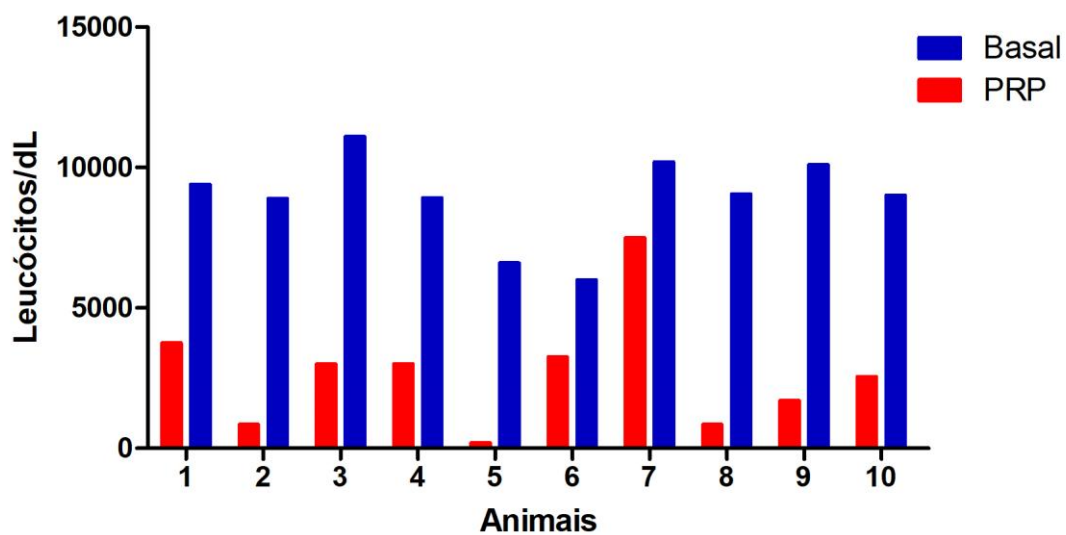


Fig. 5. Valor dos leucócitos obtidos após hemograma individual/animal e comparada com valor obtido no PRP. O r (coeficiente de correlação) foi $0,347$ e $P=0,327$.

As propriedades e características do LP são baseadas na liberação dos fatores de crescimento advindos do PRP (Doucet et al., 2005) após a ativação plaquetária. Supõe-se que no caso do LP, após passar pelo processo de congelamento (-80°C) e descongelamento (37°C) (Del Blue et al., 2016) das amostras, obtivemos o resultado de lise das plaquetas e conseqüentemente a liberação dos fatores de crescimento. Além disso, após ao descongelamento, o produto necessita ser centrifugado em alta rotação para que as membranas das plaquetas que sofreram quebras sejam depositadas no fundo do tubo. As amostras de LP desde experimento foram armazenadas em freezer -80° para futuras dosagens dos fatores de crescimento.

3.2 Avaliações físicas

3.2.1 Frequência Cardíaca

Houve aumento da frequência cardíaca (FC) apenas no grupo LP no M4, com relevância vista na clínica, porém estatisticamente não houve diferença nos ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais e demais momentos avaliados (M0, M4, M8, M24, M48 e M7D). Ao relacionar a média da FC dos momentos, e houve diferença ($p < 0,05$) nos M8 e M48 do grupo controle e foram de $41,6 \pm 3,78$ bpm e $35,0 \pm 6,04$ bpm, respectivamente, comparado aos valores deste mesmo grupo. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). (Figura 6).

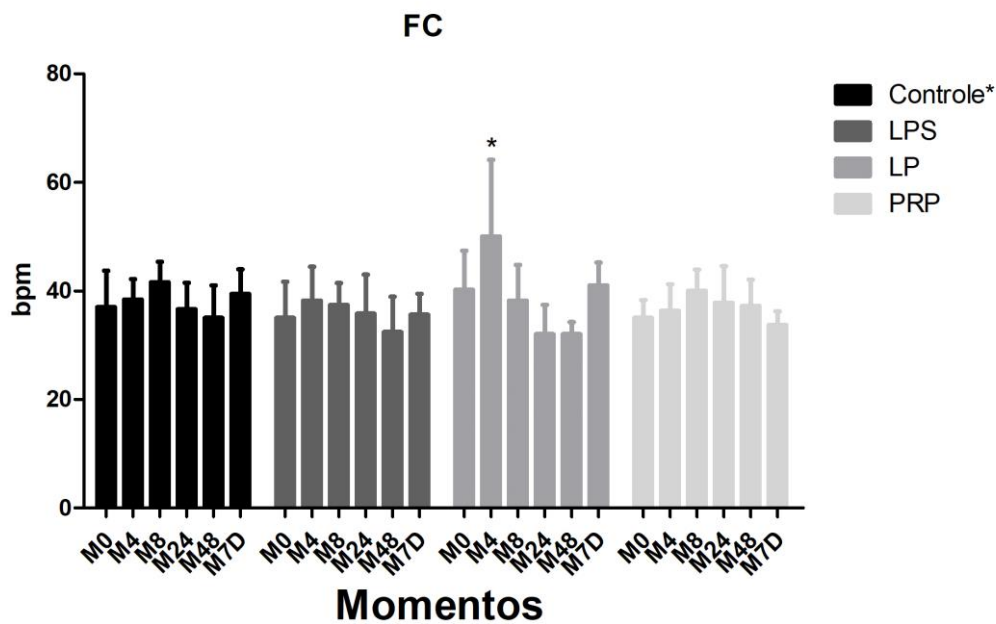


Fig. 6. Dados obtidos após análise estatística de frequência cardíaca. Média \pm Desvio padrão, $p < 0,05$ está caracterizado por *. Média \pm Desvio padrão, $p < 0,05$ está caracterizado por *.

3.2.2 Frequência Respiratória

Houve diferença estatística ($p < 0,05$) no grupo controle, no momento M0, comparado aos demais grupos estudados (Figura 7), porém não foi observado aumento relevante da frequência respiratória na análise clínica dos animais experimentais.

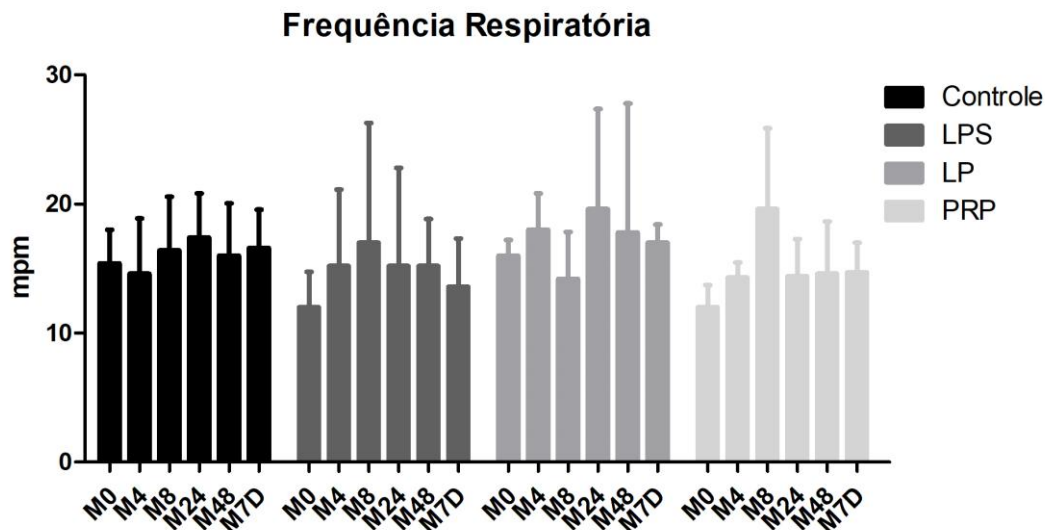


Fig. 7. Dados obtidos após análise estatística de frequência respiratória. Média \pm Desvio padrão, $p < 0,05$ está caracterizado por *.

3.2.3 Temperatura retal

Diferente dos outros parâmetros analisados, houve diferença estatística entre o M24 dos demais momentos do grupo LPS e no grupo LP, o momento M48 e M7D, porém, não houve relevância clínica observada nos animais deste grupo (Figura 8).

