



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

HELENA TAVARES DUTRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PROTÓTIPO DE
BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO DE PRP EQUINO**

GOIÂNIA

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Helena Tavares Dutra

3. Título do trabalho

Desenvolvimento e Validação de um Protótipo de Baixo Custo para Produção de PRP Equino

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Eugenio Goncalves De Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 05/05/2025, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helena Tavares Dutra, Discente**, em 05/05/2025, às 23:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5346984** e o código CRC **A8EA2444**.

Referência: Processo nº 23070.019494/2025-34

SEI nº 5346984

HELENA TAVARES DUTRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PROTÓTIPO DE
BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO DE PRP EQUINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para
obtenção do título de Doutora.

Área de Concentração: Ciência Animal e Saúde Única

Linha de Pesquisa: Medicina Preventiva, Clínica, Cirurgia
e Diagnóstico

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

Comitê de orientação:

Prof.^a Dr.^a Luciana Ramos Gaston Brandstetter - EVZ/UFG

Prof. Dr. Pedro Henrique Gonçalves - IPELAB/UFG

GOIÂNIA

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Dutra, Helena Tavares
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PROTÓTIPO DE
BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO DE PRP EQUINO [manuscrito] /
Helena Tavares Dutra. - 2025.
xviii, 63 f.

Orientador: Prof. Eugênio Gonçalves de Araújo; co-orientadora
Luciana Ramos Gaston Brandstetter; co-orientador Pedro Henrique
Gonçalves.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2025.

1. cavalo. 2. impressão 3D. 3. plasma rico em plaquetas. 4. terapia
celular. 5. reparo tecidual. I. Araújo, Eugênio Gonçalves de , orient. II.
Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 389 da sessão de Defesa de Tese de **Helena Tavares Dutra** que confere o título de Doutora em Ciência Animal, na área de concentração em Ciência Animal e Saúde Única.

Aos vinte e nove dias do mês de abril do ano de dois mil e vinte e cinco, a partir das 14 horas, de forma híbrida, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “Desenvolvimento de um Protótipo de Kit para a Produção de Plasma Rico em Plaquetas para Equinos”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Eugênio Gonçalves de Araújo** (PPGCA/EVZ/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Danieli Brolo Martins** (PPGCA/EVZ/UFG), membro titular interno; Professor Doutor **Paulo José Bastos Queiroz** (PPGCA/EVZ/UFG - Memória), membro titular interno; Professora Doutora **Júlia de Miranda Moraes** (UFJ), membro titular externo à UFG; Professor Doutor **Charles Ferreira Martins** (UFPEL), membro titular externo à UFG. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Eugênio Gonçalves de Araújo, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e nove dias do mês de abril do ano de dois mil e vinte e cinco.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Desenvolvimento e Validação de um Protótipo de Baixo Custo para Produção de PRP Equino



Documento assinado eletronicamente por **Eugenio Goncalves De Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2025, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Jose Bastos Queiroz, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2025, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Júlia de Miranda Moraes, Usuário Externo**, em 29/04/2025, às 18:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danieli Brolo Martins, Professora do Magistério Superior**, em 29/04/2025, às 19:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CHARLES FERREIRA MARTINS**, **Usuário Externo**, em 30/04/2025, às 17:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5325901** e o código CRC **EDE487DF**.

Referência: Processo nº 23070.019494/2025-34

SEI nº 5325901

Dedico à Maria Rosana Tavares, por ser mãe e
pai e por me ter ensinado a escrever certo em
meio a tantas linhas tortas.

AGRADECIMENTO

Toda a minha trajetória de vida, assim como esta pesquisa, é tecida por muitas mãos que ajudam. Em meu coração, cito todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Mas, neste texto, vou agradecer àquelas que, diretamente, me ajudaram a concluir esta pesquisa.

Agradeço ao Paulo Victor pelo apoio físico, emocional e intelectual em cada etapa deste estudo. Você esteve presente em todos os momentos dessa jornada, sempre me apoiando e fazendo tudo o que era possível. Muito obrigada pelo amor e companheirismo de sempre.

Agradeço à minha mãe, Maria Rosana, à minha afilhada Eloísa, ao meu irmão Paulo Júnior e à Érica Silva, por todo o carinho e amor constantes.

Agradeço à minha equipe maravilhosa, que auxiliou na execução prática deste trabalho - sempre disposta e pronta para me ajudar: Gabriella Borges, Gabriella Pereira, Júlia Rocha, Natália Subtil e Valentina Siqueira. Meninas, obrigada por toda a dedicação, empenho e responsabilidade que assumiram durante esse período. Obrigada, principalmente, por fazerem tudo com amor. Agradeço também ao Xisto Gomes e à Laura, por seguirem firmes durante a fase em que tudo parecia dar errado. Muito obrigada pela ajuda e paciência. Kelly Arantes, muito obrigada pela ajuda com a estatística e toda orientação com o trabalho.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, Jéssica Sola e Luma Paiva, agradeço pela paciência e compreensão nos meus dias de ausência física e mental. Agradeço, em especial, à Mariana Quinan, que me cedeu o espaço para a realização de parte da pesquisa e por ser parceira e compreensiva nos meus momentos de ausência. Agradeço também a Equus Center, que, por diversas vezes, me emprestou vários alunos para auxiliar na pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, professor Eugênio, pela confiança, orientação e pelo enriquecimento do trabalho. Agradeço também à Luciana Brandstetter, por todo o conhecimento compartilhado. Você é um exemplo de profissional, e tenho muito orgulho de sempre aprender com você. Ao professor Pedro Gonçalves, agradeço imensamente pela paciência e pela disposição em executar a etapa mais desafiadora desta pesquisa. Também agradeço aos professores Charles Ferreira, Danieli Brolo, Júlia de Miranda, Rita Campebell e Paulo José pela disponibilidade e por contribuírem com meu trabalho.

Agradeço à Escola de Veterinária e Zootecnia, na pessoa do professor Adilson Damasceno, por todo o auxílio prestado. Agradeço ao PPGCA por me permitir realizar esta pesquisa.

Agradeço ao Marcos Roberto, do Rancho TA, e ao Fernando Nogueira, do Rancho Magnificent, por abrirem as portas dos haras e permitirem a utilização dos animais para a pesquisa. Muito obrigada!

E, com muito carinho, agradeço aos meus amados protagonistas desta pesquisa: Borboleta, Avatar, Quingão, Piroca, Josias, Play, Forts, Willie Nelson, Garoto, Apache, San Jay, Juan Texas, Pink, Lua, Castanho, Priori, Banqueira Leo, Angelina, Nubrax, Lindin, Fantasma, Dólar, Kiss The Moon, Makim, Pirulito, Winnin, Lambari, Yakult, Shine, Tilly, Snake, Dallas, Kaju, Little e Luna.

*“Não faz bem viver sonhando e se esquecer de
viver, lembre-se”*

Alvo Dumbledore

RESUMO

As plaquetas são moduladoras relevantes da inflamação e regeneração de tecidos. A liberação de fatores de crescimento, citocinas e moduladores da matriz extracelular pelas plaquetas promovem a revascularização do tecido danificado por meio da indução da migração, proliferação, diferenciação e estabilização das células endoteliais em novos vasos sanguíneos. Por estas razões as plaquetas estão sendo cada vez mais estudadas no campo da medicina regenerativa. O PRP, definido como um produto oriundo do sangue total que apresenta maiores concentrações de plaquetas, tem sido utilizado em diversas áreas da medicina equina para tratamento de lesões inflamatórias há vários anos e é a terapia biológica mais acessível para médicos veterinários de equinos. O objetivo desse trabalho foi produzir PRP asséptico em equinos, por meio de protótipo de kit a baixo custo e validar o protocolo e produção com o kit. Além disso também foi avaliado fatores que influenciam na qualidade do PRP. Foram realizados dois experimentos. Para produção do PRP por meio do protótipo de kit, foi utilizado tubo tipo Falcon com capacidade para 15 mL com tampa projetada e confeccionada em impressora 3D, modelo ender s1, em filamento em ácido polilático. No experimento 1 foram selecionados 26 equinos da raça Quarto de Milha e produzido PRP de cada animal. Foi realizado hemograma e dosagem de proteína total e frações, aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase, bilirrubina total e frações, ureia e creatinina. O PRP foi analisado em relação a contagem de leucócitos totais, hemácias e plaquetas; ao volume produzido; submetido à cultura; e à quantificação de PDGF por meio de ELISA. Com os resultados obtidos, concluiu-se que protótipo para produção de PRP produzido e utilizado por esse estudo é capaz de produzir concentrado de plaquetas estéril, com baixa contagem de hemácias e leucócitos. O volume de PRP produzido é suficiente para infiltração de lesões musculoesqueléticas em equinos. Para o segundo experimento, foram selecionados 12 equinos da raça Quarto de milha e realizado PRP por dois métodos, o Método 1 com o kit proposto e Método 2 com tubos de vidro (BD Vacutainer®ACD 8,5 mL). As amostras de sangue para cada método foram separadas em três tempos de processamento: T1: as amostras foram processadas em até 1 hora após coleta; T2: as amostras foram processadas em 2 horas após a coleta; T4: as amostras foram processadas em 4 horas após coleta. Concluiu-se com os resultados do segundo experimento que protótipo de kit para produção de PRP, Método 1, foi eficaz em produzir um concentrado de plaquetas, garantindo contagem de plaquetas significativamente maior que o Método 2. O tempo entre a coleta de sangue e o início do processamento do PRP afeta diretamente concentração final de plaquetas do PRP, com tempo de quatro horas induzindo menores contagens de plaquetas, nos dois métodos testados.

Palavras-chave: cavalo, impressão 3D, PRP, terapia celular, reparo tecidual.

ABSTRACT

Platelets are important modulators of inflammation and tissue regeneration. The release of growth factors, cytokines, and extracellular matrix modulators by platelets promotes revascularization of damaged tissue by inducing endothelial cell migration, proliferation, differentiation, and stabilization in newly formed blood vessels. For these reasons, platelets have been increasingly studied in the field of regenerative medicine. Platelet-rich plasma (PRP), defined as a blood-derived product with higher concentrations of platelets, has been used for several years in various areas of equine medicine to treat inflammatory lesions and is the most accessible biological therapy for equine veterinarians. The overall objective of this study was to produce aseptic PRP in horses using a low-cost prototype kit and to validate both the protocol and the kit-based production. Additionally, factors influencing PRP quality were evaluated. Two experiments were conducted. For PRP production using the prototype kit, 15 mL Falcon-type tubes with a custom-designed cap were used. The caps were produced with a 3D printer (Ender S1 model) using polylactic acid filament. In the first experiment, 26 Quarter Horse horses were selected, and PRP was produced from each animal. A complete blood count, total protein and fractions, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, total and fractionated bilirubin, urea, and creatinine were analyzed. PRP samples were evaluated for total leukocyte, erythrocyte, and platelet counts; volume produced; sterility (culture); and PDGF quantification by ELISA. The results indicated that the prototype used in this study was capable of producing a sterile platelet concentrate with low red and white blood cell counts. The volume of PRP produced was sufficient for infiltration into musculoskeletal lesions in horses. In the second experiment, 12 Quarter Horses were selected, and PRP was produced using two methods: Method 1 with the proposed kit, and Method 2 using commercial glass tubes (BD Vacutainer® ACD 8.5 mL). Blood samples for each method were processed at three different time points: T1: within 1 hour post-collection; T2: 2 hours post-collection; T4: 4 hours post-collection. The second experiment demonstrated that the prototype kit (Method 1) was effective in producing a platelet concentrate, resulting in significantly higher platelet counts compared to Method 2. Additionally, the time between blood collection and PRP processing directly affected the final platelet concentration, with a four-hour delay resulting in lower platelet counts in both methods tested.

Keywords: cell therapy, equine, PRP, tissue repair, 3D printing.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Plaqueta humana discoide e sua membrana plasmática de aparência rugosa.....	5
FIGURA 2 - Plaqueta equina contendo muitos grânulos α (A), corpos densos (BD), Complexo de Golgi (Go) e grânulos de glicogênio (GI).....	6
FIGURA 3 - Esquema representativo dos estágios da ativação plaquetária.....	8
FIGURA 4 - Esquema de plaquetas em repouso, alteração da forma e agregação	9

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Tampa para tubo Falcon de 15 mL para coleta de PRP, confeccionada em impressora 3D.....	35
FIGURA 2 -Tubo Falcon de 15 mL acoplado à tampa personalizada produzida em impressora 3 D para processamento de PRP em sistema semifechado.....	35
FIGURA 3 - Colorações do Plasma rico em plaquetas equino	39
FIGURA 4 - Presença de botão de plaquetas e hemácias no fundo do tubo Falcon, após a segunda centrifugação	39
FIGURA 5 - Gráfico representativo para a correlação positiva entre as plaquetas do sangue total e plaquetas do PRP em equinos.....	40
FIGURA 6 - Gráfico representativo da correlação positiva entre as hemácias do sangue total e plaquetas do PRP em equinos.....	40
FIGURA 7 - Gráfico representativo da concentração de PDGF no plasma e PRP de equinos.	41

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Componentes do protótipo de Kit utilizado para obtenção do Plasma Rico em Plaquetas pelo Método 1.....	52
FIGURA 2 - Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias do sangue total (ST) e PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em equinos.....	54
FIGURA 3 - Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de hemácias no PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em três tempos de processamento.	54

FIGURA 4 - Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de leucócitos no PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em três tempos de processamento.	55
FIGURA 5- Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de plaquetas no PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em três tempos de processamento.	55
FIGURA 6 - Formação do botão plaquetário após a segunda centrifugação (A) Presença de botão de plaquetas e hemácias. (B e C) Ausência de formação do botão de plaquetas e hemácias em PRP produzido pelo Método 1.....	56

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

TABELA 1 - Avaliação celular e incremento plaquetário do Plasma Rico em Plaquetas em 26 cavalos	37
---	----

LISTA DE QUADROS**CAPÍTULO 1**

QUADRO 1 - Principais fatores de crescimento e citocinas armazenados nos grânulos α das plaquetas e suas funções. 13

CAPÍTULO 2

QUADRO 1 - Relação dos materiais utilizados para a produção de PRP em cada animal..... 41

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACD	- ácido citrato dextrose
ADP	- difosfato de adenosina
AMR	-receptor Ashwell-Morell
bFGF	- fator de crescimento fibroblástico
BMPs	- proteínas morfogenéticas ósseas
Ca ²⁺	- íon cálcio
CMS	- células musculares lisas
CTGF	-fator de crescimento de tecido conjuntivo
CTM	-células tronco mesenquimal
DNA	- ácido desoxirribonucleico
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EGF	- fator de crescimento epidermal
FcR-IIA	- receptor de imunoglobulina humana IIA
FvW	- fator de <i>von Willebrand</i>
GP	- glicoproteína
HGF	- fator de crescimento de hepatócitos
IGF-1	- fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	-interleucina 1
K ⁺	- íon potássio
L-PRP	-plasma rico em plaquetas e rico em leucócitos
MEC	-matrix extracelular
Mg ²⁺	- íon magnésio
MMPs	-metaloproteinases de matriz
NAP-2	-peptídeo ativador de neutrófilos 2
OA	- osteoartrite
PGE ₂	- prostaglandina E ₂
PL	-lisado de plaquetas
PRF	-fibrina rica em plaquetas
PRP	- plasma rico em plaquetas
RER	- retículo endoplasmático rugoso
RNA _m	-ácido ribonucleico mensageiro
SCA	- sistema canalicular aberto
SDF-1 α	- fator derivado de células estromais 1 α
SDM	- sistema de demarcação de membrana
TCIPA	- agregação plaquetária induzida por células tumorais
TGF- β	- fator de crescimento transformador β
TNF- α	- fator de necrose tumoral
TPO	- trombopoietina
TXA ₂	- tromboxano A ₂
VEGF	- fator de crescimento endotelial vascular
WBC	-contagem de glóbulos brancos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PLAQUETÁRIO.....	3
2.2 REGULAÇÃO DA TROMBOPOIESE	4
2.3 ESTRUTURA PLAQUETÁRIA.....	4
2.4 ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA	8
2.5 FUNÇÃO PLAQUETÁRIA.....	10
2.5.1 REPARO VASCULAR.....	10
2.5.2 RESPOSTAS ANTIMICROBIANAS.....	11
2.5.3 SECREÇÃO DE PLAQUETAS EM DOENÇAS NEOPLÁSICAS.....	12
2.5.4 FATORES DE CRESCIMENTO DERIVADOS DE PLAQUETAS E O REPARO TECIDUAL	12
2.6 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	14
2.6.1 CLASSIFICAÇÃO DO PRP	15
2.6.2 ATIVAÇÃO DO PRP	15
2.6.3 ANTICOAGULANTES NO PRP	16
2.6.4 USO CLÍNICO DO PRP EM EQUINOS.....	16
A) FERIDAS CUTÂNEAS	16
B) TENDINITE E DESMITE	17
C) LAMINITE.....	17
D) DOENÇA ARTICULAR	18
E) ENDOMETRITE	19
3. CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2 – VIABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE PROTÓTIPO DE KIT PARA PRODUÇÃO MANUAL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM SISTEMA SEMI-FECHADO	32
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	42

CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 3 – PROTÓTIPO DE KIT É MAIS EFICIENTE PARA A OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS QUE MÉTODO MANUAL TRADICIONAL.	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO.....	58
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As plaquetas foram identificadas no final do século XIX, ainda que a autoria da primeira descrição não seja clara. Apesar da incerteza se eram elementos naturais do sangue ou estruturas exógenas, Osler descreveu as plaquetas em seu trabalho em 1873 e 1874, reconhecendo sua estrutura e seu comportamento na circulação (Osler, 1874). O tamanho pequeno desses elementos celulares é inversamente proporcional à sua grande importância em muitos processos fisiopatológicos, incluindo trombose, hemorragia, inflamação, reparo tecidual, defesa antimicrobiana, angiogênese, crescimento tumoral e metástase (Castro et al., 2006). Além disso, a capacidade de responder rapidamente a lesões e liberar substâncias que atuam em diversas vias, mostra sua versatilidade e estimula cada vez mais estudos sobre seus componentes e funções, bem como sua exploração molecular (Xu et al., 2016).

Evidências clínicas e experimentais apontam que as plaquetas são moduladoras relevantes da inflamação e regeneração de tecidos. A liberação de fatores de crescimento, citocinas e moduladores da matriz extracelular pelas plaquetas promovem a revascularização do tecido danificado por meio da indução da migração, proliferação, diferenciação e estabilização das células endoteliais em novos vasos sanguíneos. Por estas razões as plaquetas estão sendo cada vez mais estudadas no âmbito da medicina regenerativa (Etulain, 2018).

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP), definido como um produto oriundo do sangue total, que apresenta maiores concentrações de plaquetas, tem sido utilizado há aproximadamente 20 anos em diversas áreas da medicina equina para tratamento de lesões inflamatórias. O PRP é a terapia ortomolecular mais amplamente investigada na literatura veterinária (McCarrel, 2023) e a terapia biológica mais acessível para médicos veterinários de equinos.