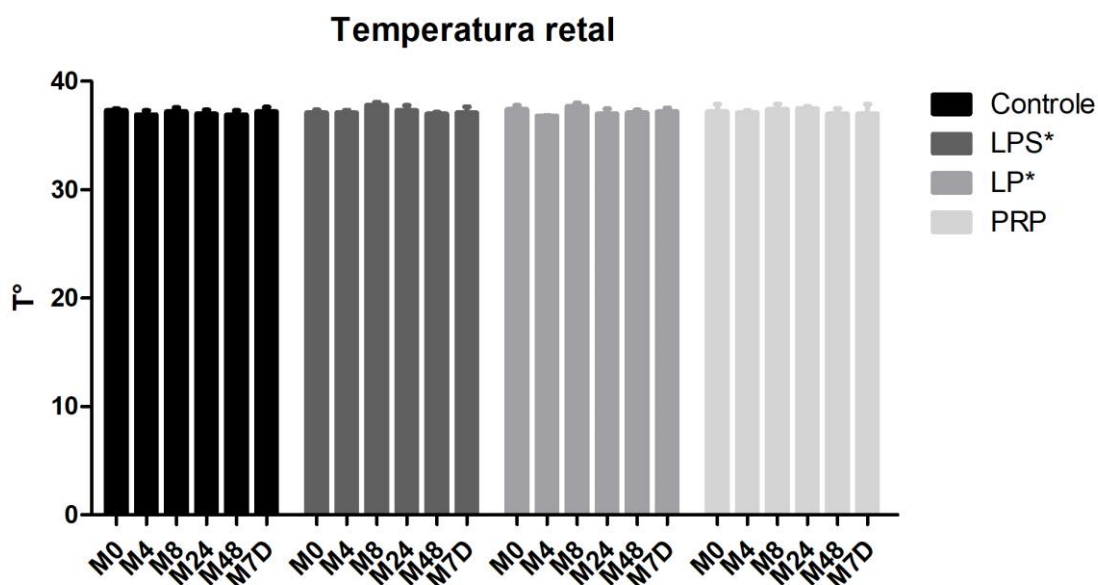


Fig. 8. Dados obtidos após análise estatística de temperatura retal. Média \pm Desvio padrão, $p < 0,05$ está caracterizado por *.

3.3 Avaliação do líquido sinovial

3.3.1 Células nucleadas e neutrófilos

Na análise estatística das células nucleadas e neutrófilos houve diferença entre o grupo controle e PRP no M8 e M24 ($p < 0,05$). (Figura 9 e 10)

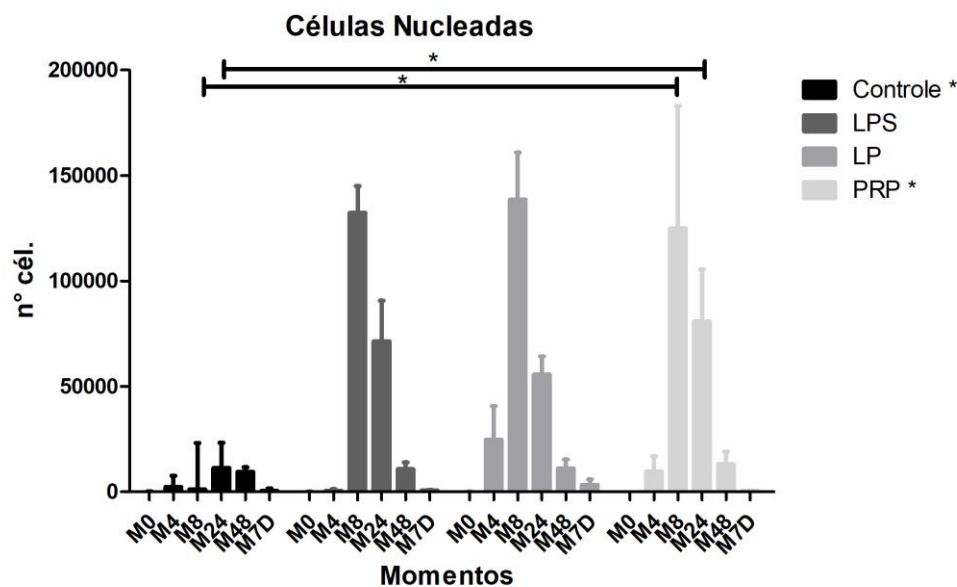


Fig.9. Avaliação do líquido sinovial pelo método de citologia: Dados estatístico relacionado a contagem de células nucleadas. Média \pm Desvio padrão, $p < 0,05$ está caracterizado por *.

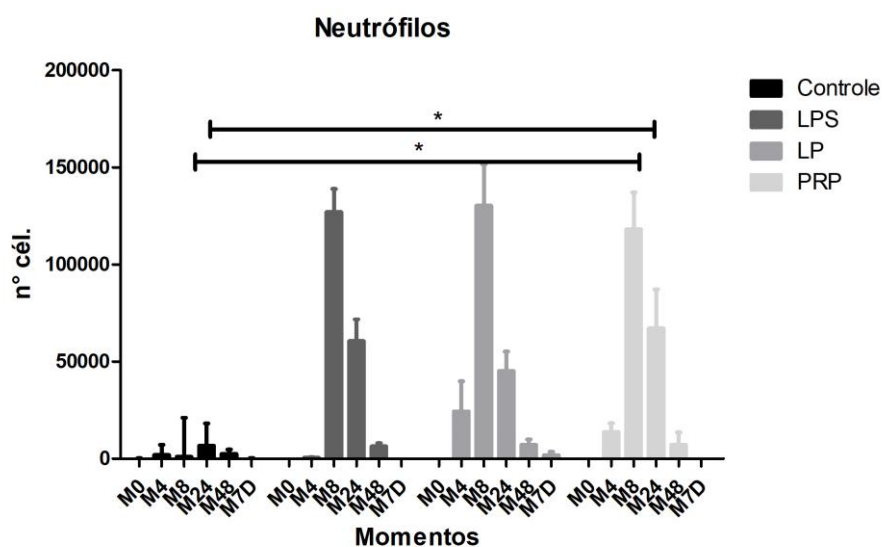


Fig. 10. Avaliação do líquido sinovial pelo método de citologia: Dados estatístico

relacionado a contagem de neutrófilos (valor absoluto). Média \pm Desvio padrão, $P < 0,05$ está caracterizado por *.

3.3.2 Proteína total

Houve diferença entre o grupo controle e os demais grupos estudados para a variável proteína total entre o grupo controle dos demais grupos (PRP, LP e LPS) nos momentos M8 e M24 ($p < 0,05$) (Figura 11).

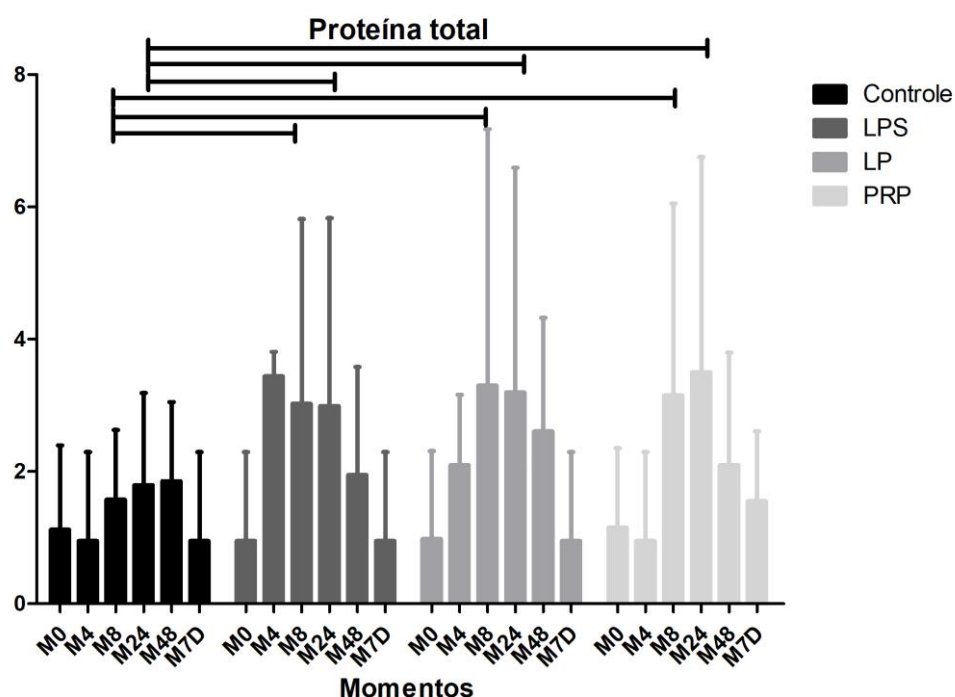


Fig. 11. Avaliação do líquido sinovial por refratômetro: Dados estatístico relacionado a proteína total. Média \pm Desvio padrão, $p < 0,05$ está caracterizado por *.

3.3.3 PGE₂

A dosagem de PGE₂ foi feita pelo valor de absorbância da amostra em 450 nm e a curva de concentração foi de 10 a 5000 pg/mL. A análise estatística da PGE₂ aponta variações estatísticas do grupo controle, grupo LP e PRP no M4 (Figura 12), e entre os momentos do grupo LP (Quadro 2 e 3).

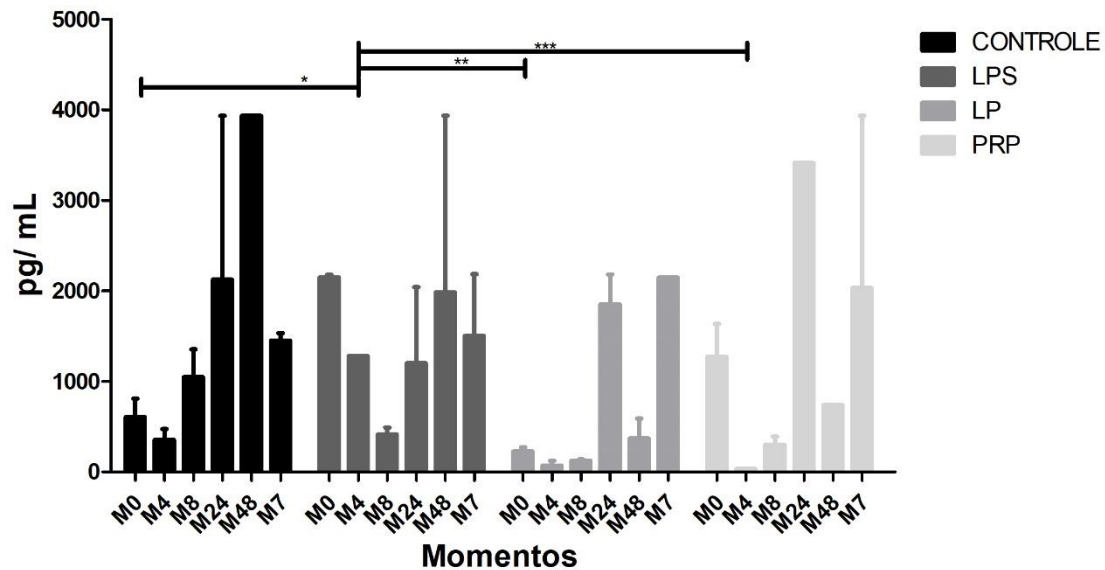


Fig. 12. Concentração de Dados PGE_2 em pg/mL do líquido sinovial obtidos após dosagem. Valores obtidos por absorbância e transformados em pg/mL. *Medias seguidas de $P < 0,05$; **Médias seguidas de $p < 0,01$; Médias Seguidas de $p = 0,0003$.

4. Discussão

Conhecido por ser um produto de fácil processamento, além de ter baixo custo (Jameson, 2006), o PRP é caracterizado pela alta concentração de plaquetas. A princípio, como descrito por Braun et al. (2014) existem diferentes protocolos para se obter o PRP, que podem variar as concentrações leucocitárias de tal modo que influenciariam a eficácia clínica. Richards et al. (2016) complementam, que a falta de um protocolo padronizado dificulta a avaliação do resultado após a aplicação intra-articular de PRP. Neste estudo houve o cuidado de utilizar um protocolo efetivo em concentrar a quantidades mínimas de leucócitos (Fontenot et al., 2012). Além disso, é sabido que após a ocorrência de lesões com comprometimento vascular, as plaquetas são recrutadas, e liberam os fatores de crescimento. O PRP tem os mesmos princípios e a partir disto, pode-se afirmar que os resultados são promissores no uso do LP, pois advêm dos fatores de crescimento que estão presentes no PRP (Xia et al., 2011).

As concentrações plaquetárias obtidas neste estudo estavam dentro do que relataram Yamada et al. (2016) que utilizaram o mesmo protocolo para

obtenção do PRP, para a aplicação intra-articular, sendo em torno de 5 vezes maior que a concentração basal (Vendruscolo et al., 2014) e dos valores fisiológicos da espécie (Marx et al., 1998) e consideradas satisfatória para obtenção de PRP dentro do controle de qualidade (Schnabel et al., 2007; Sun et al., 2010; Textor et al., 2014, Moraes et al., 2015). Outros aspectos também devem ser considerados pois algumas alterações que ocorrem nas plaquetas podem afetar o potencial de ação do PRP, como a separação do plasma da fração rica em plaquetas, ou até mesmo a centrifugação em altas rotações podem fazer com que as plaquetas rompam seus grânulos, liberando de forma prematura os fatores de crescimento (Sun et al., 2010; Middleton et al., 2012). De acordo com Gader et al. (2008) e Miranda et al. (2018) as plaquetas dos equinos são referenciadas por terem o valor basal baixo quando comparado ao homem, além disso, a liberação dos grânulos e os fatores de crescimento também são distintos, e atraídos por sítios de ligação celular específicos (Marx et al., 1998; Marx, 2004; Gader et al., 2008).

O LP tornou-se conhecido por ser uma fonte rica em fatores de crescimento de baixo custo e fácil obtenção, e semelhante ao cenário de pesquisa e uso clínico do PRP, há diversos protocolos para a produção do LP (Doucet et al., 2005; Russel e Koch, 2016). Ao processar o LP é necessário certificar-se de que o protocolo utilizado liberou de forma efetiva os fatores de crescimento no sobrenadante. Sendo que, além da centrifugação em alta velocidade necessária para a eliminação de corpos plaquetários residuais, o processo dinâmico que envolve desde o preparo do PRP até a finalização do LP pode comprometer a concentração de fatores de crescimento (Russel e Koch, 2016). Acredita-se que também deve ser considerada a fase de descongelamento e choque térmico para obter o LP, pois estimulam a liberação precoce de TGF- β (Moroz et al., 2012). Schallmoser e Strunk (2007) utilizaram o mesmo protocolo para obtenção do LP em humanos *in vitro*, e certificaram que as concentrações dos fatores de crescimento foram satisfatórias para uso clínico e utilizam este protocolo regularmente, sem dosagens rotineiras de amostras de LP.

Fontenot et al., (2012) assim como McCarrel et al. (2012) observaram que a medida que as concentrações de plaquetas aumentam, proporcionalmente as

concentrações de leucócitos diminuem, assim, a mesma proporção de plaqueta presentes no PRP está para a de leucócito.

O tipo de processamento para obtenção do PRP utilizado neste estudo foi certificado por Vendruscolo et al. (2014) e resultaram em plaquetas viáveis e intactas com ótimos níveis de fatores de crescimento. No processamento do LP, Schallmoser e Strunk (2007) manifestaram a relevância de procedimentos que preservaram as plaquetas, para que os fatores de crescimento sejam liberados de forma que possam ser ativados pelo tropismo à lesão. Wasterlain et al. (2012) inferiram que as amostras que passam por congelamento podem ter perdas ou reduções de concentração dos fatores de crescimento. Mas Montañez-Heredia et al. (2016) ressaltaram que o mecanismo físico de congelar, descongelar e a centrifugação da amostra fazem a ativação das plaquetas de forma efetiva e não alteram o conteúdo da amostra em relação a concentração dos fatores de crescimento. Garbin (2015) afirmou que as concentrações dos fatores de crescimento são dose dependente para a ação do LP.

Os protocolos utilizados para obter do LP necessitam passar por uma caracterização e controle de validade (Doucet et al., 2005), pois é necessário para garantir o uso confiável e a reprodução de um protocolo viável. Tyrnenopoulou et al. (2016) optaram em dosar as concentrações PDGF pós uso clínico em equinos. Já Russel e Koch (2016), dosaram as concentrações de PDGF em conjunto ao meio de cultivo e expansão de CTMs. Pichereau et al. (2014) ressaltam que a liberação de PDGF ocorre logo após a lise dos grânulos e que os efeitos permanecem benéficos nos tecidos que necessitam ser reparados por até 4 semanas após a aplicação, sendo que, as plaquetas participam do processo de inflamação precoce quando ocorre a desgranulação ou lise da membrana. Embora no presente estudo os fatores de crescimento do LP não tenham sido dosados, o que contribuiria para o controle de qualidade (SEO et al 2013), o protocolo do PRP foi validado por Vendruscolo et al. (2014) e Yamada et al. (2015).