O PRP pode ser obtido por métodos manuais ou por meio de sistemas comerciais (Colombo et al., 2022; Alvarez et al., 2020). Até o momento desta pesquisa, não há registro de um sistema comercial brasileiro voltado à produção de PRP para equinos. Os kits importados, além de apresentarem custo elevado, geralmente requerem centrífugas específicas para o seu preparo.

Diante disso, o desenvolvimento de um kit nacional, de baixo custo, por meio de prototipagem 3D, representa uma importante iniciativa para viabilizar a produção de PRP autólogo equino com qualidade. Essa inovação no campo da medicina veterinária pode

oferecer aos profissionais uma alternativa terapêutica segura e eficaz, tanto em ambientes hospitalares quanto no manejo a campo, dispensando a necessidade de encaminhamento a centros especializados.

Apesar de todo esforço para esclarecer pontos básicos em relação ao PRP, inúmeras questões ainda permanecem. Esta tese está organizada em quatro capítulos: o capítulo 1 consiste em uma revisão narrativa abordando aspectos gerais das plaquetas e do PRP; os capítulos 2 e 3 apresentam, respectivamente, a descrição metodológica, os resultados obtidos e a discussão dos experimentos realizados ao longo do estudo; e o capítulo 4 contempla as considerações finais, reunindo as principais conclusões da pesquisa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Formação e desenvolvimento plaquetário

As plaquetas de mamíferos são pseudocélulas derivadas do citoplasma dos megacariócitos da medula óssea, os quais constituem a única célula hematopoiética poliploide. Os megacariócitos, que produzem e liberam plaquetas na circulação, são células precursoras altamente especializadas, descendentes de células-tronco pluripotentes e sofrem múltiplas replicações de DNA sem divisões celulares pelo processo de endomitose (Cunin; Nigrovic, 2019). Concluída a endomitose, os megacariócitos iniciam uma fase de expansão citoplasmática rápida, caracterizada pela formação de um elaborado sistema de demarcação de membrana (SDM), que resulta no acúmulo de proteínas citoplasmáticas e grânulos essenciais para a função plaquetária. Para descrever os estágios finais de desenvolvimento das plaquetas e sua liberação, foram propostos três modelos a partir do SDM: brotamento de plaquetas, fragmentação citoplasmática e formação de pró-plaquetas (Michelson, 2013).

Na hipótese de brotamento de plaquetas, estas se formam após se desprenderem das bolhas projetadas na periferia dos megacariócitos. No modelo de fragmentação citoplasmática, o SDM define campos de tamanho de plaquetas predeterminados no citoplasma de megacariócitos. As plaquetas se formam quando o citoplasma se divide ao longo dessas linhas de fragmentação do SDM. Já no terceiro modelo proposto, há a formação de pró-plaquetas. As pró-plaquetas são definidas como extensões citoplasmáticas longas e delgadas que aparecem como grânulos do tamanho de plaquetas, unidos por finos filamentos citoplasmáticos. Nesse modelo, o SDM funciona principalmente como um reservatório de membrana para extensão de pró-plaquetas. Esse último modelo é o mais aceito atualmente (Thon; Italiano, 2012).

As proplaquetas se desenvolvem em formato espiralado, começando nas regiões periféricas e avançando em direção ao núcleo celular. Elas se apresentam como filamentos longos e ondulados, que se rompem ao entrarem na corrente sanguínea devido às forças de cisalhamento. Esse estresse mecânico, presente nos sinusoides da medula óssea, provavelmente contribui para a fragmentação das proplaquetas originadas dos megacariócitos, especialmente após sua projeção através do subendotélio. Acredita-se que a ativação dessas estruturas seja impedida pela liberação de grandes porções do citoplasma diretamente para o lúmen dos vasos sinusoidais. O processo de formação das proplaquetas utiliza completamente o citoplasma do megacariócito, restando apenas o núcleo, que posteriormente segue em uma via de apoptose (Brooks et al., 2022).

Em humanos, um único megacariócito pode dar origem a 1000-3000 plaquetas antes que o material nuclear residual seja eliminado por fagocitose mediada por macrófagos (Stenberg; Levin, 1989)

Embora os megacariócitos sejam produzidos na medula óssea, em humanos eles podem migrar para a corrente sanguínea e, como consequência, há formação de plaquetas também em locais não medulares, incluindo pulmões e sangue (Lefrançais; Looney, 2019; Michelson, 2013). Além disso, em camundongos adultos o baço é considerado um órgão hematopoiético primário, e gera todas as linhagens celulares, incluindo megacariócitos (Brooks et al., 2022)

2.2 Regulação da trombopoiese

O regulador primário da produção de plaquetas é a trombopoietina (TPO), uma glicoproteína produzida principalmente no fígado e em menor extensão nos rins e pelas células estromais medula óssea (Brooks *et al.*, 2022; Kaushansky, 2005). Os receptores de TPO estão localizados em plaquetas, megacariócitos e células endoteliais vasculares. Em condições de estado estacionário, a TPO é produzida constitutivamente e se liga ao seu ligante c-Mpl nas plaquetas e megacariócitos. A TPO ligada é internalizada e degradada, ficando indisponível para estimular a trombopoiese acima dos níveis de estado estacionário. A produção de TPO também é regulada pela captação de plaquetas senescentes (Brooks et al., 2022).

As plaquetas podem ser depuradas via degradação do glicano, no processo de senescência, por mecanismos apoptóticos e também por anticorpos. As plaquetas senescentes perdem ácido siálico, um componente da membrana celular, e são eliminadas via receptor AMR hepático. A remoção dessas plaquetas privadas de ácido siálico conduz a expressão de RNAm de trombopoietina hepática e estimula a produção de megacariócitos e plaquetas, caracterizando um mecanismo de *feedback*. Os processos apoptóticos envolvendo as plaquetas são dependentes da interação entre os receptores da família Bcl-2, que são reguladores da via apoptótica intrínseca. Ainda não está claro, mas teoriza-se que os membros da família Bcl-2 alteram o conteúdo de ácido siálico na superfície das plaquetas. A eliminação de plaquetas mediada por anticorpos é relacionada principalmente por anticorpos direcionados à integrina plaquetária $\alpha\text{IIb}\beta_3$ e /ou ao complexo GPIb-IX (Grozovsky; Giannini; Hoffmeister, 2017).

2.3 Estrutura plaquetária

As plaquetas são pseudocélulas pequenas e anucleadas, e nos equinos possuem estrutura que varia de redonda, oval ou alongada e diâmetro de 2,5 a 3,5 μm (Satué; Gardón; Muñoz, 2017). As plaquetas dos equinos são menores que as plaquetas humanas. Sua estrutura interna, de maneira geral, é dividida em zona periférica, zona sol-gel, zona de organelas e sistema membranar (Castro et al., 2006; Gremmel; Frelinger; Michelson, 2024).

A zona periférica (membrana plasmática) é composta pelo glicocálice, bicamada lipídica e sub-membrana. A membrana plasmática das plaquetas é relativamente lisa em comparação com a dos leucócitos, porém imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram uma aparência fina e rugosa, semelhante aos giros e sulcos na superfície do cérebro (FIGURA 1). A camada externa mais espessa é o glicocálice. A superfície externa, juntamente com outros constituintes da zona periférica, não tem a função única de barreira para separar o conteúdo interno das plaquetas do meio externo. Em vez disso, é uma estrutura muito dinâmica, que funciona como sítio do primeiro contato com outras estruturas e agonistas, sendo capaz de detectar mudanças no compartimento vascular. O glicocálice é coberto com receptores de glicoproteínas (GP), que são necessários para facilitar a adesão plaquetária a uma superfície danificada, desencadear a ativação completa das plaquetas, promover a agregação plaquetária e interação com outros elementos celulares e acelerar o processo de retração do coágulo (Gremmel; Frelinger; Michelson, 2024).

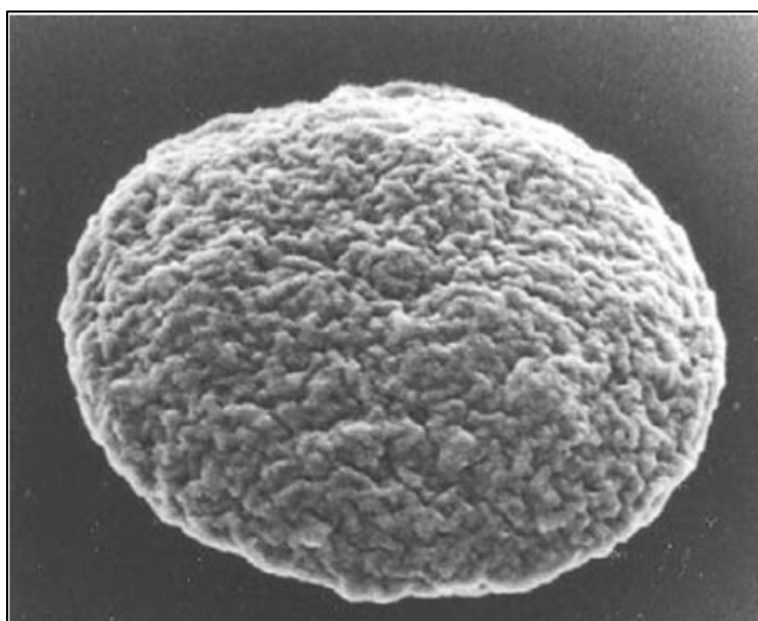


FIGURA 1 - Plaqueta humana discoide e sua membrana plasmática de aparência rugosa. Microscopia eletrônica de varredura (330.000 X).

Fonte: Michelson (Michelson, 2013)

Abaixo do glicocálice repousa a bicamada lipídica, uma membrana unitária típica e desempenha um papel extremamente importante na aceleração da coagulação, função não compartilhada por outras células na circulação sanguínea (Michelson, 2013). A área da submembrana contém um sistema de filamentos finos, semelhantes aos filamentos de actina, que têm um papel importante na mudança de forma das plaquetas e na translocação de receptores e partículas na superfície externa da célula (Castro et al., 2006).

A Zona Sol-Gel é definida como a matriz interna da plaqueta, que se assemelha a um gel, onde estão dispersas as organelas e outras estruturas internas (Michelson, 2013). Ela se encontra abaixo da zona periférica e contém microtúbulos e microfilamentos organizados, glicogênio e algumas pequenas vesículas. Os microtúbulos são dispostos em bobinas circunferenciais perto da parede celular, formando um sistema que suporta o citoesqueleto. Este, por sua vez, fornece a sustentação para a forma discoide da plaqueta. O sistema contrátil, também presente na zona Sol-Gel permite, quando ativada a mudança da forma discoide, o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares (Castro et al., 2006; Gremmel; Frelinger; Michelson, 2024).

A Zona de Organelas consiste basicamente em organelas secretoras. As plaquetas contêm três tipos principais dessas organelas, incluindo grânulos α , corpos densos (grânulos δ) e lisossômicos. Além disso, embora em menor quantidade, também são encontradas mitocôndrias, importantes para metabolismo energético, glicosomos, cadeias e aglomerados de elétrons densos, inclusões tubulares e corpos multivesiculares (Chen et al., 2017; Gremmel; Frelinger; Michelson, 2024; Michelson, 2013) (FIGURA 2).

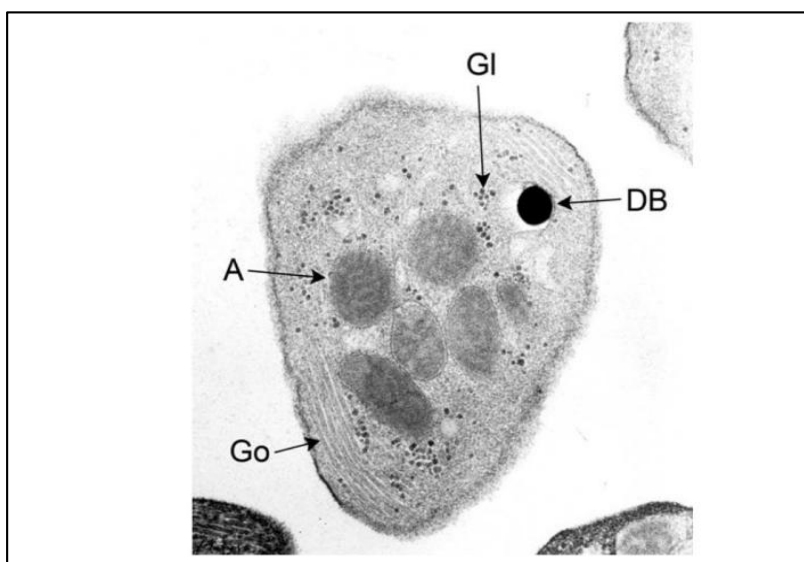


FIGURA 2 - Plaqueta equina contendo muitos grânulos α (A), corpos densos (BD), Complexo de Golgi (Go) e grânulos de glicogênio (GI). Microscopia eletrônica de transmissão (50.000 X).

Fonte: Segura (Segura et al., 2006)

Os grânulos plaquetários são organelas secretoras que, após ativação e por meio de exocitose, liberam diversas moléculas que são biologicamente ativas com propriedades específicas. Os grânulos α têm forma redonda a oval, sendo encontrados 50 a 80 em cada plaqueta humana. Eles contêm diversas moléculas como proteínas integrais de membrana, fatores de coagulação, fatores anticoagulantes, proteínas fibrinolíticas, proteínas de adesão, fatores de crescimento, fatores angiogênicos, inibidores teciduais, proteínas microbidas e mediadores imunológicos. Estes estão envolvidas em vários processos, incluindo adesão celular, coagulação, inflamação, angiogênese, defesa do organismo e mitogênese (King; Reed, 2002).

Os grânulos densos são quase dez vezes menos abundantes do que os grânulos α e exibem grande variabilidade morfológica, predominando uma estrutura esférica cercada por um espaço vazio. No entanto, em alguns casos, esse espaço possui filamentos ou são preenchidos com uma substância semelhante a grânulos. Os grânulos densos contêm moléculas pequenas e comparativamente poucas proteínas, que exercem funções principalmente na hemostasia, trombose e inflamação. São exemplos de grânulos densos os do tipo cátions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}), nucleotídeos (trifosfato de adenosina, trifosfato de guanosina, difosfato de adenosina, guanosina difosfato), fosfatos (polifosfato, pirofosfato) e aminas bioativas (serotonina e histamina) (Jurk, 2017; Michelson, 2013).

Os lisossomos de plaquetas, assim como aqueles presentes em outros tipos de células, contêm enzimas envolvidas na degradação de proteínas, carboidratos e lipídios. A classe mais abundante são as hidrolases ácidas. As membranas lisossomais contêm proteínas que são altamente glicosiladas, contribuindo para a função protetora da membrana lisossomal (King; Reed, 2002).

O Sistema Membranoso compreende complexos de Golgi, o sistema canalicular aberto conectado à superfície (SCA), o sistema tubular denso e o retículo endoplasmático rugoso (RER) (Gremmel; Frelinger; Michelson, 2024). O sistema tubular denso, os canais RER e os complexos de Golgi estão presentes como formas residuais em menos de 1% das plaquetas maduras circulantes, ou em algumas situações, quando as plaquetas sofrem rápida renovação, pois são sistemas que fazem parte da formação e desenvolvimento plaquetário (Michelson, 2013). O SCA é composto por invaginações da membrana superficial através do citoplasma, as quais são responsáveis pela troca de moléculas com o meio externo após a ativação das plaquetas. O SCA também pode atuar absorvendo partículas, como vírus e

bactérias, e essa atividade geralmente resulta na ativação plaquetária (Brooks *et al.*, 2022). Equídeos e ruminantes não possuem SCA e as plaquetas dessas espécies não expandem sua área de superfície durante a ativação, não tem um mecanismo de absorção de partículas e liberam seu conteúdo de grânulos pela fusão direta com o meio externo (Brooks *et al.*, 2022).

2.4 Ativação plaquetária

A principal função fisiológica das plaquetas circulantes é detectar danos às paredes dos vasos sanguíneos, realizada por meio da expressão de receptores de superfície. Quando o dano é identificado, a ativação plaquetária ocorre rapidamente após a exposição a estímulos químicos conhecidos como agonistas. Muitos agonistas são gerados, expressos ou liberados nos locais de lesão endotelial ou após ativação da cascata de coagulação. Eles se diferem quanto à sua capacidade de induzir a ativação plaquetária. A trombina, o colágeno e o tromboxano A₂ (TXA₂) são os principais agonistas e podem produzir adesão independentemente da secreção de grânulos plaquetários. O difosfato de adenosina (ADP) e a serotonina são agonistas intermediários e requerem secreção de grânulos de outras plaquetas para agregação irreversível. Já a epinefrina é considerada eficaz na ativação plaquetária apenas em concentrações suprafisiológicas (Quinn; Fitzgerald, 2005). Embora muitas moléculas tenham demonstrado causar ativação plaquetária *in vitro*, a ativação plaquetária *in vivo* é principalmente iniciada por colágeno e trombina (Blockmans; Deckmyn; Vermylen, 1995).

Além disso a ativação também pode ocorrer como resultado do estímulo físico de alta tensão de cisalhamento de fluidos, sendo mediada pelo fator de *von Willebrand* (FvW) e os receptores plaquetários GPIb/IX/V e GPIIb-IIIa. O processo de ativação plaquetária pode ser dividido em três estágios sobrepostos: iniciação, extensão e perpetuação (Quinn; Fitzgerald, 2005) (FIGURA 3).

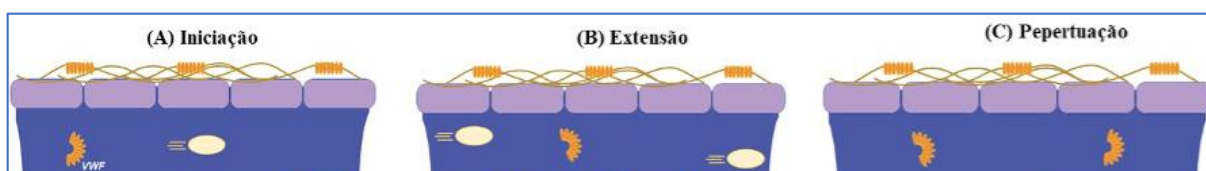


FIGURA 3 - Esquema representativo dos estágios da ativação plaquetária. (A) Iniciação. O desenvolvimento do tampão plaquetário é iniciado pela trombina e pelo complexo colágeno-fator de *von Willebrand*, que captura e ativa as plaquetas em movimento. As plaquetas aderem e se espalham, formando uma monocamada. (B) Extensão. O tampão plaquetário é estendido à medida que plaquetas adicionais são ativadas, por meio da liberação ou secreção de TXA₂, ADP e outros agonistas plaquetários. As plaquetas ativadas agregam umas às outras por meio de pontes formadas pela ligação de fibrinogênio, fibrina ou FvW a α IIb β 3 ativado. (C) Perpetuação. Finalmente, contatos próximos entre as plaquetas no tampão hemostático em crescimento, junto com uma rede de fibrina (em vermelho), ajudam a perpetuar e estabilizar o tampão de plaquetas.
Fonte: Adaptado de Michelson (Michelson, 2013)

A iniciação pode ocorrer por mais de uma maneira. No caso de trauma na parede do vaso, as plaquetas circulantes são capturadas e então ativadas pelo colágeno exposto e pelo FvW, formando uma monocamada e subsequente adesão plaquetária. A chave para esses eventos é a presença de receptores específicos na superfície das plaquetas, que podem se ligar ao colágeno (receptor integrina $\alpha 2\beta 1$ e GP VI) e ao FvW (receptor GPIba e $\alpha I I b\beta 3$), e, assim, iniciar a sinalização intracelular. Nos casos de distúrbios trombóticos ou inflamatórios, a ativação também pode ser iniciada pela trombina, que ativa as plaquetas via receptor acoplado à proteína G, na família do receptor ativado por protease. Outra possibilidade é a ativação plaquetária por meio da ativação patológica dos receptores FcR-IIA (receptor de imunoglobulina humana IIA) das plaquetas, como ocorre em alguns pacientes que recebem heparina exógena. À medida que as plaquetas vão sendo ativadas, elas se reorganizam e alteram seu formato discoide, formando pseudópodes, e expressam receptores que promovem agregação de plaquetas adicionais (Hosseinzadegan; Tafti, 2017; Michelson, 2013) (FIGURA 4).