Comparando o uso de LP no protocolo para a proliferação, expansão e diferenciação de células tronco mesenquimais (CTMs) na espécie humana destaca-se o aumento satisfatório das células no cultivo. No entanto, na espécie equina, há diferença entre o uso adicional ao meio de cultivo de soro fetal bovino

(SFB) e o LP, pois foram relatados que não houve diferença ou relevância quando comparado ao SFB, e são relatadas dificuldades em manter o cultivo de células autólogas com o LP autólogo (Del Blue et al. 2007; Kol et al. 2013; Mojica-Henshaw, 2013; Russell e Koch, 2015), sugerindo que a lise das plaquetas não foi efetiva, e que os fatores de crescimento não foram devidamente liberados. Anitua et al. (2014), discorrem que após a ativação dos fatores de crescimento, eles se tornam um excelente estímulo na proliferação e diferenciação de CTMs, pois os metabólitos liberados fazem fusão com a membrana fornecendo uma reação antecipada na liberação dos fatores de crescimento, efeito este que pode ser gerado pela trombina ou pelo gluconato de cálcio.

Segura et al. (2006) e Gader et al. (2008), os quais testaram diversas proteínas das plaquetas em várias espécies de mamíferos, e compararam as espécies equina e humana, constataram que a resposta das plaquetas quando estimulada à quebra da membrana foi moderadamente tardia e algumas vezes não houve a segregação dos fatores de crescimento dos equinos, sugerindo que os mecanismos de ação e liberação das plaquetas equinas são distintos quando comparados à espécie humana.

Ao relacionar os sinais clínicos observados neste experimento (FC, FR e temperatura retal) com os parâmetros clínicos dos animais saudáveis relatados em literatura (Feitosa, 2014), verificou-se que os resultados obtidos se encontravam dentro dos valores fisiológicos (Van Loon et al., 2010). Sendo que não foi possível encontrar nenhuma alteração importante que proporcionaria a relevância e preocupação individual dos animais utilizados no experimento, pois o LPS na dose de 0,25 ng aplicado nas articulações e também relatado por autores como Van Loon et al. (2010) e Lucia et al. (2013) obtiveram efeitos inflamatórios locais após a indução da sinovite aguda por LPS como esperado (aumento de células no líquido sinovial), mas não houve repercussão sistêmica como a alteração nas FC, FR e temperatura retal. Porém ao comparar os resultados estatísticos da FC, ocorreu variações no M4 do grupo LP, e variância estatística da temperatura retal do grupo LPS em relação aos outros grupos, o que não se justifica, pois não houve repercussão sistêmica e os valores de referência fisiológicos estavam dentro dos parâmetros. Neuenschwander (2016) induziu a sinovite experimental aguda em equinos no seu estudo, e referiu que

em todos os grupos houve pico de temperatura retal no momento 8 horas após a aplicação do LPS, e Lucia et al. (2013) no momento 12 horas após a primeira coleta de líquido sinovial, obtiveram o retorno aos valores basais nos momentos seguintes de coleta.

Além disso, Neuenschwander (2016) observou também que a FC e a temperatura retal aumentaram no momento 8 em todos os seus grupos. O que pode ser justificado pela resposta inflamatória sistêmica, inferindo que até o grupo controle do seu experimento, que sofreu apenas a punção da articulação em diversos momentos também apresentou picos de temperatura retal e FC levemente aumentados. Nos grupos deste experimento que receberam a administração intra-articular de LPS não apresentaram estas alterações sistêmicas, porém houve alguns picos, retornando gradativamente próximo aos valores basais nos momentos seguintes. Comparando com os resultados de Carmona et al. (2007), a avaliação física dos animais após receberem PRP foi positiva na resposta do tratamento instituído e comparando com este experimento, os grupos PRP e LP, pois não houve variância na avaliação clínica dos animais após receberem o tratamento para a sinovite experimental.

Este modelo de indução de sinovite permite de forma confiável estudar a inflamação aguda articular, principalmente quando avaliamos os aspectos clínicos locais, porém se limita à probabilidade de mimetizar a dor articular devido as condições mais crônicas que ocorrem em situações naturais (Van Loon et al., 2010). Ludwig et al. (2016) induziram a sinovite em equinos, colheram diversas amostras seriadas de líquido sinovial e em nenhum momento os animais apresentaram claudicação, nem aumento de volume local na articulação, durante o experimento.

Diversos mecanismos anormais contribuem para a progressão da OA causando estresse na cartilagem articular, além de inflamação e ações catabólicas na membrana sinovial e osso subcondral (Scanzello et al. 2012). A indução experimental de sinovite com doses baixas de LPS injetadas na articulação de equinos resultam em alterações no líquido sinovial (Palmer e Bertone, 1994). A princípio a contagem de células nucleadas características do líquido sinovial tem como referência a quantidade <1.000 células / μL . A proteína total, tem o intervalo de referência para equinos de 1,8 a 3,0 g / dL, geralmente

considerado, o normal é $<2,0$ g / dL e a presença dos neutrófilos $<10\%$ no líquido sinovial (Cowell e Tyler, 2002). O LPS causa uma curta e reversível inflamação articular em doses baixas, além disso, propicia efeitos imunológicos e inflamatórios de alta valia experimental. A curta duração da inflamação, em torno de 24-48 h, após a indução no modelo de sinovite aguda pode apresentar algumas limitações caso o intuito seja avaliar a cronicidade da inflamação (Palmer e Bertone, 1994; Ríos et al, 2015).

Por conta disso o líquido sinovial colhido neste experimento passou por diversas análises, e os resultados apontaram que houve aumento nos números de células nucleadas, neutrófilos e proteína total dos animais dos grupos que receberam a aplicação de LPS. Estes dados corroboram com os obtidos por Palmer e Bertone (1994) que obtiveram resultados semelhantes a estes e compatíveis com uma sinovite aguda nos momentos iniciais. Kol et al. (2013) induziram sinovite em equinos na articulação radiocárpica e notaram em seus resultados que após a primeira coleta, o número de neutrófilos e células nucleadas aumentaram gradativamente ao comparar os valores iniciais, além dos altos índices dos valores da proteína total logo nos primeiros momentos de coleta de líquido sinovial, após a aplicação de LPS.

Como esperado, após a indução da sinovite na articulação radiocárpica, os valores de células nucleadas, proteína total e neutrófilos aumentaram significativamente nos grupos que receberam o PRP, LPS e LP. Já no grupo controle, houve aumento significativo nos valores das células nucleadas, neutrófilos e da proteína total quando comparados com os valores de referência, sendo notório e esperado que após diversas punções seriadas da articulação estes valores se alterariam, já que apenas a punção causaria reação inflamatória local. Ludwig et al. (2016) induziram sinovite experimental aguda com LPS na dose de 0,5 ng/mL na articulação radiocárpica de equinos hípidos e semelhante ao presente estudo, não obtiveram alterações significativas nos parâmetros de exame físico (FC, FR e temperatura retal), apenas encontraram alterações na citologia do LS, como o aumento no número de células nucleadas e neutrófilos, além da proteína total que também estava aumentada, regredindo a níveis próximos aos normais após 12 horas da aplicação do LPS.

Willians et al. (2016) induziram a sinovite na articulação do carpo de equinos, aplicaram nas articulações, CTMs advindas de cordão umbilical equino e não observaram diferença no conjunto de análises sobre o líquido sinovial, após os animais receberem os tratamentos. Relataram alterações como o aumento da proteína total nos momentos 8 e 24 horas após a aplicação de LPS e CTMs, semelhante ao encontrado neste estudo, de maneira que esse aumento significativo nos grupos LP e PRP são característicos de processos inflamatórios ativos, incluindo o aumento das células nucleadas e neutrófilos no líquido sinovial que correspondem a resposta inflamatória positiva local induzida pela aplicação local de LPS (Willians et al., 2016). Wang et al. (2015) em seu experimento induziram sinovite com LPS, fizeram análise do líquido sinovial (citologia) e dosaram as concentrações de diversos marcadores inflamatórios, e obtiveram respostas inflamatórias no líquido sinovial, que foram indicadas pelo aumento de glóbulos brancos (células nucleadas e neutrófilos), além do aumento de glóbulos vermelhos e teor de proteínas. Pode-se inferir que o aumento dos neutrófilos, células nucleadas e da proteína total condizem com a literatura, em decorrência dos resultados clássicos de inflamação local presente no líquido sinovial (Wang et al., 2015; Ludwig et al., 2016; Willians et al., 2016).

Como observado por Mariani et al. (2016) os resultados deste experimento em relação aos grupos PRP e LP também não apresentaram elevação significativa, porém com diferença estatística do mediador inflamatório até o M7D, assim o efeito é transitório e (Lucia et al., 2013; Wang et al. 2016) pode-se concluir que neste estudo, os possíveis efeitos prejudiciais de curto prazo podem ser atribuídos apenas aos efeitos inflamatórios temporários, leves e auto limitante da indução da sinovite por LPS, independente do tratamento recebido.

A avaliação do líquido sinovial do grupo PRP deste experimento remete a resultados positivos se considerar que após receberam o tratamento manifestaram diminuição da contagem de células nucleadas e neutrófilos presentes. Assim deve-se levar em consideração pois Tong et al. (2017) investigaram os efeitos do PRP em fibroblastos sinoviais humanos após receberam LPS *in vitro* com o objetivo de promover o estresse catabólico no cultivo celular, e seus resultados indicaram que o PRP teve efeito anti-

inflamatório evidente, inibiu a apoptose celular e reduziu os danos induzidos pelo LPS. Assim, infere-se que este estudo realizado em outra espécie (equinos) utilizando o PRP como tratamento de sinovite induzida por LPS foi efetivo, em reduzir os efeitos inflamatórios locais da articulação. Rios et al. (2016), avaliaram a ação do PRP em cultivos de explante de membrana sinovial após receberem LPS, e sugerem que o PRP propicia efeitos anabólicos nas células e ação anti-inflamatória devido as proteínas ligadas aos fatores de crescimento presentes nos grânulos das plaquetas.

O PRP tem o intuito de aumentar a atividade anabólica dos condrócitos, das plaquetas modularem a magnitude e a duração da resposta inflamatória (Knop et al, 2016). Após a aplicação intra-articular, os fatores de crescimento continuam sendo liberados até 10 dias após a ativação (Sutter, 2007). Pois se difundem no meio extracelular ou são armazenados na matriz extracelular e na membrana basal, sendo recrutados de forma imediata ou tardia em caso de lesão tecidual. Filardo et al. (2011), revelaram que a forma de obtenção do PRP influencia no grau da reação inflamatória intra-articular. Esse efeito é atribuído ao número de leucócitos presentes no infiltrado. Carmona et al., (2009) relataram pequena efusão sinovial, sem alteração no grau de claudicação logo após a aplicação intra-articular de PRP, essas alterações regrediram depois de 48 horas. Neste experimento, foram observados que os números de células nucleadas e neutrófilos reduziram suas concentrações no líquido sinovial em momentos anteriores a 48 horas nos grupos PRP e LP, inferindo que a ação inflamatória (pós aplicação) e anti-inflamatória (ação dos fatores de crescimento) foram atendidas dentro do esperado, sem alterações em grau de claudicação dos equinos.

Naskou et al. (2018) em estudo *in vitro*, investigaram LP equino e as possíveis reações e respostas inflamatórias quando exposto a glóbulos brancos reativos (monócitos) e a indução de reações enzimáticas por LPS, e afirmaram que o LP pode desenvolver um perfil anti-inflamatório e retardar a chegada de citocinas inflamatórias locais. Sendo este um dos objetivos, sobretudo, na indicação e uso do LP em substituir de forma efetiva o PRP na aplicação intra-articular iniciada neste estudo. Poderíamos inferir então que no grupo LP houve ação anti-inflamatória, porém, a ação e o comportamento intra-articular foram

semelhantes entre os grupos PRP e LP. Sendo assim, uma área de total significância para posterior estudos exploratórios vinculados a este experimento.

Estudos de Altaie et al. (2018) sobre os efeitos de proliferação e condrogênese de CTMs advindas de líquido sinovial *ex vivo*, e na terapia única de administração LP intra-articular possibilitaram a observação de que além do efeito condrogênico, o efeito intra-articular é benéfico. Desta forma, em síntese, se relacionarmos os efeitos *ex vivo* de Altaie et al. (2018) com os resultados deste experimento *in vivo*, pode-se inferir que quando relacionamos os dados colhidos na análises do LS (neutrófilos e PT) que o LP tem alto potencial na ação anti-inflamatória (Naskou et al., 2018), também visto no PRP, pois reduziram o pico inflamatório local articular após 24 horas da aplicação, e portanto além o efeito anti-inflamatório já confirmado, há grandes possibilidades do LP ter efeito no reparo da cartilagem danificada, e poderia ser estudado em outro momento.

Tyrnenopoulou et al. (2016) utilizaram em seu ensaio clínico, equinos encaminhados para atendimento e diagnosticados com OA na articulação interfalângica distal, estes animais receberam duas aplicações de LP intra-articular com intervalos de 15 dias. O processo de congelamento e descongelamento foi feito com apenas um ciclo semelhante a este estudo, e assim posteriormente aplicados. Além disso, os animais que receberam o LP cessaram a claudicação alguns meses após a última aplicação (Tyrnenopoulou et al., 2016), e comparando a este experimento, os resultados preliminares demonstram que ação do LP foi benéfica, porém semelhante ao PRP em apenas 7 dias de avaliação.

Em literatura cita-se que valores acima de 63,5 pg/mL na concentração de PGE₂ no líquido sinovial indicariam inflamação (Kirker-Head et al., 2000; Bertone et al., 2001). De Grauw et al. (2006) observaram que animais com doenças articulares apresentavam concentrações elevadas de PGE₂ acima de 500 pg/mL.

A coleta seriada de líquido sinovial permitiu a dosagem da concentração da PGE₂ e a análise estatística apontou diferença entre o grupo controle e os grupos LP e PRP no M4, podendo-se inferir que os animais do grupo LPS tiveram uma inflamação mais severa em relação aos que foram tratados com PRP e LP ($p < 0,05$). A ação anti-inflamatória ocorreu nos grupos que receberam PRP e LP

no M4, visto que os níveis de PGE₂ não aumentaram tanto quanto os níveis dos animais que receberam somente o LPS. Porém, no M8 não se pode afirmar que houve continuidade da ação anti-inflamatória. A inflamação sinovial foi confirmada pelo aumento das concentrações de PGE₂ nos M24, no M48 e no M7D (Kol et al., 2013; Wang et al. 2015, Williams et al., 2016). A causa da inflamação sinovial, porém, não pode ser atribuída somente ao LPS, visto que Kirker-Head et al. (2000) sugeriram que PGE₂ pode ser liberada pela membrana sinovial como reflexo da inflamação sinovial após diversas punções da articulação. Isto também poderia justificar o aumento das concentrações nos momentos M8, M24, M48 E M7d dos grupos. Além disso, animais ativos e inquietos podem demonstrar picos de PGE₂ semelhantes aos animais de vida livre ou atletas, o que pode-se justificar o aumento da concentração de PGE₂ no M0 (Van Den Boom et al., 2005).

Embora Kahn et al. (2017) tenham observado o pico da concentração de PGE₂ após 8 horas da primeira coleta de líquido sinovial, o presente estudo não corroborou com tais observações. Comparando os grupos controle e LPS, notou-se significância estatística no M4, com ausência de significância no M8h, ou seja, o pico de inflamação ocorreu 4 horas após a administração de LPS.

Apesar dos níveis de PGE₂ após 48h não apresentarem diferença estatística entre os grupos LPS e controle, a melhora clínica e a diminuição da contagem total de células inflamatórias no líquido sinovial foi observada nos animais dos grupos LP e PRP e indicariam a ocorrência de um processo inflamatório de menor magnitude nestes grupos, visto que os níveis de PGE₂ podem aumentar após artrocenteses repetidas (Lucia et al. 2013), mesmo sem a administração de um agente indutor como o LPS (Van Den Boom et al., 2005).

Quando a inflamação é induzida experimentalmente com LPS, a PGE₂ permanece aumentada após 24 h da aplicação (Gibson et al., 1996). De Grauw et al. (2009) relataram o aumento acentuado e de curta duração na PGE₂ em nos animais no M8 após receberem a aplicação de LPS na dose de 0,5 ng. Comparado aos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que na dose 0,25 ng/mL, o aumento de PGE₂ ocorreu de forma lenta, evidenciado no M24 do grupo LPS. Neste estudo, também houve aumento no M8 e o pico inflamatório

da PGE₂ no M24 do grupo PRP e LP, porém apenas no grupo LP houve diferença estatística entre os momentos M4 e M7D ($p < 0,05$).

Em suma, pode-se denotar neste estudo que o tanto o PRP como o LP regrediram a inflamação transitória na articulação (Richards et al., 2016), visto na diminuição do número de células nucleadas e neutrófilos presentes no líquido sinovial após 48 horas e 7 dias de tratamento, porém nota-se que apesar da diminuição concentração de dosagem de PGE₂ após 4 horas houve aumento nos momentos seguintes, mantendo-se até 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Tendo em vista que o efeito inflamatório permaneceu, estudos posteriores focados na ação do LP e do PRP em afecções crônicas são necessários para embasar sua utilização em tais casos.