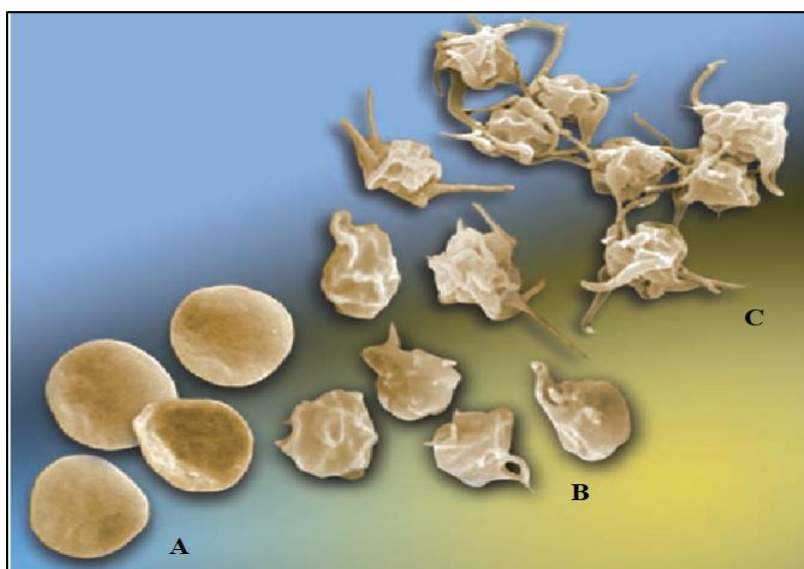


FIGURA 4 - Esquema de plaquetas em repouso, alteração da forma e agregação. (A) Plaquetas parcialmente ativadas. (B) Plaquetas totalmente ativadas. (C) Alterações de forma que as acompanham, formação de pseudópodes e agregação plaquetária.

Adaptado de Michelson (Michelson, 2013)

A extensão ocorre quando plaquetas adicionais são recrutadas e ativadas, aderindo umas às outras e se acumulando no topo da monocamada inicial. A trombina pode desempenhar um papel importante neste ponto, assim como o ADP e TXA₂. Cada um desses

agonistas é capaz de ativar a fosfolipase C nas plaquetas, causar aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico, ativar integrina $\alpha IIb\beta 3$, o que possibilita as interações coesivas entre as plaquetas, essenciais para a formação do tampão hemostático (Michelson, 2013).

A perpetuação se refere aos eventos tardios da formação do tampão plaquetário, que ajudam a estabilizá-lo e a prevenir a desagregação prematura. Esses eventos ocorrem normalmente após o início da agregação e são facilitados por contato próximo entre as plaquetas (Michelson, 2013).

Após a ativação plaquetária, os grânulos se acumulam no centro da célula, durante a mudança da forma das plaquetas e podem se fundir uns com os outros em fusão homotípica. Em etapa posterior, os grânulos se fundem com o sistema canalicular aberto ou com o meio externo, liberando seu conteúdo em seus canais e, assim, finalmente para o espaço extracelular. A secreção de grânulos plaquetários está intimamente relacionada às diversas funções plaquetárias (Gremmel; Frelinger; Michelson, 2024).

2.5 Função plaquetária

As funções das plaquetas não se limitam à adesão inicial, à agregação e à formação do tampão. Sabe-se que estão envolvidas em todos os estágios da cascata de reparo vascular incluindo coagulação, recrutamento de células inflamatórias e células imunes, mitogênese, remodelação tecidual e também na defesa antimicrobiana (Golebiewska; Poole, 2015; Xu et al., 2016).

2.5.1 Reparo vascular

Depois que a fibrina estável e o coágulo rico em plaquetas se formam para interromper a hemorragia imediata, as etapas seguintes do processo de reparo começam. As plaquetas se aderem firmemente e recrutam células imunes circulantes. Os grânulos α das plaquetas mediam as respostas inflamatórias, tanto pela expressão de receptores de adesão que facilitam as interações com células endoteliais e leucócitos, quanto pela secreção de uma ampla gama de quimiocinas, que são responsáveis por recrutar monócitos circulatórios, neutrófilos e linfócitos (Ed Rainger et al., 2015; Golebiewska; Poole, 2015).

A liberação de NAP-2 dos grânulos α leva a um gradiente quimiotático dentro do coágulo em crescimento que, por sua vez, permite que os leucócitos migrem através da barreira física que é o coágulo em crescimento em direção ao local da lesão no endotélio. A serotonina liberada de grânulos densos contribui ainda mais para o recrutamento de células imunes para a parede vascular (Golebiewska; Poole, 2015).

As etapas finais da resposta hemostática à lesão externa levam à restauração da integridade da parede vascular. Este processo envolve a proliferação e a migração de células musculares lisas, fibroblastos e células endoteliais. Os fatores de crescimento e quimiocinas das plaquetas são conhecidos por contribuir para a regulação desses processos. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), em particular, é fundamental na regulação da proliferação e migração de células musculares lisas (CMS) na circulação arterial e venosa, sendo responsável também pela hiperplasia neointimal e a reestenose (Golebiewska; Poole, 2015).

Outro mediador importante na remodelação é o SDF-1 α derivado de plaquetas, que media o recrutamento de células progenitoras derivadas da medula óssea CD34⁺ para o local da lesão e sua diferenciação em células progenitoras endoteliais. O SDF-1 α também é um mediador pró-angiogênico potente, aumentando a proliferação, diferenciação, germinação e formação de tubos de células endoteliais que expressam CXCR4 *in vitro* e *in vivo*. Outros fatores pró e antiangiogênicos como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e endostatina também são liberados das plaquetas, apoiando seu papel crucial na regulação da revascularização do tecido danificado (Golebiewska; Poole, 2015).

Além de fatores angiogênicos, as plaquetas também armazenam e secretam uma série de reguladores de apoptose relacionados ao fator de necrose tumoral α (TNF $-\alpha$), que podem induzir respostas inflamatórias e apoptose em outras células circulantes, bem como moléculas anti-apoptóticas. O equilíbrio entre as moléculas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, promovendo adequadamente a sobrevivência ou eliminando as células do local da ferida, também é crucial para a regulação da cicatrização vascular (Golebiewska; Poole, 2015).

2.5.2 Respostas antimicrobianas

As respostas antimicrobiana e hemostática estão intimamente ligadas. As plaquetas componentes sanguíneos mais numerosas que chegam primeiro ao local da lesão, e o papel das plaquetas no combate aos patógenos é cada vez mais evidente. Há muito é sabido que as plaquetas se localizam e se aderem a locais de lesões bacterianas na circulação, por exemplo na endocardite. No entanto, apenas em 2002 foi demonstrado que muitas citocinas secretadas pelas plaquetas têm propriedades microbicidas diretas (Tang; Yeaman, 2002) e que as plaquetas podem internalizar diretamente os patógenos (Youssefian; Drouin; Masse; Guichard, 2002). Ao mesmo tempo, a ativação plaquetária por padrões moleculares associados a patógenos, via receptores *Toll-like*, leva à liberação de mais citocinas, que leva

ao recrutamento de células inflamatórias circulantes e garante uma resposta rápida à infecção (Yeaman, 2014).

2.5.3 Secreção de plaquetas em doenças neoplásicas

A secreção de plaquetas é um impulsionador crítico da biologia e progressão de neoplasias (Anvari; Osei; Maftoon, 2021; Manne; Xiang; Rondina, 2017). O conteúdo do grânulo α secretado, incluindo o VEGF e a P-selectina, estimula a migração e proliferação endotelial, uma etapa crucial para a metástase e sobrevivência das células tumorais. Os mecanismos exatos permanecem parcialmente compreendidos, mas sabe-se que as células tumorais agregam e ativam as plaquetas, um processo conhecido como agregação plaquetária induzida por células tumorais (TCIPA). A TCIPA está correlacionada com a trombose causada por células tumorais e também com o potencial metastático dessas células. É demonstrado que as plaquetas protegem as células tumorais metastáticas da destruição pelas células imunes, conforme viajam na circulação sanguínea, e ajudam as células tumorais a se ligarem ao endotélio em locais metastáticos. As proteínas de adesão de plaquetas e células endoteliais também podem transportar células tumorais da circulação sanguínea para locais distantes de metástase (Manne; Xiang; Rondina, 2017; Schlesinger, 2018).

Além disso, quando as plaquetas entram em contato com as células neoplásicas, elas secretam o fator de crescimento transformador β (TGF- β), uma molécula imunorreguladora potente que também promove o extravasamento de células cancerígenas. A quantidade de TGF- β armazenado nos grânulos α parece ter um efeito regulatório nos níveis sistêmicos de TGF- β na circulação. O TGF- β das plaquetas também diminui os principais mecanismos de defesa do hospedeiro, críticos para a detecção e eliminação de células tumorais. Outros mediadores solúveis, incluindo prostaglandina E2 (PGE2), podem ter atividade semelhante. A capacidade de as plaquetas formarem agregados heterotípicos com células tumorais também pode desempenhar um papel central na determinação da sobrevivência dessas células na microvasculatura dos órgãos afetados e da metástase tumoral (Manne; Xiang; Rondina, 2017).

2.5.4 Fatores de crescimento derivados de plaquetas e o reparo tecidual

Os fatores de crescimento mais importantes liberados pelos grânulos α das plaquetas, no ponto de vista de reparo tecidual, incluem TGF- β , fator de crescimento

semelhante a insulina-1 (IGF-1), PDGF, VEGF, fator de crescimento fibroblástico (bFGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF). O TGF- β e o PDGF são os fatores presentes em maior quantidade nos grânulos α das plaquetas. Além dos efeitos anabólicos oriundos de sua liberação, os fatores de crescimento também são capazes de reduzir efeitos catabólicos relacionados às citocinas e outros fatores de degradação de matriz extracelular (MEC) (Andrade et al., 2020; Mazzucco; Borzini; Gope, 2010; Wu; Diaz; Borg-Stein, 2016) (QUADRO 1).

QUADRO 1 - Principais fatores de crescimento e citocinas armazenados nos grânulos α das plaquetas e suas funções.

FATOR DE CRESCIMENTO	FUNÇÃO/ESTÍMULO
Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)	Mitogênico para células mesenquimais e osteoblastos; estimula a quimiotaxia e a mitogênese em fibroblastos/células gliais/músculo liso; regula a secreção de collagenase e a síntese de colágeno; estimula a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos.
Fator de crescimento transformador beta (TGF α - β)	Estimula a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; regula a mitogênese endotelial, fibroblástica e osteoblástica; regula a síntese de colágeno e a secreção de collagenase; regula os efeitos mitogênicos de outros fatores de crescimento; estimula a quimiotaxia endotelial e a angiogênese; inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos.
Fator de crescimento vascular endotelial (VEDG)	Estimula a angiogênese pela regulação da proliferação e migração de células endoteliais.
Fator de crescimento epidermal (EGF)	Estimula a quimiotaxia endotelial e angiogênese; promove mitose epitelial e mesenquimal.
Fator de crescimento fibroblástico (bFGF)	Estimula a angiogênese; promove a diferenciação de células-tronco e a proliferação celular; promove a produção de colágeno e a reparação de tecidos.
Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)	Regula a proliferação e diferenciação celular; influencia a secreção de matriz de osteoblastos e produção de proteoglicano, colágeno e outras proteínas não colágenas.
Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)	Estimula a diferenciação de osteoblastos.
Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)	Promove angiogênese e regula inflamação.
Fator de crescimento de queratinócitos (KGF)	Regula a migração e proliferação epitelial.
Angiopietina-1 (Ang-1)	Induz a angiogênese, estimulando a migração e a proliferação de células endoteliais. Apoiar e estabiliza o desenvolvimento dos vasos sanguíneos por meio do recrutamento de pericitos.
Fator plaquetário 4 (PF4)	Recruta os leucócitos e regula sua ativação; atividades microbicidas.
Fator derivado de células estromais (SDF-1 α)	Chama células CD34+, induz seu direcionamento, proliferação e diferenciação em células progenitoras endoteliais, estimulando a angiogênese; recruta células-tronco mesenquimais e leucócitos.

Fator de necrose tumoral (TNF)	Regula a migração de monócitos, proliferação de fibroblastos, ativação de macrófagos e angiogênese.
--------------------------------	---

Fonte: Modificado de Everts et al 2020 (Everts et al., 2020).

2.6 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

As primeiras descrições de PRP foram realizadas por hematologistas na década de 1970. A expressão foi utilizada para definir uma preparação de plasma que continha contagem de plaquetas acima da do sangue total, inicialmente utilizada para transfusão em pacientes com trombocitopenia. Depois, foi utilizado em uma preparação com fibrina em cirurgia maxilofacial e foi observado que seu uso aumentava a taxa de maturidade do enxerto ósseo de implantes dentários e aumentava a densidade óssea trabecular. Posteriormente, ganhou mais destaque quando passou ser empregado em lesões musculoesqueléticas; com seu uso em atletas profissionais, atraiu atenção e passou a ser amplamente utilizado em diversas especialidades e diversas formas (Alves; Grimalt, 2018).

O potencial terapêutico do PRP está correlacionado especialmente à capacidade das plaquetas de liberarem quantidades supra fisiológicas de fatores de crescimento, que estimulam diferenciação e proliferação celular, melhorando o reparo em tecidos biológicos (Wu; Diaz; Borg-Stein, 2016). Contudo, outros fatores bioativos descritos no PRP são derivados não só de plaquetas, mas também de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e proteínas plasmáticas, também constituintes das preparações (McCarrel, 2023). Esses fatores incluem citocinas pró e anti-inflamatórias, fatores de crescimento anabólicos, enzimas catabólicas, hormônios, proteínas de fase aguda e imunoglobulinas (McCarrel, 2023).

Em equinos, o PRP tem sido utilizado principalmente no tratamento de feridas cutâneas, tendinites, desmites, laminite, lesões articulares e endometrites (Ghallab *et al.*, 2023; Montano *et al.*, 2021; Nedergaard; Carlsson; Lindegaard, 2024; Pereira, Roberta Carneiro da Fontoura *et al.*, 2019; Seidel *et al.*, 2021). A proporção de veterinários que usam terapias celulares, incluindo PRP, em sua prática clínica, foi relatada como 77,3% (Velloso Alvarez; Boone; Braim; *et al.*, 2020) em uma pesquisa com profissionais que trabalham com equinos nos Estados Unidos, 87,5% (Knott *et al.*, 2022) em um grupo de diplomados do *American College of Veterinary Surgeons* e *American College of Sports Medicine and Rehabilitation* e 80% (Wilson; Mckenzie; Duesterdieck-Zellmer, 2018) do *American Association of Equine Practitioners* e *European College of Veterinary Surgeons*.

Apesar da sua ampla aceitação e uso no mercado da medicina equina, seu uso terapêutico ainda carece de mais pesquisas. Os estudos realizados não apresentam

padronização quanto à técnica de obtenção do PRP, necessidade de ativação das plaquetas, concentração final dessas e de outras células, assim como tempo e frequência de tratamento. Mesmo com a ampla aceitação de seu uso, as pesquisas seguem com o objetivo de fornecer evidências convincentes dos benefícios clínicos associados ao seu uso (Brossi et al., 2015; Moraes et al., 2015; Palma et al., 2019), e também na busca de padronização de técnica para sua produção, visto que hoje há diversos protocolos diferentes (Brossi et al., 2015; Carmona et al., 2007; Pedroso et al., 2021; Moraes et al., 2015; Textor; Tablin, 2013).

2.6.1 Classificação do PRP

Desde 2009 diversos autores sugeriram classificações para o PRP, totalizando até então 9 tipos de classificação (Anitua et al., 2022). Há uma grande variação nos métodos de preparação entre as diferentes publicações e um dos primeiros sistemas de classificação propostos é o mais comumente usado (Ehrenfest et al., 2014). Esse sistema classifica o PRP em quatro categorias gerais: PRP puro, que tem baixa contagem de leucócitos (WBC) e não é ativado; (2) PRP rico em leucócitos, que tem alto WBC e não é ativado; (3) fibrina rica em plaquetas pura, que tem baixo WBC e é ativada; e (4) fibrina rica em plaquetas rica em leucócitos, que tem alto WBC e é ativada (Ehrenfest et al., 2014).

Outro produto relacionado ao concentrado de plaquetas é o lisado de plaquetas (PL). Essa categoria refere-se ao PRP que passa por ciclos de congelamento/descongelamento para fins de indução de lise de células e plaquetas e liberação proteínas (Gupta; Maffulli, 2024). De maneira geral, o termo PRP é utilizado para produtos frescos.

2.6.2 Ativação do PRP

A ativação das plaquetas pode ser realizada antes da administração do PRP com o objetivo de liberar altas concentrações de fatores de crescimento dos grânulos plaquetários. A trombina e o cálcio têm sido utilizados como substâncias ativadoras para a liberação do “bolus” de bioativos (Mccarrel, 2023).

Um estudo mostrou que a maioria dos veterinários de cavalos não ativa o PRP e apenas 8% ativa com cloreto de cálcio. Outros 4% relatam usar terapia por ondas de choque ou ciclos de congelamento e descongelamento para ativação plaquetária (Alvarez et al., 2020). Contudo, preocupações relacionadas à resposta imune e a evidências de um aumento na

inflamação quando essas substâncias são injetadas nas articulações provavelmente restringem o uso de ativadores nos últimos anos (Textor; Tablin, 2013).

Além disso, a análise da concentração dos fatores de crescimento, por meio de técnicas de ativação revelou que não é necessária ativação externa, pois os fatores de crescimento são liberados de forma espontânea após o contato com o tecido (Dashore *et al.*, 2021; Textor; Tablin, 2013).