5. CONCLUSÃO

- O protocolo escolhido para o processamento do PRP neste experimento foi efetivo no objetivo de concentrar plaquetas além de não ultrapassar a contagem basal dos leucócitos presentes no PRP.
- O processamento do lisado plaquetário foi efetivo, baseado nos princípios da quebra da membrana plaquetária com ciclo térmico e centrifugações em altas rotações, embora exista certa dificuldade de comparação em função da variabilidade das técnicas de preparações descritas.
- O Lisado plaquetário intra-articular foi um procedimento seguro para os equinos, baseado na ausência de alterações clínicas significativas em sinovite induzida experimentalmente.
- Podemos inferir também que os animais dos grupos LPS, LP e PRP tiveram médias das respostas inflamatórias semelhantes após análise laboratorial do líquido sinovial.
- Também nota-se que o lisado plaquetário intra-articular promoveu uma diminuição do processo inflamatório sinovial experimental, após 24 horas da aplicação com redução da concentração de PGE₂, de forma semelhante aos resultados obtidos com o PRP, porém em ambos os grupos foi possível denotar que houve a persistência da inflamação com 7 dias.

Agradecimentos

Concessão bolsa Capes, Laboratório de Morfologia - IBB, Laboratório clínico-FMVZ.

Referências

- Altaie, A.; Baboolal, T. G.; Wall, O.; Jones, E.; Mcgonagle, D., 2018. Platelet lysate enhances synovial fluid multipotential stromal cells functions: implications for therapeutic use. *Cytherapy*, v. P. 375-384.
- Anitua, E.; Prado, R.; Padilla, S.; Orive, G., 2014. Platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering: More than just growth factors in three dimensions. *Platelets*, Early Online: 1–2.
- Barbosa, A.L.T.; Del Carlo, R. J.; Gomes, H. C.; Oliveira, A. C.; Monteiro, B. S.; Del Carlo, B. N., 2008. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. *Cienc. Rural [online]*, v.38, n.5, p.1335-1340.
- Braun, H.J.; Kim, H.J.; Chu, C.R.; Dragoo J. L., 2014. The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy. *Am J Sports Med.*, v.42, n.5, p.1204-1210.
- Bertone, A. L.; Palmer, J. L; Jones, J., 2001. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horse. *Vet. Surg., Ohio*, v.30, n.6, p.528-38.
- Bieback, K.; Hecker, A.; Kocaomer, A.; Lannert, H.; Schallmoser, K.; Strunk, D.,2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow, *Stem Cells*, v.27, p.2331–2341.
- Carmona, J.U.; Argüelles, D.; Climent F.; Prades M., 2007. Autologos platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: A preliminary pilot clinical study. *J. Equine Vet. Sci.*, v.27, n.4, p.167-170.
- Carmona, J.U.; Lopez, C.; Prades, M.,2009. Uso de concentrados autologos de plaquetas obtenidos mediante el metodo del tubo como tratamiento de ortopatias em caballos. *Arch Med Vet*, v.41 p.175-9.
- Carmona, J.U.; Lopez, C.; Giraldo, C.E., 2011. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Arch Med Vet*, v. 43, p.1-10.
- Cowell, R.L.; Tyler, R.D., 2002 *Diagnostic and hematology of the horse.* MOSBY, 2ed, p.163-170.
- de Grauw J.C., Brama P.A., Wiemer P., Brommer H., van de Lest C.H., van Weeren P.R., 2006. Cartilage-derived biomarkers and lipid mediators of inflammation in horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. *Am J Vet Res*, p.67, v.1156–1162.
- de Grauw J. C.; van de Lest, C. H.; van Weeren, P. R., 2009. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: A longitudinal experimental study. *Arthritis Res Ther.*, v.11.
- Del Bue, M.; Riccò, S.; Conti, V.; Merli, E.; Ramoni, R.; Grolli, S., 2007 Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet Res Commun.*, v. 31, p.289–292.
- Doucet, C.; Ernou. I.; Zhang, Y.; Llense, J.R.; Begot, L.; Holy, X., 2005. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, v. 205.

- Felix, M.C., 2009. "Potencial imunogênico dos biocurativos: aspectos imuno-hematológicos e leucoplaquetários". 2009. 96p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- Feitosa, F. L. F., 2014. *Semiologia veterinária: a arte de diagnóstico*. 3. ed. São Paulo: Roca.
- Fontenot, R. L.; Sink, C. A.; Werre, S. R.; Weinstein, N. M.; Dahlgren, L. A., 2012. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Can Vet J*, v.53.
- Gader, A. G. M. A.; Al Ghumlas, A. K.; Hussain, M. F.; Al Haidari, A.; White, J. G., 2008. The ultrastructure of camel blood platelets: A comparative study with human, bovine, and equine cells. *Platelets*, v.19, n.1, p 51–58.
- Garbin, L. C., 2015. Evaluation of freeze-dried platelet lysate for the prevention of pathologic changes in cartilage exposed to inflammatory conditions. *AAOS/ ORS Biologic treatments of orthopaedic Injuries Research Symposium*, 2015.
- Gibson, K. T.;Hodge, H.; Whittem, T., 1996. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. *Aust Vet J* , v.73, p.48–151.
- Ludwig, E. K.; Brandon Wiese, R.; Graham, M. R.; Tyler, A. J.; Settlage, J. M.; Werre, S. R.; Petersson-Wolfe, C. S.; Kanevsky-Mullarky, I.; Dahlgren, L. A., 2016. Serum and Synovial Fluid Serum Amyloid A Response in Equine Models of Synovitis and Septic Arthritis. *Vet Surg*, v.45, p.859-867.
- Jameson, C. A., 2007. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. *J Clin Lab Med*, v.38, n.1.
- Kahn, M. K.; Coverdale, J. A.; Leatherwood, J. L.; Arnold, C. E.; Dabareiner, R. A.; Bradbery, A. N. ; Millican, A. A.; Welsh Jr, T. H., 2017. Age-related effects on markers of inflammation and cartilage metabolism in response to an intra-articular lipopolysaccharide challenge in horses. *J Anim Sci* , v.95, p.671–680.
- Kirker-Head, C.A.; Chandna, V.K.; Agarwal, R.K.; Morris, E.A.; Tidwell, A.; O'callaghan, M.W.; Rand, W.; Kumar, M.S.A., 2000. Concentrations of substance P and prostaglandin E in synovial fluid of normal and abnormal joints of horse. *Am J Vet Res*, v.61, n.6, p.714-718.
- Kol, A.; Walker, N. J.; Galuppo, L. D.; Clark, K. C.; Buerchler, S.; Bernanke, A; Borjesson, D. L., 2013. Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. *Equine Vet J*, v.45, p.193–198.
- Knop, E.; Paula, L. E.; Fuller, R., 2016. Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. *Rev Bras Reumatol*, v.56, p.152–164.
- Landau, M., Rosenberg, N., 2011. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion*, 51(3), 558-569.
- Lucia, J. L.; Coverdale, J. A.; Arnold, C. E., Winsco, K. N., 2013. Influence of an intra-articular lipopolysaccharide challenge on markers of inflammation and cartilage metabolism in young horses. *J Anim Sci* ,v.91, p.2693–2699.
- Maia, L., 2008. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica e histopatológica. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-

- graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 78f.
- Mariani, E.; Canella, V.; Cattini, L.; Kon, E.; Marcacci, M.; Di Matteo, B.; Pulsatelli, L.; Filardo, G., 2016. Leukocyte-rich platelet-rich plasma injections do not up-modulate intra-articular pro-inflammatory cytokines in the osteoarthritic knee. *PLoS ONE*, 11(6): e0156137.
- Marx, R. E., 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, v.62, p.489-496.
- Marx, R. E.; Carlson, E. R.; Eichstaedt, R. M.; Schimmele, S. R.; Strauss, J. E.; Georgeff, K. R., 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 85, p.638-646.
- McCarrel, T.M.; Minas, T.; Fortier, L.A., 2012. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg*, v. 94-a, n.19, p. E143 (1-8).
- McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D.; Kawcak, C.E., 2012. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res*, v.1, n.11. p.297–309.
- Middleton, K. K.; Barro, V.; Muller, B.; Terada, S.; Fu, F. H., 2012. Evaluation of the effects of Platelet-Rich Plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *Iowa Orthop J*, v.32, p.150-163
- Miranda, A. L. S.; Soto-Blanco, B.; Lopes, P. R.; Victor, R. M.; Palhares, M. S., 2018. Influence of anticoagulants on platelet and leukocyte concentration from platelet-rich Plasma derived from blood of horses and mules. *J Equine Vet Sci*, v.63, p.46-50.
- Mojica-Henshaw, M.P.; Jacobson, P.; Morris, J.; Kelley, L.; Pierce, J.; Boyer, M.; Reems, J.A., 2013. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*, v.15, p.1458–1468.
- Moraes, A.P.L., 2013. Resposta ao uso intra-articular de plasma rico em plaquetas em equinos hípidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos. 2013. 130p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP).
- Montañez-Heredia, E.; Irizar, S.; Huertas, P.J.; Otero, E.; Del Valle, M.; Prat, I.; Díaz-Gallardo, M.S.; Perán, M.; Marchal, J.A.; Hernandez-Lamas, M.C., 2016. Intra-Articular Injections of Platelet-Rich Plasma versus Hyaluronic Acid in the Treatment of Osteoarthritic Knee Pain: A Randomized Clinical Trial in the Context of the Spanish National Health Care System. *Int J Mol Sci*.v.2;17.
- Moroz, A.; Bittencourt, R. A. C.; Almeida, R. P.; Felisbino, S. L.; Deffune, E., 2013. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: An improved approach in cartilage tissue engineering. *Platelets*, v. 24, n. 3, p. 219-225, 2013.
- Naskou, M. C.; Norton, N. A.; Copland, I. B.; Galipeau, J.; Peroni, J. F., 2018. Innate immune responses of equine monocytes cultured in equine platelet lysate. *Vet Immunol Immunopathol* , v. 195, p. 65-71.
- Neuenschwander, H. M., 2016. Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2016.

- Pagliosa, G.M.; Alves, G.E.S., 2007. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. *Cienc Rural, Santa Maria*, v.37, n.4, p.1202-1205.
- Palmer, J.L.; Bertone, A.L., 1994. Experimentally-induced synovitis a model for acute synovitis in the horse. *Equine Vet J*, v. 26, p.492-495.
- Pichereau, F.; Décory, M.; Ramos, G. C., 2014. Autologous platelet concentrate as a treatment for horses with refractory fetlock osteoarthritis. *J Equine Vet Sci*, v.34, p. 489–493.
- Richards, M. M.; Maxwell, J. S.; Weng, L.; Angelos, M. G.; Golzarian, J., 2016. Intra-articular treatment of knee osteoarthritis: from antiinflammatories to products of regenerative medicine. *Phys Sportsmed*, v.44, n.2, p.101-108.
- Ríos, D. L.; López, C.; Álvarez, M. E.; Samudio, I. J.; Carmona, J. U., 2015. Effects over time of two platelet gel supernatants on growth factor, cytokine and hyaluronan concentrations in normal synovial membrane explants challenged with lipopolysaccharide. *BMC Musculoskelet Disord*, v.16.
- Russell, K. A.; Koch, T. G., 2016. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture – too much of a good thing. *Equine Vet J*, v.48, p.261–264.
- Ross, T.N.; Kisiday, J.D.; Hess, T.; McIlwraith, C.W., 2012. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. *Osteoarthritis Cartilage*, v.20: 12, p.1583–1590.
- Salamanna, F., Veronesi, F., Maglio, M.; Della Bella, E.; Fini, M., 2015. New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: General overview on still open questions and outlook. *Biomed Res Int*, v.2015.
- Scanzello, C.R.; Goldring, S.R., 2012. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*, v.51, p.249-57.
- Schnabel, L.V.; Mohammed, H.O.; Miller, B.J.; Mcdermott, W.G.; Jacobson, M.S.; Santangelo, K.S.; Fortier, L. A., 2007. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.*, v.25, p. 230–240.
- Schallmoser K.; Strunk D., 2009). Preparation of Pooled Human Platelet Lysate (pHPL) as an Efficient Supplement for Animal Serum-Free Human Stem Cell Cultures. *JoVE*, v.32.
- Segura, D.; Monreal, L.; Perez-Pujol, S.; Pino, M.; Ordinas, A.; Bruges, R.; White, J. G.; Escolar, G., 2006. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *J Vet Intern Med*, v.20, p.581–588.
- Sumner, S. M.; Naskou, M. C.; Thoresen, M.; Copland, I.; Peroni, J. F., 2017. Platelet lysate obtained via plateletpheresis performed in standing and awake equine donos, *Transfusion*, v.57.
- Sun, Y.; Feng, Y.; Zhang, C. Q.; Chen, S. B.; Cheng, X. G., 2010. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop*, v.34, p.589–597.
- Seo, J.; Tsuzuki. N.; Haneda, S.; Yamada, K.; Furuoka, H.; Tabata, Y.; Sasaki, N., 2013. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum

- for *in vitro* expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*, v.95, p.693–698.
- Sutter, W. W., 2007; Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. *Clin Tech Equine Pract*, v. 6, p.198–208.
- Textor, J., 2014. Platelet-Rich Plasma (PRP) as a therapeutic agent: platelet biology, growth factors and a review of the literature. *Platelet-Rich Plasma*, Springer Berlin Heidelberg, p. 61-94.
- Tyrnenopoulou, P.; Diakakis, N.; Karayannopoulou, M.; Savvas L.; Koliakos, G., 2016. Evaluation of intra-articular injection of autologous platelet lysate (PL) in horses with osteoarthritis of the distal interphalangeal joint. *Vet Q*, v.36.
- Tong, S.; Liu, J.; Zhang, C., 2017. Platelet-rich plasma inhibits inflammatory factors and represses rheumatoid fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Int J Clin Exp Med*, v.17, p.441–449.
- Vanni, I.S.R., 2016. Obtenção, indicadores de qualidade e propriedades dos hormônios derivados de plaquetas humanas pela técnica de lisado plaquetário. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.
- Van Den Boom, R.; Van De Lest, C. H. A.; Bull, S.; Brama, P. A. J.; Van Weeren, P R.; Barneveld, A., 2005. Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. *Equine vet J*, v.37, p. 250-256.
- Van Loon, J. P.; De Grauw, J.C.; Van Dierendonck, M.; L'ami, J.J.; Back, W.; Van Weeren, P.R., 2010. Intra-articular opioid analgesia is effective in reducing pain and inflammation in an equine LPS induced synovitis model. *Equine Vet J*,v.42(5), p.412-9.
- Vendruscolo, C. P.; Alves, A. L. G.; Brossi, P. M.; Baccarin, R. Y. A. B., 2014. Uso do soro autólogo condicionado e do plasma rico em plaquetas na terapia ortopédica de equinos. *Cienc Agrar*, v. 35, n. 5, p. 2607-2624.
- Xia, W.; Li, H.; Wang, Z.; Xu, R.; Fu, Y., Zhang, X.; Ye, X.; Huang, Y.; Xiang, A.P.; Yu,; W., 2011. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow_derived stem cells. *Cell Biol. Int*, v.35, p.639-643, 2011.
- Xie, X.; Zhang, C.; Tuan, R.S., 2014. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther* v.16, n.204, p1-15.
- Wang, G.; Li, X.; Jiang, R.; Li, Y.; Fan, X.; Zheng, Y.; Gao, L., 2015.Changes in synovial fluid inflammatory mediators and cartilage biomarkers after experimental acute equine synovitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, v.59, p.129-134.
- Wasterlain, A.S.; Braun H.J.; Dragoo, J.L., 2012. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper. Tech. Orthop.* V.22, p.33-42.
- Williams, L. B.; Koenig, J. B.; Black, B.; Gibson, T. W. G.; Sharif, S.; Koch, T. G., 2016. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an lipopolysaccharide induced synovitis model. *Equine Vet J.*, v.48, p.619–625.
- Yamada, A. L. M., Carvalho, A. M. D., Oliveira, P. G. G., Felisbino, S.L.; Queiroz, D.L.; Watanabe, M.J.; Hussni, C. A.; Alves, A.L.G., 2012.

Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzida experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.2, p. 318-322.

YAMADA, A.L.M., 2015. Células tronco mesenquimais em gel de plasma rico em plaquetas associados com microfraturas no tratamento de lesões condrais articulares em equinos. 2015. 136p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

Yamada, A.L.M.; Alvarenga, M.L.; Brandão, J.S.; Watanabe, M.J.; Rodrigues, C.A.; Hussni C.A.; Alves A.L.G., 2016. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, p.461-467.