2.6.3 Anticoagulantes no PRP

Os anticoagulantes adequados para a preparação do PRP devem causar o menor prejuízo às plaquetas e aos tecidos e células dos seus locais de aplicação. Os mais frequentemente utilizados para a preparação do PRP são ácido-citrato-dextrose (ACD) e citrato de sódio. Esses dois produtos são escolhidos com base em evidências de transfusão plaquetária, uma vez que mantém a viabilidade plaquetária, além de suprir a necessidades metabólicas (Aizawa *et al.*, 2020). O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) também é utilizado, mas há evidências que ele danifica a membrana plaquetária e altera o formato das plaquetas, alterando o volume plaquetário médio e aumentando a ativação e agregação plaquetária (Arora; Arora, 2021).

2.6.4 Uso clínico do PRP em equinos

a) Feridas cutâneas

Apesar de diversos avanços no tratamento, as feridas cutâneas em equinos ainda são um grande desafio. A tendência à formação de tecido de granulação exuberante, a alta mobilidade das extremidades distais e o contato próximo com solo contaminado retardam a cicatrização de feridas nessa espécie. A utilização de PRP em feridas cutâneas parece induzir a revascularização, ativação de fibroblastos e estimulação de células mesenquimais, o que modula a resposta à lesão do tecido e acelera a cicatrização de feridas (Pedroso *et al.*, 2021).

Em um estudo realizado com jumentos, foi observada melhora na cicatrização de feridas cutâneas utilizando gel de PRP autólogo, comparado com homólogo, por meio aceleração da epitelização e do desenvolvimento de tecido mais estruturado com feixes de colágeno interligados (Talha *et al.*, 2022). Outro estudo mostrou redução de 15 dias no tempo de cicatrização em feridas induzidas em equinos e tratadas com gel de PRP autólogo, em comparação às feridas do grupo controle (Pereira, Roberta Carneiro da Fontoura *et al.*, 2019).

Uma pesquisa realizada com cavalos resgatados que possuíam feridas crônicas comparou o tratamento com gel de PRP com solução salina estéril. Foi observado aumento significativo de neovascularização e crescimento epitelial basal nas feridas tratadas com PRP em comparação a feridas controle (Talha et al., 2022). Outro estudo também mostrou aumento da neovascularização e melhora na retração das bordas de feridas induzidas e tratadas com autoexerto e PRP (Pedroso et al., 2021).

Já outros autores, ao avaliarem a liofilização de PRP e seu uso em feridas induzidas, não notaram aceleração do processo de cicatrização com infiltração do produto nas feridas cutâneas (Freitas et al., 2023).

b) Tendinite e desmíte

Lesões em ligamentos e tendões possuem capacidade limitada de cicatrização. Além do longo período para reparo, a cicatriz nesses tecidos resulta em um tecido biomecanicamente inferior, com menos elasticidade e menor resistência, o que predispõe a recidivas. O PRP tem sido utilizado nesse tipo de lesão, pois parece controlar a inflamação local e melhorar a cicatriz, permitindo um tecido com mais flexibilidade (M'Cloud et al., 2024; Montano et al., 2021).

Entretanto, uma metanálise sobre o uso de PRP em tendões e ligamentos de equinos descreve com clareza as inúmeras limitações dos estudos, alto risco de viés e falta de randomização e controle cego dos trabalhos avaliados. Apesar de vários estudos demonstrarem o efeito benéfico do PRP na cicatrização de tendões e ligamentos sem efeitos adversos, não há evidências claras de sua eficiência devido a grandes limitações encontradas nos estudos (Montano et al., 2021).

Outra meta-análise, que avaliou a eficácia do PRP e de células tronco mesenquimais (CTM) para lesões de ligamento e tendão em equinos, também descreve que, apesar de inúmeras limitações, foi identificada diminuição significativa na taxa de nova lesão em cavalos que receberam uma combinação de CTM e PRP para tendinopatia e desmopatia (M'Cloud et al., 2024).

c) Laminite

A utilização do PRP no tratamento de laminite tem sido conduzida de maneira empírica por muitos veterinários. Carmona e colaboradores (Carmona, Jorge U.; Gómez; López, 2018; Carmona, Jorge U.; López; Samudio, 2013) relataram que a injeção de PRP na banda coronária em alguns casos de laminite crônica, secundária a outros distúrbios que não

respondem ao tratamento convencional, produziu melhorias no crescimento e na qualidade dos cascos. Outro estudo mostrou melhora da vascularização e estrutura do casco após injeções de CTM ressuspensas em PRP, em cavalos com laminite crônica grave (Angelone et al., 2017).

Outros autores demonstraram que a administração de PRP na banda coronária de equinos com cascos saudáveis não alterou o padrão ou a taxa de crescimento em cascos, em comparação com o associado a injeções salinas ou apenas casqueamento (Seidel et al., 2021).

d) Doença articular

A osteoartrite (OA) é uma condição degenerativa caracterizada pela deterioração progressiva da cartilagem articular e alterações patológicas dos tecidos adjacentes. A prevalência de OA aumenta acentuadamente com a idade e pode chegar a 83,5% em cavalos com mais de 15 anos. Ela não tem cura e os tratamentos visam controle dos sinais clínicos e estabilização do processo degenerativo. Terapias biológicas são cada vez mais consideradas como mais eficazes para OA, e o PRP tem demonstrado efeitos biológicos benéficos no metabolismo celular e nas vias de inflamação (Peng et al., 2024).

A resposta positiva promovida pelo uso do PRP intra-articular no tratamento da OA foi demonstrada por meio de estudos tanto em humanos quanto em equinos (Moraes et al., 2015). Na medicina, estudos *in vitro* já demonstraram que o PRP tem efeito positivo na proliferação e diferenciação de condrócitos. O TGF- β , IGF, bFGF e o PDGF foram relacionados à proliferação e diferenciação condrogênica das CTM, promoção da síntese do proteoglicano aggrecan e de colágeno tipo II por condrócitos, prevenção da apoptose de condrócitos e CTM e diminuição dos efeitos catabólicos de citocinas inflamatórias, tais como interleucina-1 (IL-1) e metaloproteinases de matriz (MMPs). Além do seu potencial regenerador, o PRP apresenta significativa importância como agente anti-inflamatório e analgésico nos casos de OA (Xie; Zhang; Tuan, 2014).

Na avaliação clínica, já foi demonstrado que há diminuição na claudicação de equinos com OA após infiltração por PRP. Um estudo mostrou que, em quatro equinos diagnosticados com OA tratados com três infiltrações de PRP, com intervalos de duas semanas, houve redução significativa no grau de claudicação e da efusão articular, especialmente dois meses após última aplicação do PRP. Essa diminuição na claudicação persistiu por oito meses após última infiltração (Carmona, J. U. et al., 2007). Em outro estudo clínico, foram utilizados 20 cavalos de enduro com OA de boleto, refratários ao uso de corticosteroides intra-articulares, que receberam também três doses de PRP, com intervalo de

duas semanas, sendo que 80% dos equinos retornaram à atividade física com o mesmo nível de desempenho anterior (Pichereau; Décor; Cuevas Ramos, 2014). A diminuição da claudicação também foi demonstrada em animais com lesões condrais induzidas e tratadas com PRP (Yamada, A. L.M. et al., 2012).

O PRP também tem sido utilizado em equinos em associação a outras terapias celulares intra-articulares. Equinos submetidos a lesões condrais femoropatulares e tratados com implantes de CTM e PRP gel apresentaram tecido de reparação com melhor aspecto morfológico macroscópico e microscópico, quando comparados ao grupo controle que não recebeu tratamento (Yamada, Ana Lúcia M. et al., 2016). Ainda, em oito equinos infiltrados com microgordura e PRP houve redução significativa da claudicação em todos os animais e sete deles puderam retornar ao esporte (Bembo et al., 2016).

Na avaliação de articulações saudáveis submetidas à infiltração com PRP, foi observada, a curto prazo (primeiras 48 horas), uma resposta inflamatória transitória, caracterizada pelo aumento de PGE₂, leucócitos e proteínas totais. No entanto, não foi observada alteração nos biomarcadores de *turnover* da cartilagem (ácido hialurônico e sulfato de condroitina), sugerindo que a resposta inflamatória à infiltração do PRP é autolimitada, não causa alterações negativas à MEC, além de não alterar a homeostase articular (Moraes *et al.*, 2015). Essa resposta inflamatória transitória também foi observada por outros autores (Machado et al., 2019; Textor; Tablin, 2013).

Um recente trabalho avaliou características clínicas e moleculares do líquido sinovial (LS) após administração de PL em equinos com OA natural. Esse estudo mostrou os benefícios potenciais do PL como inibidor das proteases que participam da degradação da matriz da cartilagem e diminuição na dor e os sinais clínicos em cavalos com AO (Perrone et al., 2020). Por sua vez, uma revisão sistemática que aborda a eficácia de PRP em doenças articulares de equinos conclui que, apesar de alta variabilidade dos estudos e alto risco de viés, os estudos fornecem algum suporte para uso de PRP e PL na OA. Além disso o PRP parece ter potencial para tratar artrite séptica, apesar de evidências escassas (Peng et al., 2024).

De maneira geral, o PRP pode ser considerado um tratamento promissor para lesões da cartilagem e controle da dor articular em equinos, devido às suas possíveis propriedades anabólicas e anti-inflamatórias na cartilagem articular (Peng et al., 2024; Perrone et al., 2020).

e) Endometrite

A endometrite induzida por reprodução persistente e a endometrite degenerativa crônica são reconhecidas como causas importantes de subfertilidade e baixa eficiência reprodutiva em éguas. O tratamento com PRP tem demonstrado atenuar essas doenças, reduzir infecções uterinas e melhorar a fertilidade em éguas (Ghallab et al., 2023).

O tratamento de éguas árabes que repetem cio por meio de infusão intrauterina de 20 mL de PRP, mostrou ser superior aos demais tratamentos, por resultar em redução do edema inflamatório, redução dos fluidos acumulados intrauterinos e aumento da taxa de prenhez (Ghallab et al., 2023). O lisado de plaquetas também se mostrou eficiente em melhorar os sinais ultrassonográficos de endometrite, especialmente acúmulo de líquido intrauterino e edema endometrial (Colombo et al., 2022).

Outro estudo avaliou a terapia com PRP em éguas doadoras de embriões suscetíveis à endometrite e concluiu que o tratamento reduziu células polimorfonucleares intraluminais e endometriais, citocinas inflamatórias uterinas, acúmulo de fluido intrauterino e o número de culturas bacterianas positivas, em comparação aos ciclos atribuídos grupo ao controle. Assim, a terapia com PRP aumentou a porcentagem de embriões recuperados. Além disso, sugere que as plaquetas parecem ter uma propriedade antimicrobiana (Segabinazzi; Canisso; *et al.*, 2021).

Uma meta-análise avaliando o uso de PRP e outras terapias para tratar endometrite induzida por reprodução persistente e a endometrite degenerativa crônica mostrou efeito geral positivo. Apesar do alto risco de viés nos estudos incluídos e da variabilidade entre diferentes tipos de produtos, os resultados da meta-análise apoiaram o uso do PRP. Foi demonstrado que o PRP pode moderar a inflamação uterina, resultando em diminuição da espessura da parede endometrial, do edema e no acúmulo de fluido intrauterino. A melhora do ambiente uterino é provavelmente um dos principais fatores que contribuem para a sobrevivência embrionária aprimorada, que é considerada o melhor resultado (Del Prete et al., 2024).

3. CONCLUSÃO

Apesar da compreensão da biologia plaquetária ter progredido substancialmente na medicina nos últimos anos, na espécie equina muitas lacunas ainda permanecem abertas em relação a diversos pontos sobre as plaquetas, desde questões básicas, como sua ultraestrutura, até as mais complexas, incluindo seu uso terapêutico, como o PRP.

Mesmo com descrições e estudos sobre o PRP na medicina equina, seu uso terapêutico ainda carece de respostas. As pesquisas realizadas não apresentam padronização quanto à técnica de obtenção do PRP, necessidade de ativação das plaquetas, fatores que afetam a qualidade do PRP, concentração final dessas e de outras células, assim como tempo e frequência de tratamento, além de alto risco de viés dos trabalhos. Mesmo com a ampla aceitação de seu uso, as pesquisas seguem com o objetivo de fornecer evidências convincentes dos benefícios clínicos, associados à sua administração e também na busca de padronização de técnica para sua produção.

REFERÊNCIAS

- AIZAWA, H. et al. A comparative study of the effects of anticoagulants on pure platelet-rich plasma quality and potency. *Biomedicines*, v. 8, n. 3, p. 1–14, 2020. doi: 10.3390/biomedicines8030042.
- ÁLVAREZ, M. E.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J. U. Monitoring bacterial contamination in equine platelet concentrates obtained by the tube method in a clean laboratory environment under three different technical conditions. *Equine Veterinary Journal*, v.42, n.1, p. 63–67, 2010. doi: 10.2746/042516409X455221.
- ALVES, R.; GRIMALT, R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disorders*, v.4, n.1, p. 18–24, 2018. doi: 10.1159/000477353.
- ANDRADE, S. S. et al. Biotech-educated platelets: Beyond tissue regeneration 2.0. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 1–14, 2020. doi: 10.3390/ijms21176061.
- ANGELONE, M. et al. The contribution of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

and platelet-rich plasma to the treatment of chronic equine laminitis: A proof of concept. *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, n. 2122, p. 1–17, 2017. doi: 10.3390/ijms18102122.

ANITUA, E. et al. Platelet-rich plasma: are the obtaining methods, classification and clinical outcome always connected? *Regenerative Medicine*, v. 17, n. 12, p. 887–890, 2022. doi: 10.2217/rme-2022-0118.

ANVARI, S.; OSEI, E.; MAFTOON, N. Interactions of platelets with circulating tumor cells contribute to cancer metastasis. *Scientific Reports*, v.11, n.1, p.1–16, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-94735-y.

ARORA, G.; ARORA, S. Platelet-rich plasma—Where do we stand today? A critical narrative review and analysis. *Dermatologic Therapy*, v.34, n.1, p.1–12, 2021. doi: 10.1111/dth.14343.

BEMBO, F. et al. Combined use of platelet rich plasma & micro-fat in sport and race horses with degenerative joint disease: Preliminary clinical study in eight horses. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v.6, n. 2, p.198–204, 2016. doi: 10.11138/mltj/2016.6.2.198.

BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet activation. *Blood Reviews*, v. 9, p. 143–156, 1995.

BOGERS, S. H. Cell-based therapies for joint disease in veterinary medicine: What we have learned and what we need to know. *Frontiers in Veterinary Science*, v.5, p. 1–17, 2018. doi:10.3389/fvets.2018.00070.

BOSWELL, S. G. et al. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *American Journal of Sports Medicine*, v. 42, n.1, p. 42–49, 2014. doi: 10.1177/0363546513507566.

BOZORGMANESH, R. et al. Equine platelet concentrate preparation and validation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.33, n. 3, p. 1500–1506, 2019. doi: 10.1111/jvim.15472.

BROOKS, M. et al. *SCHAMLM'S VETERINARY HEMATOLOGY. SEVENTH ED*: John Wiley & Sons Limited., 2022.

BROSSI, P. M. et al. A. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: A comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research*, v.11, n. 1, p. 1–17, 2015. doi: 10.1186/s12917-015-0403-z.

CAMARGO GARBIN, L.; LOPEZ, C.; CARMONA, J. U. A Critical Overview of the Use of

Platelet-Rich Plasma in Equine Medicine Over the Last Decade. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, p. 1–10, 2021. doi: 10.3389/fvets.2021.641818.

CARMONA, J. U. et al. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.27, n.4, p.167–170, 2007. doi: 10.1016/j.jevs.2007.02.007.

CARMONA, J. U.; GÓMEZ, W. A.; LÓPEZ, C. Could Platelet-Rich Plasma Be a Clinical Treatment for Horses With Laminitis? *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 61, p.46–57, 2018. doi: 10.1016/j.jevs.2017.11.004.

CARMONA, J U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous Platelet Concentrates as an Adjunctive Treatment for Chronic Laminitis in a Mare with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, n.3, p.191–195, 2013. doi: 1016/j.jevs.2012.05.068.

CASTILLO, T. N. et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *American Journal of Sports Medicine*, v. 39, n. 2, p. 266–271, 2011. doi: 10.1177/0363546510387517.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: Ainda um alvo terapêutico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.42, n.5, p.321–332, 2006. doi:10.1590/S1676-24442006000500004

CHEN, C. H. et al. A-Granule Biogenesis: From Disease To Discovery. *Platelets*, v. 28, n. 2, p. 147–154, 2017. doi: 10.1080/09537104.2017.1280599.

COLOMBO, I. et al. Effect of platelet lysate on uterine response of mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Theriogenology*, v. 179, p. 204–210, 2022. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.12.001.

CUNIN, P.; NIGROVIC, P. A. Megakaryocytes as immune cells Pierre. *J Leukoc Biol*, v. 105, n. 6, p. 1111–1121, 2019.

DA ROSA PEDROSO, et al. Di. Influencing factors for preparation of platelet-rich plasma in horses. *Semina:Ciencias Agrarias*, v.42, n.4, p.2327–2337, 2021. doi: 10.5433/1679-0359.2021v42n4p2327.

DASHORE, S. et al. Preparation of Platelet-Rich Plasma: National IADV L PRP Taskforce Recommendations. *Indian Dermatology Online Journal*, v. 12, p. 12–23, 2021. doi:10.4103/idoj.idoj_269_21.

DEL PRETE, C.; MONTANO, C.; COCCHIA, N.; DE CHIARA, M.; GASPARRINI, B.; PASOLINI, M. P. Use of regenerative medicine in the treatment of endometritis in mares: A systematic review and meta-analysis. *Theriogenology*, v. 227, p.9–20, 2024. doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.07.006.

DOHAN, D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 101, n. 3, 2006. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.010.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v.4, n.1, p.3–9, 2014. doi: 10.32098/mltj.01.2014.02.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*, v. 81, n. 4, p. 546–555, 2010. doi: 10.1902/jop.2009.090531.

DOHAN EHRENFEST, D. M. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, v. 29, n. 2, p. 171–184, 2018. doi: 10.1080/09537104.2017.1293812.

DUTRA, H. T. et al. Short-term effects of platelet-rich plasma on the synovial fluid of horses with induced synovitis. *Ciencia Rural*, v. 55, n. 5, 2025. doi: 10.1590/0103-8478cr20230200.

ED RAINGER, G. et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*, v.26, n.6, p.507–520, 2015. doi: 10.3109/09537104.2015.1064881.

ETULAIN, J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*, v.29, n.6, p. 556–568, 2018. doi: 10.1080/09537104.2018.1430357.

EVERTS, P. et al. Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 20, 2020. doi: 10.3390/ijms21207794.

FREITAS, N. P. P. et al. Freeze-dried Platelet-rich Plasma and Stem Cell-conditioned Medium for Therapeutic Use in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 121, 2023.

doi: 10.1016/j.jevs.2022.104189.

GHALLAB, R. S. et al. Impact of intrauterine infusion of Platelets-Rich plasma on endometritis and reproductive performance of Arabian mare. *Reproduction in Domestic Animals*, v.58, n.5, p.622–629, 2023. doi: doi.org/10.1111/rda.14329.

GIRALDO, C. E. et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research*, v. 9, 2013. doi: doi.org/10.1186/1746-6148-9-29.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, v.29, n.3, p.153–62, 2015

GREMMEL, T.; FRELINGER, A. L.; MICHELSON, A. D. Platelet physiology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v.42, n.3, 2024. doi: 10.1055/s-0044-1786387.

GROZOVSKY, R.; GIANNINI, S.; HOFFMEISTER, K. M. Novel mechanisms of platelet clearance and thrombopoietin regulation. *Curr Opin Hematol*, v.22, n.5, p.445–451, 2017. doi: g/10.1097/MOH.0000000000000170.

GUIDONI, K. et al. The Combined Use of Triamcinolone and Platelet-Rich Plasma in Equine Metacarpophalangeal Joint Osteoarthritis Treatments: An In Vivo and In Vitro Study. *Animals*, v. 14, n. 24, p. 1–13, 2024. doi: 10.3390/ani14243645.

GUPTA, A.; MAFFULLI, N. Platelet Lysate and Osteoarthritis of the Knee : A Review of Current Clinical Evidence. *Pain and Therapy*, v.13, n. 6, p. 1377–1386, 2024. doi: 10.1007/s40122-024-00661-y.

HAGEN, A. et al. Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. January, p. 1–19, 2021. doi:10.3389/fbioe.2020.613621.

HOSSEINZADEGAN, H.; TAFTI, D. K. Mechanisms of Platelet Activation, Adhesion and Aggregation. *Thrombosis & Haemostasis: Research*, v.1, n.2, p,1-5, 2017. HURLEY, E.

HURLEY E. T. et al. Experts Achieve Consensus on a Majority of Statements Regarding Platelet-Rich Plasma Treatments for Treatment of Musculoskeletal Pathology. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, v. 40, n. 2, p. 470-477, 2024. doi: 10.1016/j.arthro.2023.08.020.

JURK, K. Platelet granules - secretory and secretive. *Hamostaseologie*, v.37, n.3, p. 208–210,

2017. doi: 10.5482/HAMO-16-07-0023.

KAUSHANSKY, K. T. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*, v.115, n.12, p.3339–3347, 2005. doi: 10.1172/JCI26674.

KING, S. M.; REED, G. L. Development of platelet secretory granules. *Cell & Developmental Biology*, v.13, n.2, p. 293–302, 2002. doi: 10.1016/S1084–9521(02)00059-9.

KNOTT, L. E. et al. Current use of biologic therapies for musculoskeletal disease: A survey of board-certified equine specialists. *Veterinary Surgery*, v. 51, n. 4, p.557–567, 2022. doi: 10.1111/vsu.13805.

LEE, C. H. et al. The growth factor content as an indicator of platelet counts in platelet-rich plasma. *Clinica Chimica Acta*, v. 564, 2024, p. 2023–2026, 2025. doi: 10.1016/j.cca.2024.119901.

LEFRANÇAIS, E.; LOONEY, M. R. Platelet biogenesis in the lung circulation. *Physiology*, v. 34, n. 6, p. 392–401, 2019. doi: 10.1152/physiol.00017.2019.

LIN, K. Y. et al. Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma Has Better Stimulating Effects on Tenocyte Proliferation Compared With Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, v. 10, n. 3, p. 1–8, 2022. doi: 10.1177/23259671221084706.

M'CLOUD, W. R. C. et al. Stem cells and platelet-rich plasma for the treatment of naturally occurring equine tendon and ligament injuries: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 262, p. S50–S60, 2024. doi: 10.2460/javma.23.12.0723.

MACHADO, T. S. L. et al. Effects of blood-derived products and sodium hyaluronate on equine synovial fluid cells and on synovial fluid from osteochondrotic joints of horses after arthroscopy and administration of treatment. *American Journal of Veterinary Research*, v. 80, n.7, p.646–656, 2019. doi: 10.2460/ajvr.80.7.646.

MACK, J. P.; MILES, J.; STOLLA, M. Cold-Stored Platelets: Review of Studies in Humans. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 34, n. 4, p. 221–226, 2020. doi: 10.1016/j.tmr.2020.08.003.

MANNE, B. K.; XIANG, S. C.; RONDINA, M. T. Platelet Secretion in Inflammatory and Infectious Diseases. *Physiology & behavior*, v.28, n.2, p.155–164, 2017. doi: 10.1080/09537104.2016.1240766.Platelet.

MAZZUCCO, L.; BORZINI, P.; GOPE, R. Platelet-derived factors involved in tissue repair-

from signal to function. *Transfusion Medicine Reviews*, v.24, n.3, p.218–234, 2010. doi: 10.1016/j.tmr.2010.03.004.

MCCARREL, T. M. Equine Platelet-Rich Plasma. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, v.39, n.3, p.429–442, 2023. doi: 10.1016/j.cveq.2023.06.007.

MICHELSON, A. Platelets. Elsevier, 2013.

MIRANDA, S. et al. Protocols for preparation of platelet rich plasma (PRP) in Quarter Horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 39, n. 8, p. 614–621, 2019. doi:10.1590/1678-5150-PVB-5883.

MIRZA, M. H. et al. Gait changes vary among horses with naturally occurring osteoarthritis following intra-articular administration of autologous platelet-rich plasma. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 3, p. 1–9, 2016. doi: 10.3389/fvets.2016.00029.

MONTANO, C. et al. The use of platelet-rich plasma for treatment of tenodesmic lesions in horses: A systematic review and meta-analysis of clinical and experimental data. *Animals*, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2021. doi: 10.3390/ani11030793.

MORAES, A. P. L. et al. Short- and long-term effects of platelet-rich plasma upon healthy equine joints: Clinical and laboratory aspects. *The Canadian veterinary journal*, v. 56, n. 8, p. 831–838, 2015.

MOTA, M. de L. et al. Desenvolvimento de um dispositivo para obter plasma rico em plaquetas (PRP). *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 57, n. 2, p. 289–294, 2022. doi: 10.1055/s-0040-1721835.

NEDERGAARD, A.; CARLSSON, L. E.; LINDEGAARD, C. Evidence of the clinical effect of commonly used intra-articular treatments of equine osteoarthritis. *Equine Veterinary Education*, v.36, n.12, p.646–658, 2024. doi: 10.1111/eve.13984

NEVES, A. P. et al. Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Animal Reproduction Science*, v. 97, n. 3–4, p. 314–322, 2007. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.01.010.

OLIVEIRA, S. J. de. Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária. 3 edição. ULBRA, 2018.

OSLER W. An account of certain organisms occurring in the liquor sanguinis. *Proc R Soc*

Lond, v. 22, p. 391–398, 1874.

PALMA, H. E. et al. Can triamcinolone acetonide, platelet-rich plasma, and pentosan polysulfate sodium induce oxidative stress in cultured equine chondrocytes? *Ciencia Rural*, v.49, n.7, 2019. doi: 10.1590/0103-8478cr20180263.

PAZ, L. B. et al. Effects of breed, age and gender on equine platelet rich plasma and correlation of platelet count with its physical aspect. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 74, n. 5, p. 759–766, 2022. doi: 10.1590/1678-4162-12517.

PEDROSO, A. C. B. R. et al. Autologous platelet-rich plasma action on skin autografts in horses. *Ciencia Rural*, v. 51, n. 8, 2021. doi: 10.1590/0103-8478CR20190811.

PENG, C. et al. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of platelet-rich plasma products for treatment of equine joint disease. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.72, p.1–7, 2019. doi: 10.1016/j.jevs.2017.10.009.

PEREIRA, R. C. da F. et al. Evaluation of Three Methods of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Equine Distal Limb Skin Wounds. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 72, p. 1–7, 2019. doi: 10.1016/j.jevs.2017.10.009.

PEREIRA, R.; ZACARIAS, G. Evaluation of seven platelet-rich plasma processing protocols in the equine species. *Ciência Rural*, v. 3, n. 6, p. 1122–1127, 2013.

PERRONE, G. et al. Treatment With Platelet Lysate Inhibits Proteases of Synovial Fluid in Equines With Osteoarthritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.88, 2020. doi: 10.1016/j.jevs.2020.102952.

PICHEREAU, F.; DÉCORY, M.; CUEVAS RAMOS, G. Autologous platelet concentrate as a treatment for horses with refractory fetlock osteoarthritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.34, n.4, p.489–493, 2014. doi: 10.1016/j.jevs.2013.10.004.

QUINN, M.; FTIZGERALD, D. *Platelet Function*. Totowa, New Jersey: Human Press, 2005.

RINNOVATI, R. et al. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 58, n. 1, p. 1–5, 2016. doi: 10.1186/s13028-016-0226-3.

RUMJANTSEVA, V.; HOFMEISTER, K. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. *Transfus Apher Sci*, v. 42, n. 1, p. 63–70, 2010. doi: 10.1016/j.transci.2009.10.008.Novel.

SATUÉ, K.; GARDÓN, J. C.; MUÑOZ, A. Interpretation of Platelets in The Horse. *Journal of Hematology Research*, v. 4, p. 19–25, 2017. doi: 10.12974/2312-5411.2017.04.3.

SCHLESINGER, M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis 06 *Biological Sciences* 0601 *Biochemistry and Cell Biology*. *Journal of Hematology and Oncology*, v. 11, n.1, p.1–15, 2018. doi: 10.1186/s13045-018-0669-2.

SEGABINAZZI, L. G. T. M. et al. Intrauterine blood plasma platelet-therapy mitigates persistent breeding-induced endometritis, reduces uterine infections, and improves embryo recovery in Mares. *Antibiotics*, v.10, n.5, p.1–19, 2021. doi: 10.3390/antibiotics10050490.

SEGABINAZZI, L. G. T. M. et al. Three manual noncommercial methods to prepare equine platelet-rich plasma. *Animals*, v. 11, n. 6, p. 1–16, 2021. doi: 10.3390/ani11061478.

SEGURA, D. et al. Assessment of platelet function in horses: Ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, n. 3, p. 581–588, 2006. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[581:AOPFIH]2.0.CO;2.

SEIDEL, S. R. T. et al. Evaluation of platelet-rich plasma applied in the coronary band of healthy equine hooves, v.62, p. 729–735, 2021.

SMIT, Y. et al. Clinical findings, synovial fluid cytology and growth factor concentrations after intra-articular use of a platelet-rich product in horses with osteoarthritis. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 90, n. 2019, p. 1–9, 2019. doi: 10.4102/jsava.v90i0.1721.

STENBERG, P. E.; LEVIN, J. Mechanisms of platelet production. *Blood Cells*, v. 15, p. 23–47, 1989.

TALHA, S. M. et al. The Effect of Autologous and Homologous Platelets-Rich Plasma Gel on Cutaneous Wound Healing In Rescued Donkeys: A Comparative Study, v.53, n.4, p.529–539, 2022. doi: 10.21608/ejvs.2019.17122.1098

TANG Y.Q., YEAMAN M.R., S. M. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*, v.70, n.12, p.6524–6533, 2002.

TEXTOR, J. A.; TABLIN, F. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: Clinical signs and cytologic responses. *Veterinary Surgery*, v.42, n.5, p.499–510, 2013. doi: 10.1111/j.1532-950X.2013.12015.x.

TEXTOR, J. A.; WILLITS, N. H.; TABLIN, F. Synovial fluid growth factor and cytokine

concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *The Veterinary Journal*, v. 198, n. 1, p. 217–223, 2013. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.07.020.

THON, J. N.; ITALIANO, J. E. Platelets : Production , Morphology and Ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*, v.210, p. 3–22, 2012. doi: 10.1007/978-3-642-29423-5.

TOGNOLONI, A. et al. Platelets Rich Plasma Increases Antioxidant Defenses of Tenocytes via Nrf2 Signal Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 17, 2023. doi: 10.3390/ijms241713299.

TORRES, L. E. C. et al A. Antimicrobial Activity of Plasma Rich in Platelets (PRP) on the Ocular Microbiota of Healthy Horses from Minas Gerais: In Vitro Study. *Veterinary Medicine International*, v. 2023, 2023. doi: 10.1155/2023/2407768.

VAN DER MEER, P. F.; KORTE, D. de. Platelet preservation: Agitation and containers. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 44, n. 3, p. 297–304, 2011. doi: 10.1016/j.transci.2011.03.005.

VELLOSO ALVAREZ, A. et al. A Survey of Clinical Usage of Non-steroidal Intra-Articular Therapeutics by Equine Practitioners. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 1–10, 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.579967.

VELLOSO ALVAREZ, A. et al. Effects of Autologous Conditioned Serum, Autologous Protein Solution, and Triamcinolone on Inflammatory and Catabolic Gene Expression in Equine Cartilage and Synovial Explants Treated With IL-1 β in Co-culture. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 1–11, 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.00323.

WILSON, J. M.; MCKENZIE, E.; DUESTERDIECK-ZELLMER, K. International survey regarding the use of rehabilitation modalities in horses. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 5, p. 1–8, 2018. doi: 10.3389/fvets.2018.00120.

WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, v.27, n.4, p. 825–853, 2016. doi: 10.1016/j.pmr.2016.06.002.

XIE, X.; ZHANG, C.; TUAN, R. S. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research and Therapy*, v.16, n.1, p.1–15, 2014. doi: 10.1186/ar4493.

XU, X. R. et al. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v.53,

n.6, p.409–430, 2016. doi: 10.1080/10408363.2016.1200008.

YAMADA, A. L.M. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: Avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.2, p.318–322, 2012. doi: 10.1590/S0102-09352012000200010

YAMADA, A. L.M. et al. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: Uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, n.6, p.461–467, 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2016000600001.

YEAMAN, M. R. Platelets: At the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology*, v.12, n.6, p.426–437, 2014. doi: 10.1038/nrmicro3269.

YOUSSEFIAN T. et al. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*, v.99, n.11, p.4021–4029, 2002.

ZANOTTO, G. M.; FRISBIE, D. D. Current joint therapy usage in equine practice: Changes in the last 10 years. *Equine Veterinary Journal*, v. 54, n. 4, p. 750–756, 2022. doi: 10.1111/evj.13489.

CAPÍTULO 2 – VIABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE PROTÓTIPO DE KIT PARA PRODUÇÃO MANUAL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM SISTEMA SEMI-FECHADO.

RESUMO

O efeito terapêutico do PRP ocorre devido à capacidade das plaquetas de liberar quantidades elevadas de fatores de crescimento, fatores angiogênicos e mediadores inflamatórios que podem modular a resposta inflamatória e assim estimular a reparação dos tecidos. O objetivo desse estudo foi elaborar e testar um protótipo de kit para produção de PRP equino; preparar um PRP equino de maneira asséptica utilizando protótipo de kit a baixo custo, em sistema semi-fechado; avaliar as características celulares do PRP produzido; e avaliar a influência de características hematológicas no PRP. Foram selecionados 26 equinos da raça Quarto de Milha e produzido 26 PRPs. Para produção do PRP foi utilizado protótipo de kit composto por tubo Falcon com capacidade de 15 mL e sua tampa foi projetada e impressa em impressora 3 D. A contagem média de plaquetas e o incremento plaquetário foram de $830 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($\pm 185,1$) e 6,13% ($\pm 1,3$), respectivamente. O protocolo de preparação do PRP realizado por meio de protótipo de kit no presente estudo é capaz de produzir um concentrado de plaquetas adequado, sem contaminação bacteriana e em volume adequado para infiltrações.

Palavras-chave: impressão 3D, PRP, reparo tecidual, terapia celular

CHAPTER 2 - VIABILITY AND CHARACTERIZATION OF A PROTOTYPE KIT FOR MANUAL PRODUCTION OF PLATELET-RICH PLASMA IN A SEMI-CLOSED SYSTEM

ABSTRACT

The therapeutic effect of PRP occurs due to the ability of platelets to release high amounts of growth factors, angiogenic factors, and inflammatory mediators that can modulate the inflammatory response and thus stimulate tissue repair. The objectives of this study were to prepare an equine PRP aseptically using a low-cost prototype kit in a semi-closed system, to evaluate the cellular characteristics of the PRP produced, and to evaluate the influence of hematological characteristics on the PRP. Twenty-six Quarter Horse horses were selected, and 26 PRPs were produced. To make the PRP, a prototype kit consisting of a Falcon tube with a capacity of 15 mL was used, and its cap was designed and printed on a 3D printer. Twenty-six PRPs were produced with an average platelet count and platelet increment of $830 \times 10^3/\mu\text{L}$ (± 185.1) and 6.13% (± 1.3), respectively. The PRP preparation protocol performed using a prototype kit in the present study can produce an adequate platelet concentrate without bacterial contamination and in a proper volume of musculoskeletal infiltrations.

Keywords: 3D printing, cell therapy, PRP, tissue repair

INTRODUÇÃO

O reconhecimento do papel das plaquetas na inflamação e na reparação tecidual permitiu que o interesse no uso clínico dessas células crescesse no campo da medicina regenerativa, a partir da década de 80 (Camargo Garbin; Lopez; Carmona, 2021). O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um derivado sanguíneo, caracterizado por uma concentração de plaquetas superior à encontrada no sangue total. Seu efeito terapêutico ocorre devido à capacidade das plaquetas de liberar quantidades elevadas de fatores de crescimento, fatores angiogênicos e mediadores inflamatórios. Esses componentes podem modular a resposta inflamatória e assim estimular a reparação dos tecidos (Wu; Diaz; Borg-Stein, 2016).

Em equinos, o PRP é amplamente utilizado no tratamento de tendinites, desmites, lesões articulares, endometrite, feridas de pele e laminites (Carmona; Gómez; López, 2018; Montano *et al.*, 2021; Pedroso *et al.*, 2021; Peng *et al.*, 2024; Segabinazzi; Canisso; *et al.*, 2021) Mesmo com a ampla utilização e aceitação do PRP na medicina equina, as pesquisas continuam com o objetivo de fornecer evidências consistentes sobre seus benefícios clínicos e estabelecer, principalmente, um protocolo padronizado para sua produção, uma vez que atualmente existem diversos métodos distintos (Pereira, Roberta Carneiro da Fontoura *et al.*, 2019; Segabinazzi; Podico; *et al.*, 2021).

A maioria dos estudos sobre o tema relata o uso de processos manuais para a produção do PRP (Colombo *et al.*, 2022; Paz *et al.*, 2022; Segabinazzi *et al.*, 2021b; Textor; Tablin, 2013); porém, estão disponíveis atualmente sistemas comerciais para obtenção do PRP, ainda que todos sejam de origem internacional. Até a presente pesquisa, desconhece-se um kit comercial brasileiro. Os kits importados geralmente têm alto custo e é necessário uso de centrífugas especiais para a preparação do PRP.