Anexo

Frequência cardíaca

Momentos	Grupos				P
	Controle	LP	LPS	PRP	
0	37,0 ± 6,74 ab	40,2 ± 7,22	35,0 ± 6,67	35,0 ± 3,32	0,519
4	38,4 ± 3,78 ab	50,0 ± 14,14	38,2 ± 6,26	36,3 ± 4,93	0,158
8	41,6 ± 3,78 a	38,2 ± 6,57	37,4 ± 4,04	40,0 ± 3,94	0,516
24	36,6 ± 4,88 ab	32,0 ± 5,43	35,8 ± 7,22	37,8 ± 6,76	0,497
48	35,0 ± 6,04 b	32,0 ± 2,24	32,4 ± 6,54	37,2 ± 4,87	0,381
7 dias	39,4 ± 4,56 ab	41,0 ± 4,24	35,6 ± 3,85	33,7 ± 2,52	0,147
P	0,026	0,070	0,462	0,298	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Frequência respiratória

Momentos	Grupos				P
	Controle	LP	LPS	PRP	
0	15,4 ± 2,61 AB	16,0 ± 1,22 A	12,0 ± 2,74 B	12,0 ± 1,73 B	0,013
4	14,6 ± 4,28	18,0 ± 2,83	15,2 ± 5,93	14,3 ± 1,16	0,809
8	16,4 ± 4,16	14,2 ± 3,63	17,0 ± 9,27	19,6 ± 6,27	0,604
24	17,4 ± 3,43	19,6 ± 7,76	15,2 ± 7,60	14,4 ± 2,88	0,515
48	16,0 ± 4,06	17,8 ± 9,99	15,2 ± 3,63	14,6 ± 4,04	0,849
7 dias	16,6 ± 2,97	17,0 ± 1,41	13,6 ± 3,72	14,7 ± 2,31	0,404
P	0,694	0,715	0,721	0,139	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Temperatura

Momentos	Grupos				P
	Controle	LP	LPS	PRP	
0	37,3 ± 0,16	37,4 ± 0,38 ab	37,1 ± 0,26 b	37,2 ± 0,68	0,793
4	36,9 ± 0,41	36,8 ± 0,07 ab	37,1 ± 0,23 b	37,1 ± 0,21	0,621
8	37,2 ± 0,38	37,7 ± 0,28 a	37,8 ± 0,27 a	37,4 ± 0,52	0,073
24	37,0 ± 0,36	37,0 ± 0,46 b	37,3 ± 0,48 ab	37,5 ± 0,17	0,234
48	36,9 ± 0,40	37,1 ± 0,26 ab	37,0 ± 0,15 b	37,0 ± 0,50	0,184
7 dias	37,2 ± 0,42	37,2 ± 0,35 ab	37,1 ± 0,54 b	37,0 ± 0,87	0,929
P	0,181	0,028	0,012	0,788	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Células nucleadas**Medianas e percentis 25 e 75%.**

Momentos	Grupos				P
	Controle	LP	LPS	PRP	
0	60,0 [17,0 – 337,5] b	50,0 [35,0 – 138,8]	50,0 [27,5 – 225,2]	48,0 [28,0 – 105,0] b	0,999
4	2375,0 [350,0 – 7625,0] ab	24750,0 [8812,5 – 40687,5]	550,0 [362,5 – 1300,0]	9700,0 [2537,5 – 16862,5] ab	0,261
8	1250,0 [62,5 – 23187,5] abB	138600,0 [98700,0 – 160912,5] AB	132300,0 [106312,5 – 145075,0] AB	124950,0 [121537,5 – 182962,5] aA	0,011
24	11340,0 [720,0 – 23350,0] aB	55650,0 [52462,5 – 64312,5] AB	71400,0 [35227,5 – 90712,5] AB	80850,0 [54600,0 – 105525,0] abA	0,037
48	9450,0 [4895,0 – 1165,0] ab	11130,0 [7586,2 – 15356,2]	10735,0 [8735,0 – 13965,0]	13230,0 [7285,019005,0] ab	0,707
7 dias	350,0 [297,5 – 1655,0] ab	3330,0 [730,0 – 5930,0]	770,0 [492,5 – 995,0]	410,0 [350,0 – 662,0] ab	0,498
P	0,030	0,080	0,084	0,019	

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Neutrófilo absoluto

Medianas e percentis 25 e 75%.

Momentos	Grupos				P
	Controle	LP	LPS	PRP	
0	4,5 [1,0 – 297,0]	3,5 [0,5 – 11,0]	13,0 [4,8 – 85,0]	1,0 [1,0 – 56,5]	0,615
4	1924,5 [153,0 – 7164,5]	24303,0 [8544,5 – 39860,8]	533,0 [331,2 – 888,5]	13716,0 [9144,0 – 18288,0]	0,129
8	1037,0 [35,5 – 21028,8] B	130284,0 [93119,2 – 151662,0] A	127008,0 [99784,0 – 138892,2] A	118146,0 [87774,8 – 137080,0] AB	0,016
24	6691,0 [39,0 – 18198,2] B	45076,0 [42633,0 – 55138,0] AB	60527,0 [25056,8 – 71757,0] AB	67105,0 [45129,0 – 87160,5] A	0,033
48	2526,0 [1347,5 – 4677,5]	7123,0 [4261,2 – 10023,5]	6361,5 [4232,5 – 8032,0]	7144,0 [4950,0 – 13584,8]	0,136
7 dias	10,0 [7,0 – 363,2]	1786,0 [7,0 – 3565,0]	8,0 [5,0 – 74,0]	29,0 [12,5 – 34,2]	0,904
P	0,097	0,416	0,084	0,416	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Proteína Total

Médias e desvio-padrão

Momentos	Grupos				P
	Controle	LP	LPS	PRP	
0	2,02 ± 0,22	1,92 ± 0,04 c	1,9 ± 0,00 b	2,0 ± 0,3 b	0,582
4	1,90 ± 0,00	2,85 ± 1,34 bc	3,7 ± 3,18 ab	1,9 ± 0,0 b	0,487
8	2,32 ± 0,83 B	6,04 ± 0,56 aA	5,0 ± 1,05 aA	5,2 ± 1,1 aA	<0,001
24	2,78 ± 0,81 B	5,60 ± 0,79 aA	5,0 ± 0,98 aA	5,8 ± 1,2 aA	<0,001
48	2,70 ± 1,01	3,82 ± 1,39 b	3,1 ± 0,79 ab	3,3 ± 0,9 b	0,483
7 dias	1,90 ± 0,00	1,90 ± 0,00 bc	1,9 ± 0,00 ab	2,3 ± 0,8 b	0,422
P	0,173	<0,001	0,005	<0,001	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Prostaglandina E₂ Médias e desvio padrão

Momentos	Grupos				P
	Controle	LPS	LP	PRP	
0	605,7 ± 287,7	2149 ± 43,52	227,5 ± 65,97	1271 ± 513,8	0,0107
4	355,1 ± 166,9**	1281 ± 0,0	69,51 ± 78,29**	34,45 ± 0,3818**	0,0005
8	1050 ± 430,1	412,6 ± 112,4	124,0 ± 22,19	300,2 ± 128,9	0,0572
24	2126 ± 2558	1201 ± 1192	1853 ± 466,0	3411 ± 0,0	0,5381
48	3935 ± 0,0	2132 ± 2549	368,5 ± 311,4*	737,6 ± 0,0*	0,1470
7 dias	1451 ± 114,8	1503 ± 966,0	2147 ± 0,0	2030 ± 2693	0,9409

*Médias seguidas de P<0,05; **Médias seguidas de P<0,01; Médias Seguidas de P=0,0003.

Prostaglandina E₂

Medianas e percentis 25 e 75%.

Momentos	Grupos			
	Controle	LPS	LP	PRP
0	605,7 [402,2 – 809,1]	2149 [2118 – 2180]	227,5 [180,8 – 274,1]	1271 [907,5 – 1634]
4	355,1 [237,0 – 473,1]	1281 [1280 – 1280]	69,51 [14,16 – 124,9]	34,45 [34,45 – 34,72]
8	1050 [745,5 – 1345]	412,6 [333,1 – 492,1]	124 [108,3 – 139,7]	300,2 [209,0 – 391,4]
24	2126 [317,3 – 3935]	1201 [358,0 – 2043]	1853 [1523 – 2183]	3411 [3411 – 3411]
48	3935 [3935 – 3935]	2132 [329,3 – 3935]	368,5 [148,4 – 588,7]	737,6 [737,6 – 737,6]
7 dias	1451 [1370 – 1532]	1503 [820,2 – 2186]	2147 [2147 – 2147]	2030 [126,1 – 3935]

*Médias seguidas de P<0,05; **Médias seguidas de p<0,01; Médias Seguidas de p=0,0003.