Com isso, o desenvolvimento de um kit com baixo custo pode fornecer uma importante ferramenta para viabilizar a produção de um PRP autólogo equino de qualidade em nosso país. Essa inovação no meio veterinário deverá possibilitar ao profissional o uso seguro de uma importante terapia celular tanto dentro de hospitais veterinários como no campo, se tornando uma opção de tratamento atual, sem a necessidade de deslocamento a centros clínicos.

Portanto, os objetivos desse estudo foram elaborar um protótipo de kit de PRP; preparar um PRP equino de maneira asséptica utilizando protótipo de kit a baixo custo, em sistema semifechado; avaliar as características celulares do PRP produzido; e avaliar a influência de características hematológicas no PRP.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos envolvendo animais nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFG) sob protocolo 010/22 e foram conduzidos de acordo com as normas de bem-estar animal. Foram selecionados 26 animais hospedados em um centro de treinamento, hípidos, da raça Quarto de Milha, com idade variando de cinco a 12 anos, sendo 17 machos e 9 fêmeas.

Para produção de cada PRP, foi utilizado um protótipo de kit composto por três tubos tipo Falcon com capacidade para 15 mL cada (Tubo Falcon não estéril, Mylabor, Brasil), seringa hipodérmica 60, 20 e 3 mL (Medix, Brasil), cateter 14 G (Medix, Brasil), escalp para infusão intravenosa 19 G (Medix, Brasil), agulha hipodérmica descartável 21 G (Medix, Brasil), tampa vedadora de seringa (Medix, Brasil), agulha raquidiana espinhal (Unisis, Japão) e embalagem plástica (AT, Brasil). A tampa do tubo Falcon foi projetada e confeccionada no Parque Tecnológico Samambaia/Universidade Federal de Goiás, por meio do programa Fusion 360, e impressa em impressora 3D (Ender 3 s1) (FIGURA 1). O material utilizado para produção foi filamento em ácido polilático (PLA *Premium High Temperature High Speed* Branco, 3D Prime, Brasil). Foram impressas 90 tampas. A tampa tem diâmetro de 22 mm, e peso de 2,4 gramas, é rosqueável e tem uma abertura redonda de 6 mm na parte superior para aspiração de conteúdo dentro do tubo. O tubo Falcon e a tampa (FIGURA 2) foram esterilizados em óxido de etileno.

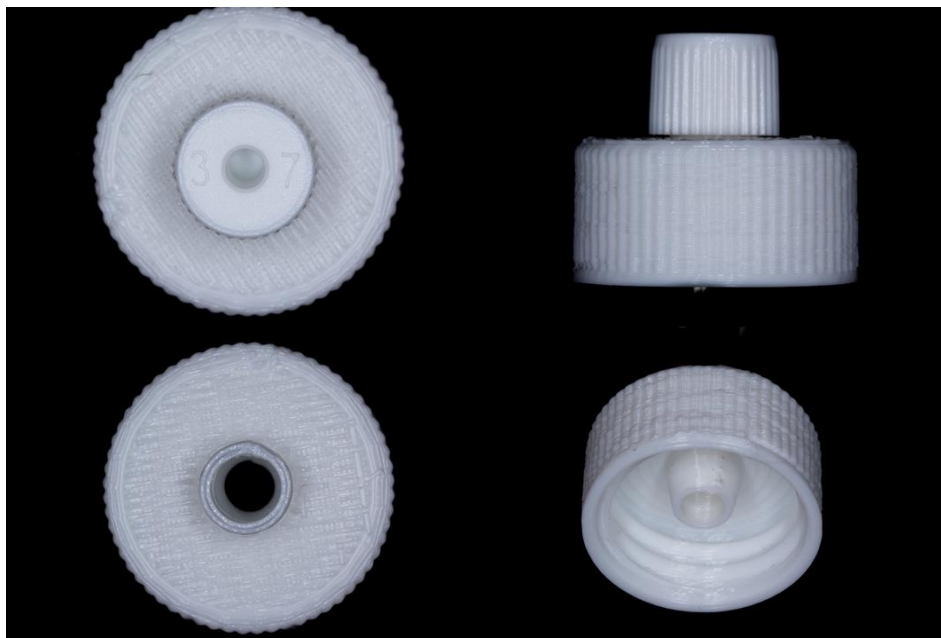


FIGURA 1 - Tampa para tubo Falcon de 15 mL para coleta de PRP, confeccionada em impressora 3D.



FIGURA 2 -Tubo Falcon de 15 mL acoplado à tampa personalizada produzida em impressora 3 D para processamento de PRP em sistema semifechado.

Previamente à coleta para o PRP, foi coletado sangue total em tubos contendo EDTA e ativador de coágulo, os quais foram armazenados em caixa térmica refrigerada e encaminhados ao laboratório, para análises posteriores.

A preparação do PRP foi realizada no Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos/EVZ/UFG, em capela de fluxo contínuo. Para obtenção do PRP, em uma seringa hipodérmica de 60 mL foram adicionados de maneira asséptica 4,5 mL de anticoagulante ACD (Solução anticoagulante ACD para aférese, JP Farma, Brasil). Após antissepsia com iodopolvidona degermante e álcool 70%, da pele na região do terço cranial da veia jugular externa, 30 mL de sangue total foram colhidos na seringa de 60 mL, com auxílio de escalpe 19 G. O sangue foi homogeneizado manualmente, com dez movimentos delicados de inversão, e a seringa foi fechada com tampa vedadora e acondicionada em embalagem plástica e encaminhada ao laboratório.

No laboratório, após higienização da bancada e da centrífuga com álcool 70%, as amostras de sangue foram novamente homogeneizadas manualmente, a seringa higienizada com álcool 70% e o sangue transferido para o tubo Falcon, em capela de fluxo laminar (Airstream Esco® vertical class II bsc). Foi realizada a primeira centrifugação (Centribio® Modelo 80-2B) a 1000 rpm, durante 10 minutos. O plasma sobrenadante foi colhido com auxílio de seringa de 10 mL e cateter acoplado ao mandril 14 G, e transferido para outro tubo Falcon. Os tubos foram novamente centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. Após a segunda centrifugação com auxílio de seringa de 20 mL e agulha espinhal 20 G, 80 % do plasma na parte superior do tubo foi descartado (plasma pobre em plaquetas) e a fração remanescente (PRP) foi homogeneizada em vórtex por aproximadamente 30 segundos até dissolução do botão de plaquetas e hemácias e transferidos para uma seringa estéril. O PRP foi alíquotado em oito tubos tipo Eppendorf previamente esterilizados. Duas amostras frescas foram utilizadas para cultura e contagem celular. O restante das amostras foi congelado em freezer -20°C (Dutra *et al.*, 2025).

As análises do PRP e contagem de células do sangue total foram realizadas no laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário Equus Center – Goiânia/GO. A contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias do sangue total e do PRP foi realizada em analisador hematológico (Celltac Alpha VET MEK-6550®) (Miranda *et al.*, 2019). O PRP foi avaliado quanto à coloração em amarelado, discretamente hemolisado e intensamente hemolisado. Foram avaliadas a ausência e presença de botão plaquetário.

A cultura foi realizada pelo Laboratório de Doenças Infecciosas e Bacteriologia, da EVZ/UFG, por meio de cultivo em meios de cultura (Oliveira, 2018).

Os tubos de EDTA e com ativador de coágulo foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos e o plasma e soro foram acondicionados em microtubos e armazenados em freezer -20°C , por 77 dias. As amostras congeladas de soro foram descongeladas e submetidas à análise da concentração de proteína total, albumina, globulina, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), bilirrubina total, bilirrubina indireta bilirrubina direta, ureia e creatinina.

Para a quantificação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) no plasma e no PRP, foi utilizado o método de ELISA com o kit Equine PDGF-BB ELISA (*Platelet-Derived Growth Factor*, Sigma-Aldrich) (Freitas *et al.*, 2023). As amostras foram armazenadas a -20°C e, no momento do teste, retiradas e submetidas à temperatura ambiente de 22°C para descongelamento. As amostras foram inicialmente sensibilizadas ao antígeno, passadas por lavagens sequenciais, até a adição do anticorpo, e o imunoenensaio realizado de acordo com instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos com base na leitura de densidade ótica (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher). Os testes foram realizados no laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia In Vitro da Faculdade de Farmácia da UFG.

Para análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para os dados paramétricos foi utilizado teste t pareado, enquanto para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para comparação de distribuições. Para avaliar a correlação entre as variáveis, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Utilizou-se programa estatístico Prisma, com grau de significância de 5% para todos os testes.

RESULTADOS

Foram produzidos 26 PRPs, com contagem média de plaquetas e incremento plaquetário de $830 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($\pm 185,1$) e 6,13% ($\pm 1,3$), respectivamente (TABELA 1).

TABELA 1 - Avaliação celular e incremento plaquetário do Plasma Rico em Plaquetas em 26 cavalos

Animal	Plaquetas ST $\times 10^3/\mu\text{L}$	Plaquetas PRP $\times 10^3/\mu\text{L}$	Leucócitos PRP/ μL	Hemácias PRP $\times 10^6/\mu\text{L}$	Incremento plaquetário (%)
1	106	539	300	0,02	5,1
2	134	780	400	0,01	5,8

3	123	612	700	0,02	5,0
4	86	842	600	0,02	9,8
5	132	697	200	0,01	5,3
6	118	746	300	0,01	6,3
7	123	693	900	0,05	5,6
8	114	975	1700	0,03	8,6
9	155	939	300	0,08	6,1
10	164	1031	600	0,02	6,3
11	148	1229	300	0,17	8,3
12	151	1223	600	0,02	8,1
13	128	811	500	0,05	6,3
14	134	996	700	0,03	7,4
15	152	748	200	0,01	4,9
16	144	792	400	0,01	5,5
17	179	930	600	0,01	5,2
18	149	1034	1800	0,02	6,9
19	110	757	1000	0,01	6,9
20	176	927	2500	0,03	5,3
21	157	970	1100	0,01	6,2
22	127	745	900	0,02	5,9
23	107	531	600	0,01	5,0
24	132	688	200	0,01	5,2
25	159	631	300	0,01	4,0
26	155	715	400	0,01	4,6
Média	137	830	696,1	0,03	6,13
Desvio padrão	22,8	185,1	543,8	0,03	1,3

Legenda: ST: sangue total; PRP: plasma rico em plaquetas.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas nas contagens de plaquetas, leucócitos e hemácias no PRP. Houve aumento na contagem de plaquetas no PRP em comparação ao sangue total em 26 amostras ($p < 0,0001$). A contagem total de leucócitos foi reduzida ($p < 0,0001$) em comparação com sangue total em todas as amostras, obtendo uma redução média de 14,9 vezes ($14 \pm 8,7$). Da mesma forma, houve redução significativa das hemácias no PRP ($p < 0,0001$), com média de redução de 553,2 vezes ($553,2 \pm 284,7$).

As amostras de PRP apresentaram aspecto turvo (26/26) e coloração amarelado (23/26), discretamente hemolisado (2/26) ou intensamente hemolisado (1/26) (FIGURA 3). A média de proteína total do PRP foi 5,8 mg/dL ($5,8 \pm 0,29$).

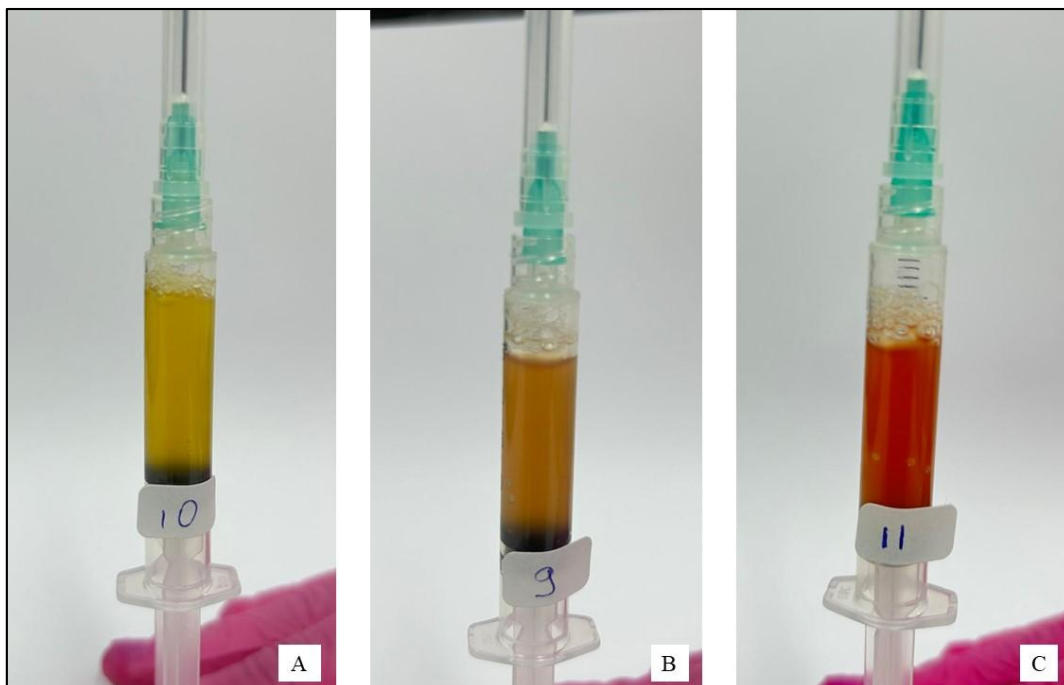


FIGURA 3 - Colorações do Plasma rico em plaquetas equino: (A) amarelado; (B) discretamente hemolisado (C) intensamente hemolisado.

Após a segunda centrifugação, foi observada presença de botão plaquetário em todas as amostras (FIGURA 4).

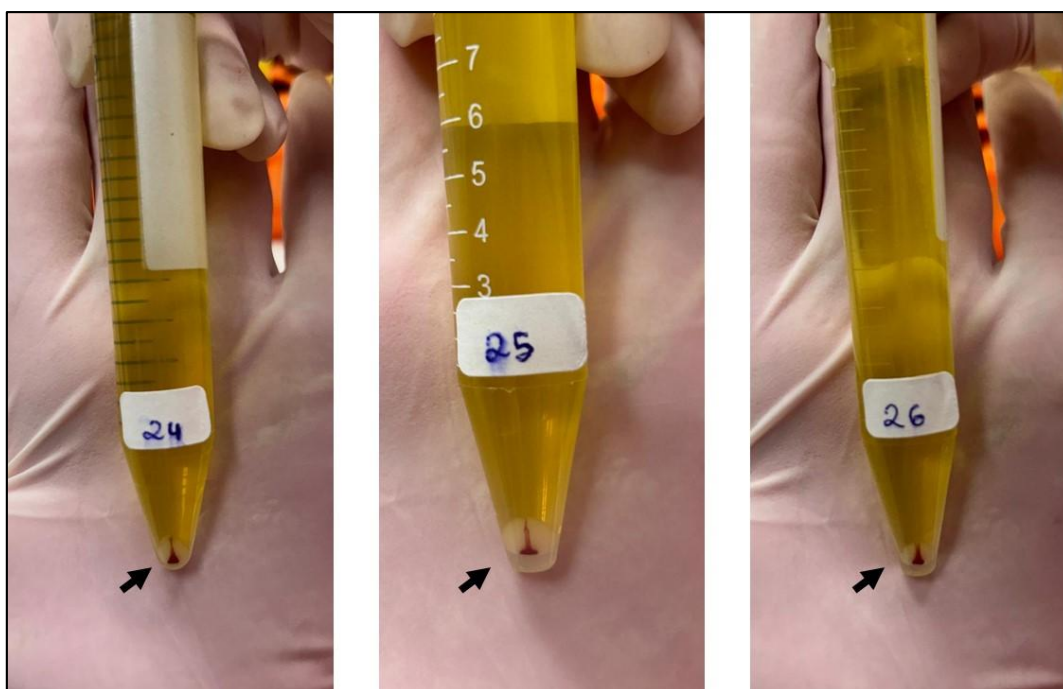


FIGURA 4 - Presença de botão de plaquetas e hemácias no fundo do tubo Falcon, após a segunda centrifugação (setas).

Houve correlação positiva moderada (Spearman r 0,43; $p=0,02$) entre a contagem de plaquetas do sangue total e a contagem de plaquetas do PRP (FIGURA 5) e entre a contagem de hemácias do sangue total e a contagem de plaquetas do PRP (Spearman r 0,42; $p=0,03$) (FIGURA 6).

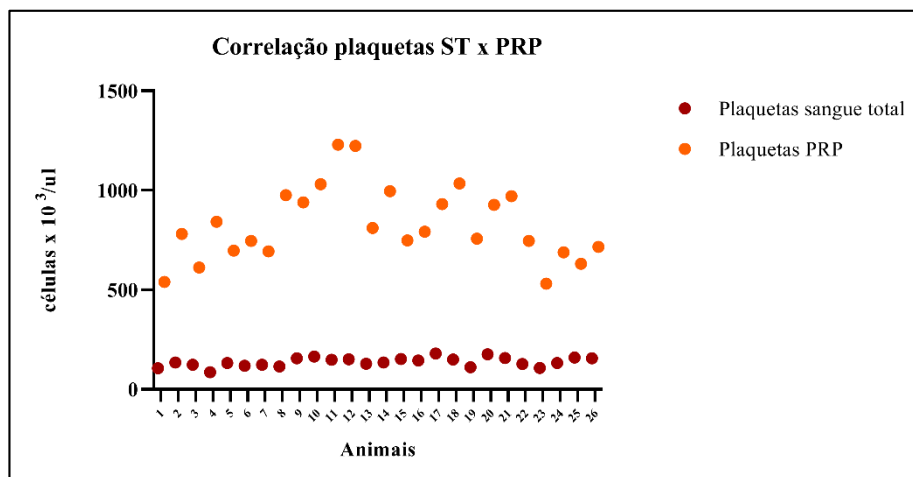


FIGURA 5 - Gráfico representativo para a correlação positiva entre as plaquetas do sangue total e plaquetas do PRP em equinos (Teste de Spearman, $p=0,02$).

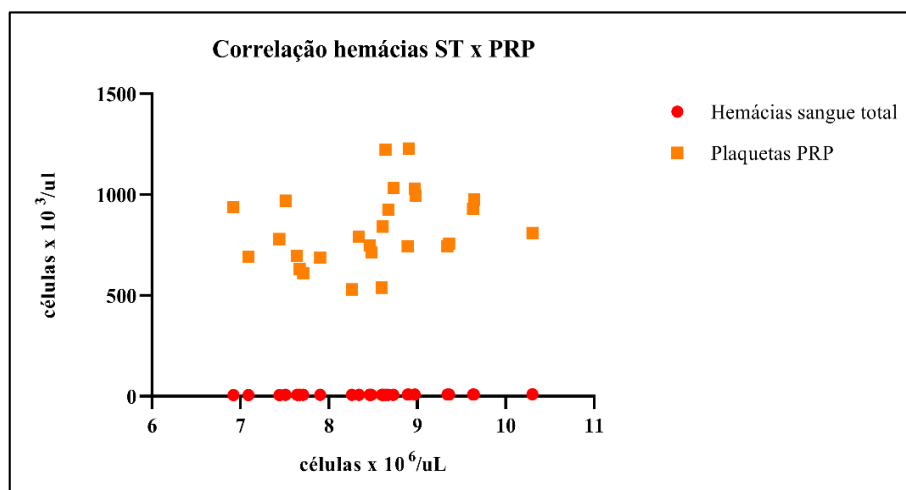


FIGURA 6 - Gráfico representativo da correlação positiva entre as hemácias do sangue total e plaquetas do PRP em equinos (Teste de Spearman, $p=0,03$).

Não foi observada correlação significativa (Teste de Spearman) entre a concentração de plaquetas com a concentração de ureia ($r=0,05$), creatinina ($r=0,12$), AST ($r=0,02$), GGT ($r=-0,02$), bilirrubinas ($r=0,18$), albumina ($r=-0,08$) e globulina

($r = 0,01$). Também, não houve correlação entre peso vivo e sexo na contagem final de plaquetas do PRP.

Houve diferença estatística ($p < 0,0001$) entre as concentrações de PDGF do PRP e do plasma, com maiores concentrações dessa proteína nas amostras de PRP (FIGURA 7). Não foi observada correlação entre a concentração de plaquetas do PRP e a concentração PDGF ($r = 0,18$; $p = 0,36$).

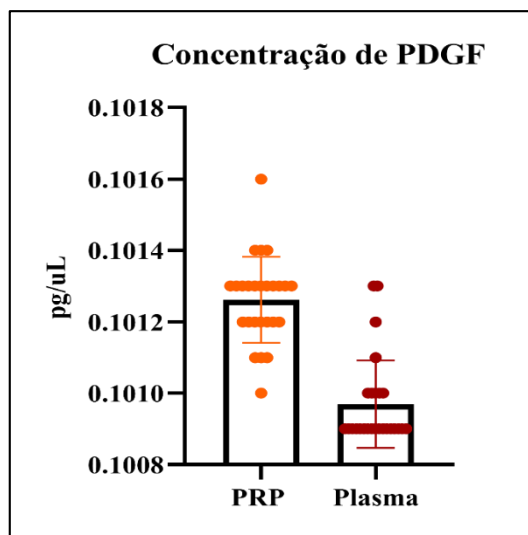


FIGURA 7 - Gráfico representativo da concentração de PDGF no plasma e PRP de equinos.

Não houve crescimento bacteriano em nenhuma das amostras analisadas.

O custo de cada kit foi de R\$ 37,54, incluindo material para produção e materiais para processamento (QUADRO 1).

QUADRO 1 - Relação dos materiais utilizados para a produção de PRP em cada animal.

Material	Valor (R\$)	Unidade	Valor total (R\$)
Agulha 30x08	0,05/unidade	1	0,05
Agulha espinhal 20 G 150 mm	30/unidade	1	30,00
Anticoagulante ACD	47,5/unidade 1 L	4,8 mL	0,20
Cateter intravenoso 14 G	R\$ 0,73/unidade	2	1,46
Filamento para impressão da tampa	109,00/kg	7,2 g (3 tampas)	0,80
Embalagem plástica	20,00/200 unidades	1	0,10
Scapl 19 G	0,15/unidade	1	0,15
Seringa 20 mL	0,16/unidade	2	0,32
Seringa 3 mL	0,16/unidade	1	0,32
Seringa 60 mL	1,10/unidade	1	1,10
Tampa vedadora	0,34/unidade	1	0,34

Tubo tipo Falcon	0,90/unidade	3	2,70
Total			37,54

DISCUSSÃO

Esse estudo foi conduzido como o objetivo de elaborar e avaliar o potencial de um protótipo de kit para produção de PRP a baixo custo. Atualmente, não há um kit nacional para produção de PRP para equinos, o que leva veterinários e clínicas a utilizarem métodos manuais ou importar kits de alto custo. A utilização de protocolos automatizados oferece a vantagem de empregar métodos já padronizados e menos sujeitos a erro humano, mas o alto custo dos kits e também de dispositivos de centrifugação específicos para cada tipo de kit limitam o acesso dos profissionais. Por outro lado, a utilização de protocolos manuais não requer equipamentos especializados, mas resulta em maior variedade de resultados, nem sempre previsíveis e confiáveis (Segabinazzi; Podico; et al., 2021).

No presente estudo, a metodologia aplicada para a obtenção do PRP com a utilização de um protótipo de kit visou separar um plasma com maior concentração de plaquetas e menor de leucócitos totais. O protocolo apresentou boa repetibilidade e concentração adequada de plaquetas, e menor de leucócitos e hemácias. Houve moderada oscilação na concentração plaquetária, com contagem de plaquetas e incremento plaquetário variando de $531 \times 10^3 /\mu\text{L}$ a $1229 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($830 \pm 185,1$) e 4 a 9,8 vezes ($6,13 \pm 1,39$), respectivamente.

Em todas as amostras se formou o botão plaquetário na porção inferior do tubo, sugerindo uma correlação entre sua presença e uma concentração maior de plaquetas. Embora não haja um padrão definido para a quantidade de plaquetas no PRP, sua concentração é considerada o principal fator para avaliar a qualidade do produto e determinar o protocolo mais adequado para sua produção (Hurley et al., 2024). Uma revisão sistemática sobre uso do PRP intra-articular em equinos mostrou que as concentrações plaquetárias variaram de $98,7 \times 10^3 /\mu\text{L}$ a $1695 \times 10^3 /\mu\text{L}$, e cerca de metade delas eram de três a cinco vezes maiores que as do sangue total (Peng et al., 2024). A média da contagem de plaquetas no PRP desse estudo, $830 \pm 185,1$, foi maior que de outros trabalhos que produziram PRP manualmente sem kits comerciais, $761,8 \pm 41,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Miranda et al., 2019), $785,16 \pm 346,97 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Dutra et al., 2025), $344,4 \pm 13,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Torres et al., 2023), $709,4 \pm 159,8 \times 10^3/\mu\text{L}$, $327,5 \pm 64,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $239,4$

$\pm 64,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Segabinazzi; Canisso; *et al.*, 2021) e também daqueles estudos que produziram PRP com kits comerciais, $650 \pm 242,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Textor; Willits; Tablin, 2013), $658 \pm 209,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Mirza *et al.*, 2016) e $621 \pm 200 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Smit *et al.*, 2019). Os resultados desse estudo se mostram superiores na capacidade de concentração de plaquetas pelo método descrito, utilizando o protótipo.

A contagem de leucócitos total foi reduzida em todas as amostras de PRP. A concentração dessa célula não foi definida para o PRP equino e ainda há controvérsias a respeito dos níveis de glóbulos brancos adequados para um PRP de alta qualidade. Apesar de os leucócitos desempenharem papel importante no reparo tecidual e proteção contra agentes infecciosos (Castillo *et al.*, 2011), em alguns tecidos eles parecem induzir efeitos pró-inflamatórios e imunológicos, que podem induzir danos locais indesejáveis, o que poderia contrapor os efeitos curativos pretendidos da terapia com PRP (Bogers, 2018; Boswell *et al.*, 2014). Alguns estudos apontam que PRP com alta contagem de leucócitos podem ser prejudicial por causar um processo inflamatório intra-articular agudo (Boswell *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2011). Por outro lado, um efeito benéfico foi sugerido após infusão intrauterina de leucócitos, com eliminação da contaminação bacteriana mais rapidamente do útero de éguas suscetíveis a endometrite (Neves *et al.*, 2007).

Assim como no caso dos outros componentes celulares do PRP, não há padronização para a contagem de hemácias, mas neste protocolo buscou-se regular a quantidade de glóbulos vermelhos. De fato, a concentração de hemácias se mostrou baixa em todos os animais ($0,02 \pm 0,03 \times 10^6/\mu\text{L}$), com exceção apenas da amostra do animal 11 ($0,17 \times 10^6/\mu\text{L}$), que apresentou coloração avermelhada no PRP final, mas sem interferência na concentração de plaquetas. Essa maior contagem resultou provavelmente de contaminação durante a coleta do plasma.

O volume de 30 mL de sangue total permitiu produzir aproximadamente 3 mL de PRP, volume suficiente para infiltração em lesões de ligamentos e tendões (M'Cloud *et al.*, 2024) e algumas articulações menores, como interfalageanas e boleto (Peng *et al.*, 2024). Para infiltrações em articulações maiores (Peng *et al.*, 2024) e infusões uterinas (Segabinazzi; Podico; *et al.*, 2021) seria necessário utilizar o equivalente a dois ou mais kits.

Não houve contaminação bacteriana em nenhuma das amostras do PRP no presente estudo. A antisepsia cirúrgica da veia jugular, a limpeza da bancada e dos materiais com álcool 70% e a utilização de máscara facial e touca foram medidas eficazes para evitar a contaminação. Uma técnica limpa e rigorosa durante todo o processo de

preparação do PRP é essencial para o sucesso da terapia. As principais fontes de contaminação bacteriana durante as preparações de PRP são a pele do paciente, as mãos e trato respiratório superior do profissional e as bactérias ambientais (Álvarez; Giraldo; Carmona, 2010). Realizar antissepsia do sítio de colheita e manipular o sangue em um ambiente sem poeira, com correntes de ar mínimas são práticas importantes para aumentar a segurança da preparação de PRP (Álvarez; Giraldo; Carmona, 2010) , que foram seguidas nesse estudo.

A literatura menciona alguns fatores que podem influenciar na concentração celular do PRP (Giraldo et al., 2013; Rinnovati et al., 2016; Pedroso et al., 2021). Não foi observada correlação entre idade e gênero com a concentração plaquetária do PRP nos resultados obtidos, corroborando os resultados de outros pesquisadores (Paz et al., 2022). Giraldo e colaboradores demonstraram resultados diferentes, com concentração maior de plaquetas e fatores de crescimento (PDGF) em fêmeas; no entanto, assim como na presente pesquisa, não houve uma proporção simétrica entre os gêneros (Giraldo *et al.*, 2013).

O fator de crescimento derivado de plaquetas é secretado significativamente pelas plaquetas e é conhecido por induzir proliferação de diversos tipos celulares (Lee *et al.*, 2025). No presente experimento, apesar de todas as amostras de PRP terem concentração de PDGF maior que do plasma, não foi verificada correlação positiva desse fator de crescimento com a concentração de plaquetas no produto final do PRP, como abordado em outros trabalhos (Freitas et al., 2023; Lee et al., 2025).

O protótipo de kit teve um custo total R\$ 37,54, incluindo itens para sua produção e preparação do PRP. Esse valor permitirá a comercialização de um kit com custo inferior aos internacionais, como Restigen® PRP (Zoetis, EUA) e ProVet™ ACP (Dechra, EUA), que tem custo de \$247,90 e \$280,00, respectivamente.

Por outro lado, o objetivo da confecção da tampa com uma pequena entrada no centro, é de evitar a abertura de vários frascos durante a manipulação do sangue total e plasma, como ocorre com tubos de coleta de sangue no preparo manual de PRP (Dutra *et al.*, 2025; Pereira, Rcf; Zacarias, 2013; Segabinazzi; Canisso; *et al.*, 2021). A diminuição da exposição a correntes de ar externas permite a produção de um produto com menos risco de contaminação e mais segurança para infiltrações, especialmente as intra-articulares (Álvarez; Giraldo; Carmona, 2010). Além disso, a utilização de tubo Falcon de 15 mL tem a grande vantagem da não necessidade de utilização de centrífugas especiais para a produção do PRP, o que viabiliza sua utilização por profissionais que já

possuem estrutura básica de laboratório em suas clínicas. Ainda, o custo de centrífugas para tubos menores como o Falcon de 15 mL, é inferior ao de centrífugas para tubos de 50 mL e centrífugas especiais para os kits importados.

CONCLUSÃO

O protótipo para produção de PRP desenvolvido neste estudo permite produzir concentrado de plaquetas com baixo risco de contaminação, com baixa contagem de hemácias e leucócitos. O volume de PRP obtido com o kit é suficiente para infiltração da maioria das lesões musculoesqueléticas em equinos. O baixo custo de produção do kit pode viabilizar a utilização do PRP em equinos por um número maior de profissionais.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, M. E.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J. U. Monitoring bacterial contamination in equine platelet concentrates obtained by the tube method in a clean laboratory environment under three different technical conditions. *Equine Veterinary Journal*, v.42, n.1, p. 63–67, 2010. doi: 10.2746/042516409X455221

BOGERS, S. H. Cell-based therapies for joint disease in veterinary medicine: What we have learned and what we need to know. *Frontiers in Veterinary Science*, v.5, p.1–17, 2018. doi:10.3389/fvets.2018.00070.

BOSWELL, S. G. et al. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *American Journal of Sports Medicine*, v.42, n.1, p.42–49, 2014. doi: 10.1177/0363546513507566.

CAMARGO GARBIN, L.; LOPEZ, C.; CARMONA, J. U. A Critical Overview of the Use of Platelet-Rich Plasma in Equine Medicine Over the Last Decade. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.1–10, 2021. doi: 10.3389/fvets.2021.641818.

CARMONA, J. U.; GÓMEZ, W. A.; LÓPEZ, C. Could Platelet-Rich Plasma Be a Clinical Treatment for Horses With Laminitis? *Journal of Equine Veterinary Science*, v.61, p.46–57, 2018. doi: 10.1016/j.jevs.2017.11.004.

CASTILLO, T. N. et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from

commercial platelet-rich plasma separation systems. *American Journal of Sports Medicine*, v.39, n.2, p.266–271, 2011. doi:10.1177/0363546510387517

COLOMBO, I. et al. Effect of platelet lysate on uterine response of mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Theriogenology*, v.179, p.204–210, 2022. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.12.001.

DUTRA, H. T. et al. Short-term effects of platelet-rich plasma on the synovial fluid of horses with induced synovitis. *Ciencia Rural*, v.55, n.5, 2025. doi: doi.org/10.1590/0103-8478cr20230200.

FREITAS, N. P. P. et al. Freeze-dried Platelet-rich Plasma and Stem Cell-conditioned Medium for Therapeutic Use in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 121, 2023. doi:10.1016/j.jevs.2022.104189.

GIRALDO, C. E. et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research*, v.9, 2013. doi: 10.1186/1746-6148-9-29.

HURLEY, E. T. et al. Experts Achieve Consensus on a Majority of Statements Regarding Platelet-Rich Plasma Treatments for Treatment of Musculoskeletal Pathology. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, v.40, n.2, p. 470-477, 2024. doi: https://doi.org/10.1016/j.arthro.2023.08.020.

LEE, C. H. et al. The growth factor content as an indicator of platelet counts in platelet-rich plasma. *Clinica Chimica Acta*, v.564, 2024, p. 2023–2026, 2025. doi: 10.1016/j.cca.2024.119901.

M'CLOUD, W. R. C. et al. Stem cells and platelet-rich plasma for the treatment of naturally occurring equine tendon and ligament injuries: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.262, p.S50–S60, 2024. doi: 10.2460/javma.23.12.0723.

MIRANDA, S. et al. Protocols for preparation of platelet rich plasma (PRP) in Quarter Horses. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 39, n.8, p.614–621, 2019. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5883.

MIRZA, M. H. et al Gait changes vary among horses with naturally occurring osteoarthritis following intra-articular administration of autologous platelet-rich plasma. *Frontiers in Veterinary Science*, v.3, p.1–9, 2016. doi: 10.3389/fvets.2016.00029.

MONTANO, C. et al. The use of platelet-rich plasma for treatment of tenodesmic lesions in horses: A systematic review and meta-analysis of clinical and experimental data. *Animals*, v.11, n.3, p.1–18, 2021. doi: 10.3390/ani11030793.

NEVES, A. P. et al. Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Animal Reproduction Science*, v.97, n.3–4, p.314–322, 2007. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.01.010.

OLIVEIRA, S. J. Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária. ULBRA, 2018.

PAZ, L. B. et al. Effects of breed, age and gender on equine platelet rich plasma and correlation of platelet count with its physical aspect. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v.74, n.5, p.759–766, 2022. doi: 10.1590/1678-4162-12517

PEDROSO, A. C. B. R. et al. Autologous platelet-rich plasma action on skin autografts in horses. *Ciencia Rural*, v.51, no. 8, 2021. doi: 10.1590/0103-8478CR20190811.

PEDROSO, A. C. B. R. et al. Influencing factors for preparation of platelet-rich plasma in horses. *Semina:Ciencias Agrarias*, v.42, n.4, p. 2327–2337, 2021. doi:10.5433/1679-0359.2021v42n4p2327.

PENG, C. et al. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of platelet-rich plasma products for treatment of equine joint disease. *Equine Veterinary Journal*, v.56, n.5, p.858–869, 2024. doi: 10.1111/evj.14042.

PEREIRA, R. C. F. et al. Evaluation of Three Methods of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Equine Distal Limb Skin Wounds. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 72, p.1–7, 2019. doi: 10.1016/j.jevs.2017.10.009

PEREIRA, R.; ZACARIAS, G. Evaluation of seven platelet-rich plasma processing protocols in the equine species. *Ciência Rural*, v.3, n.6, p.1122–1127, 2013. doi: 10.1590/S0103-84782013005000052

RINNOVATI, R. et al. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.58, n.1, p.1–5, 2016. doi:10.1186/s13028-016-0226-3.

SEGABINAZZI, L. G. T. M. et al. Intrauterine blood plasma platelet-therapy mitigates persistent breeding-induced endometritis, reduces uterine infections, and improves embryo recovery in Mares. *Antibiotics*, v.10, n.5, p.1–19, 2021. doi:10.3390/antibiotics10050490.

SEGABINAZZI, L. G. T. M. et al. Three manual noncommercial methods to prepare equine

platelet-rich plasma. *Animals*, v.11, n.6, p.1–16, 2021. doi: 10.3390/ani11061478.

SMIT, Y. et al. Clinical findings, synovial fluid cytology and growth factor concentrations after intra-articular use of a platelet-rich product in horses with osteoarthritis. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 90, n. 2019, p.1–9, 2019. doi: 10.4102/jsava.v90i0.1721.

TEXTOR, J. A.; TABLIN, F. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: Clinical signs and cytologic responses. *Veterinary Surgery*, v.42, n.5, p.499–510, 2013. doi: 10.1111/j.1532-950X.2013.12015.x.

TEXTOR, J. A.; WILLITS, N. H.; TABLIN, F. Synovial fluid growth factor and cytokine concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *The Veterinary Journal*, v.198, n.1, p.217–223, 2013. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.07.020.

TORRES, L. E. C. et al. A. Antimicrobial Activity of Plasma Rich in Platelets (PRP) on the Ocular Microbiota of Healthy Horses from Minas Gerais: In Vitro Study. *Veterinary Medicine International*, 2023. doi:10.1155/2023/2407768.

WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, v.27, n.4, p.825–853, 2016. doi: 10.1016/j.pmr.2016.06.002.

CAPÍTULO 3 – PROTÓTIPO DE KIT É MAIS EFICIENTE PARA A OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS QUE MÉTODO MANUAL TRADICIONAL

RESUMO

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP), derivado do sangue total com alta concentração de plaquetas, tem sido utilizado nas últimas décadas na medicina equina para tratar lesões inflamatórias. Este estudo comparou dois métodos não comerciais para preparo de PRP equino, um novo protótipo de kit e um protocolo manual utilizado na prática clínica, quanto à contagem de plaquetas, hemácias e leucócitos. Amostras de sangue de 12 equinos da raça Quarto de Milha foram coletadas sequencialmente em seringa de 60 mL (Método 1 - protótipo de kit) e tubo de coleta de sangue (Método 2 - método manual tradicional). As amostras de sangue para cada método foram separadas em três tempos de processamento: T1: 1h; T2: 2 h e T4: 4 h após coleta. Ainda que os dois métodos tenham sido eficazes em concentrar plaquetas e reduzir a contagem de leucócitos e hemácias nos PRPs produzidos nos diferentes tempos, O Método 1 possibilitou concentrar mais plaquetas que o Método 2 ($p < 0,0001$) nos tempos T1 e T2. Também houve diferença na contagem de leucócitos totais entre os métodos em todos os tempos ($p = 0,0105$), com maior contagem pelo Método 1 quando comparado ao 2. O protótipo de kit para produção de PRP, Método 1, é mais eficiente na obtenção de um concentrado de plaquetas, proporcionando uma contagem de plaquetas significativamente superior ao Método 2, manual tradicional. Além disso, o intervalo entre a coleta de sangue e o início do processamento do PRP interfere diretamente na concentração final de plaquetas do PRP.

Palavras-chave: Equinos, impressão 3D PRP, terapia celular.

CHAPTER 3 – KIT PROTOTYPE IS MORE EFFICIENT FOR OBTAINING PLATELET-RICH PLASMA THAN THE TRADITIONAL MANUAL METHOD

ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP), derived from whole blood with a high concentration of platelets, has been used in equine medicine for the last decades to treat inflammatory lesions. This study compared two non-commercial methods for preparing equine PRP, a new kit prototype and a manual protocol used in clinical practice regarding platelet, red blood cell, and leukocyte counts. Blood samples from 12 Quarter Horse horses were collected sequentially in a 60 mL syringe (Method 1 - kit prototype) and blood collection tube (Method 2 - traditional manual method). The blood samples for each method were separated into three processing times: T1: 1h, T2: 2h, and T4: 4h after collection. Although both methods effectively concentrated platelets and reduced the leukocyte and red blood cell counts in the PRPs produced at different times, Method 1 made it possible to concentrate more platelets than Method 2 ($p < 0.0001$) at times T1 and T2. There was also a difference in the total leukocyte count between the methods at all times ($p = 0.0105$), with a higher count using Method 1 than Method 2. The prototype kit for PRP production, Method 1, is more efficient in obtaining a platelet concentrate, providing a significantly

higher platelet count than Method 2, the traditional manual method. In addition, the interval between blood collection and the start of PRP processing directly interferes with the final platelet concentration of the PRP.

Keywords: 3D printing, PRP, cell therapy, equine.

INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma preparação oriunda do plasma autólogo, que apresenta uma concentração de plaquetas superior à do sangue total. O seu potencial terapêutico se dá pela capacidade das plaquetas de liberarem, por meio de seus grânulos, quantidades supra fisiológicas de fatores de crescimento, citocinas e outros fatores bioativos, que promovem alterações metabólicas estimulando a diferenciação e proliferação celular, melhorando assim, o potencial de reparo em tecidos biológicos (Knott et al., 2022; Wu; Diaz; Borg-Stein, 2016).

O tratamento com PRP está entre as terapias celulares mais utilizadas na medicina equina (Peng et al., 2024; Zanotto; Frisbie, 2022) e seu uso está amplamente difundido na prática clínica. No entanto, apesar de sua ampla utilização, ainda há muito debate sobre seu uso terapêutico, métodos de preparação e composição celular (Hagen et al., 2021), razão pela qual diversos estudos seguem buscando respostas (Camargo Garbin; Lopez; Carmona, 2021; Peng *et al.*, 2024).

Protocolos manuais e automatizados são descritos para preparar o PRP em uma diversidade de trabalhos (Freitas *et al.*, 2023; Giraldo *et al.*, 2013; McCarrel, 2023; Segabinazzi *et al.*, 2021). A preparação comercial e automatizada apresenta vantagem de ser padronizada e menos suscetível a interferências humanas. Contudo, o custo elevado para aquisição de equipamentos e insumos pode desencorajar o uso rotineiro do PRP. Em contrapartida, os métodos manuais não exigem aparelhos específicos, tornando-se opções mais acessíveis para a obtenção do PRP (Segabinazzi et al., 2021).

O objetivo desse estudo foi comparar dois métodos não comerciais para preparo de PRP equino, em relação à contagem celular de plaquetas, hemácias e leucócitos. Foram comparados dois métodos, o Método 1 é um novo protótipo de kit e o Método 2 é um protocolo já utilizado pelo grupo de pesquisa. Além disso, buscou-se avaliar se o tempo entre colheita do sangue total e a preparação do PRP influencia na contagem final de plaquetas do PRP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 12 equinos da raça Quarto de Milha, com idade variando de 7 a 20 anos. Todos os animais foram considerados clinicamente saudáveis, com base no exame físico e hematológico, realizado previamente às coletas de sangue.

Amostras de sangue foram coletadas sequencialmente, em um mesmo animal e no mesmo momento, em seringa de 60 mL (Método 1) e em tubos de coleta de sangue (Método 2). Uma amostra de sangue total em tubo EDTA também foi coletada para realização de contagem de células do sangue total. As amostras de sangue para cada método foram separadas em três tempos de processamento, com aproximadamente 15 mL para cada tempo: T1: as amostras foram processadas em até 1 hora após coleta; T2; as amostras foram processadas em 2 horas após a coleta; T4: as amostras foram processadas em 4 horas após coleta. Todas as amostras foram mantidas em temperatura ambiente (22°C) no laboratório.

Para obtenção do PRP pelo Método 1, foi utilizado um protótipo de kit (FIGURA 1) composto por três tubos tipo Falcon, com capacidade para 15 mL cada (Tubo Falcon não estéril, Mylabor, Brasil), seringa hipodérmica 60, 20 e 3 mL (Medix, Brasil), cateter 14 G (Medix, Brasil), escalp para infusão intravenosa 19 G (Medix, Brasil), agulha hipodérmica descartável 21 G (Medix, Brasil), tampa vedadora de seringa (Medix, Brasil), agulha raquidiana espinhal (Unisis, Japão) e embalagem plástica (AT, Brasil). A tampa do tubo Falcon foi projetada e confeccionada no Parque Tecnológico Samambaia/Universidade Federal de Goiás, por meio do programa Fusion 360, e impressa em impressora 3D (Ender 3 s1). O material utilizado para produção foi o filamento em ácido polilático (PLA Premium High Temperature High Speed Branco, 3D Prime, Brasil). A tampa rosqueável possuía diâmetro de 22 mm, peso de 2,4 gramas, e abertura redonda de 6 mm na parte superior tubo, que permitiu a aspiração de conteúdo dentro do tubo (FIGURA 1).

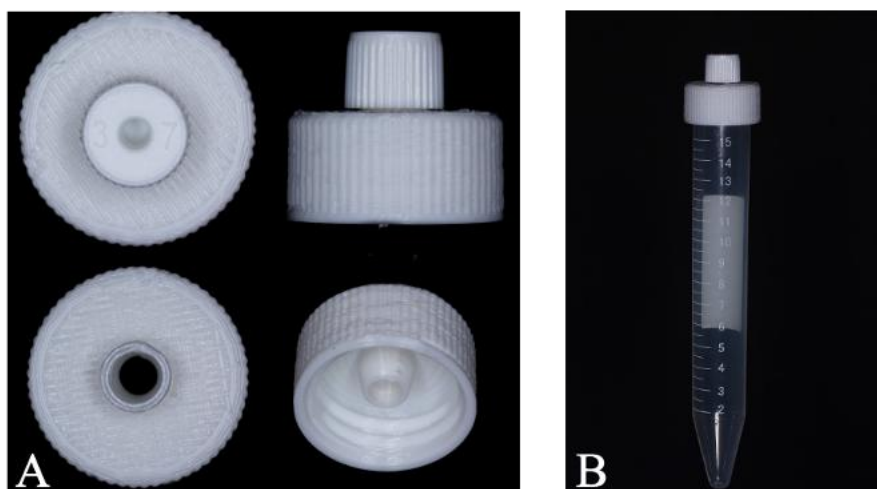


FIGURA 1 - Componentes do protótipo de Kit utilizado para obtenção do Plasma Rico em Plaquetas pelo Método 1. (A) Tampas impressas em impressora 3D. (B) Tampa adaptada em tubo Falcon comum com capacidade para 15 mL.

Em uma seringa de 60 mL foram adicionados 6,75 mL de anticoagulante ACD (solução anticoagulante para aférese, JP, Brasil) e, após antissepsia da veia jugular externa com iodopovidona degermante e álcool 70%, 45 mL de sangue total foram colhidos na seringa de 60 mL com auxílio de scalpe 19 G. As amostras de sangue foram homogeneizadas manualmente, com dez movimentos delicados de inversão, e o sangue transferido para o tubo Falcon com capacidade de 15 mL. Foi realizada a primeira centrifugação a 1000 rpm, durante 10 minutos. O plasma sobrenadante foi colhido com auxílio de seringa de 10 mL e cateter 14 G, e transferido para outro tubo Falcon. Os tubos foram novamente centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. Após a segunda centrifugação com auxílio de seringa de 10 mL e agulha espinhal 15 cm, 80 % do plasma sobrenadante foi descartado e a fração remanescente foi homogeneizada em vórtex por aproximadamente 20 segundos até dissolução do botão de plaquetas e hemácias e transferidos para seringa estéril.

Para obtenção do PRP no Método 2, aproximadamente 51 ml de sangue total foram colhidos da veia jugular de cada cavalo, após antissepsia com iodopovidona degermante e álcool 70%. O sangue foi distribuído em seis frascos de ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose, com capacidade para 8,5 mL cada (BD Vacutainer®ACD 8,5 mL). As amostras foram homogeneizadas manualmente, com movimentos sutis de inversão, e submetidas à centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos. O plasma sobrenadante foi

colhido e transferido para tubos secos, com capacidade para 10 mL cada. Os tubos foram novamente centrifugados a 2000 rpm, durante 10 minutos. Após a segunda etapa de centrifugação, cerca de 80% do plasma sobrenadante foi removido, enquanto a fração restante foi submetida à agitação em vórtex por 20 segundos, garantindo a dissolução do botão de plaquetas e hemácias. Em seguida, o conteúdo foi transferido para uma seringa estéril de três mL.

O volume de plasma colhido para cada animal após a primeira centrifugação foi padronizado em seis mL para comparação dos métodos e dos tempos. Esse volume foi estabelecido devido à grande heterogeneidade entre volume de plasma após centrifugação de cada animal.

As análises do PRP e a contagem de células do sangue total foram realizadas no laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário Equus Center. A contagem de plaquetas do sangue total e do PRP foi realizada em analisador hematológico (Celltac Alpha VET MEK-6550®). Foi avaliada a ausência ou presença de botão plaquetário.

Com relação à análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para os dados paramétricos foi utilizado teste t pareado, enquanto para dados não paramétricos foi utilizada a alternativa (Kolmogorov-Smirnov para comparação de distribuições). Para comparar o tempo entre os grupos, foi utilizado teste T não pareado. Para a análise dentro do mesmo grupo, foi utilizada ANOVA. O grau de significância adotado para os testes foi de 5%.

RESULTADOS

Os dois métodos foram eficazes em concentrar plaquetas e reduzir a contagem de leucócitos e hemácias nos 36 PRPs produzidos, nos diferentes tempos (FIGURA 2). Em relação aos leucócitos, houve uma redução média de $8,04 \pm 4,75$ vezes ($p < 0,0001$) para o Método 1 e 24 ± 18 vezes ($p < 0,0001$) para o Método 2. A contagem de hemácias foi reduzida em 540 ± 186 vezes ($p < 0,0001$) no Método 1 e 608 ± 221 ($p < 0,0001$) vezes para o Método 2. Houve um incremento plaquetário médio de 4,3 vezes no Método 1 e três vezes para o Método 2 ($p < 0,0001$).

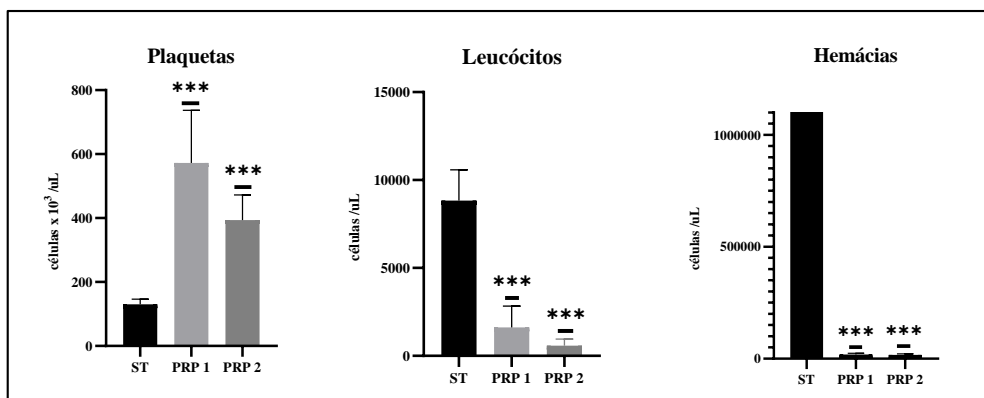


FIGURA 2 - Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias do sangue total (ST) e PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em equinos. *** Indica diferença estatística entre os grupos pelo teste de ANOVA, com $p < 0,001$.

Não houve diferença significativa entre os métodos de produção e tempo de preparação em relação à contagem de hemácias no PRP ($p > 0,05$) (FIGURA 3).

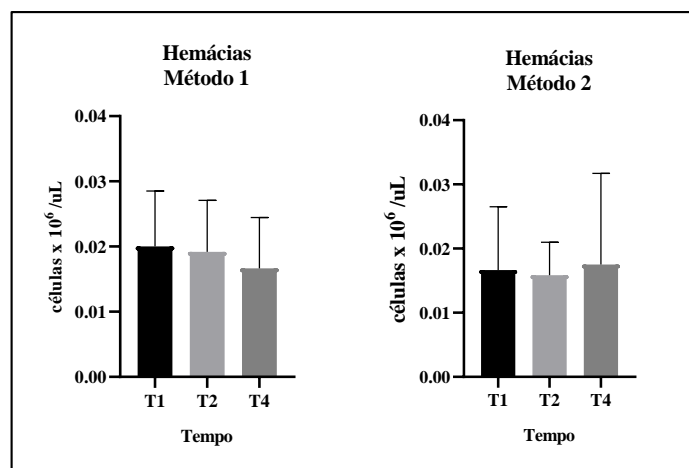


FIGURA 3 - Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de hemácias no PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em três tempos de processamento.

Em relação à contagem de leucócitos totais, houve diferença significativa entre os métodos em todos os tempos ($p = 0,0105$), com maior contagem pelo Método 1 (1617 ± 1494) quando comparado ao Método 2 ($586 \pm 523,3$) (FIGURA 4).

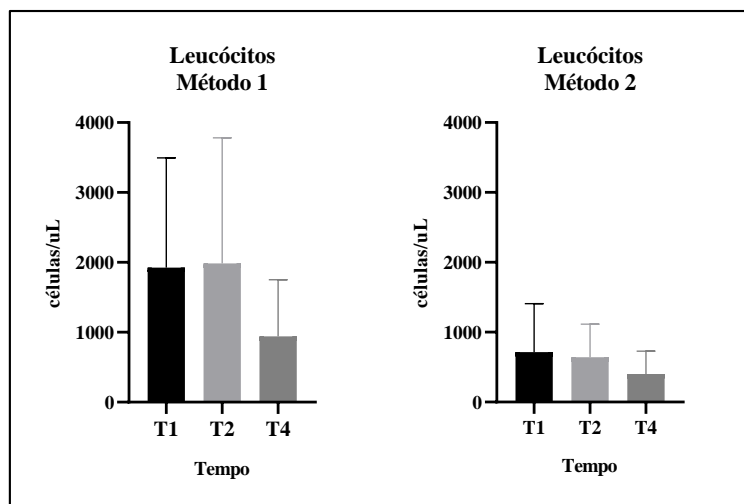


FIGURA 4 - Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de leucócitos no PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em três tempos de processamento.

O Método 1 possibilitou concentrar mais plaquetas que o Método 2 ($p < 0,0001$) nos tempos T1 e T2. No tempo 4 não houve diferença entre nos métodos ($p = 0,1464$). Em relação ao tempo de processamento, as amostras processadas no T4, em ambos os grupos, apresentaram diferença significativa quando comparadas ao T1, com menores concentrações de plaquetas (FIGURA 5).

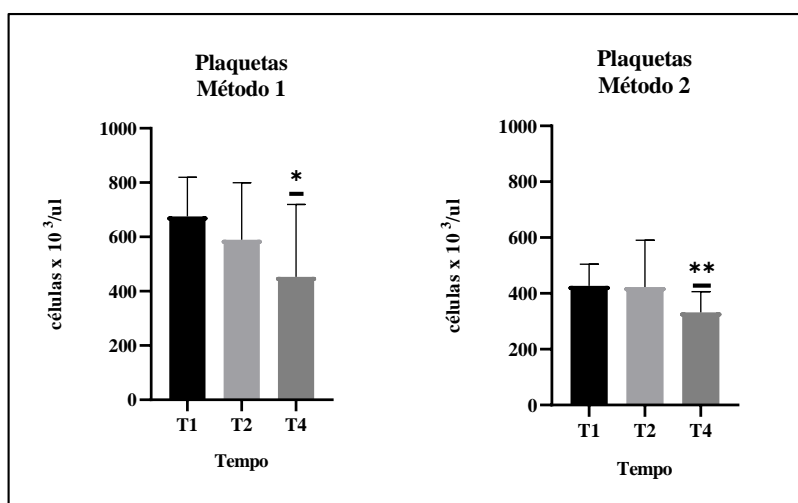


FIGURA 5 - Representação gráfica das médias e desvio padrão da contagem de plaquetas no PRP produzido pelo Método 1 (PRP 1) e pelo Método 2 (PRP 2), em três tempos de processamento. **Indica diferença estatística entre os grupos pelo teste de ANOVA, com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Houve formação de botão plaquetário na maioria das amostras (83,33%). Nas amostras dos animais 3 e 8 no T2 e nas amostras dos animais 1, 2, 4 e 8 em T4 do Método 1, não foi observado botão plaquetário conforme esperado (FIGURA 6).

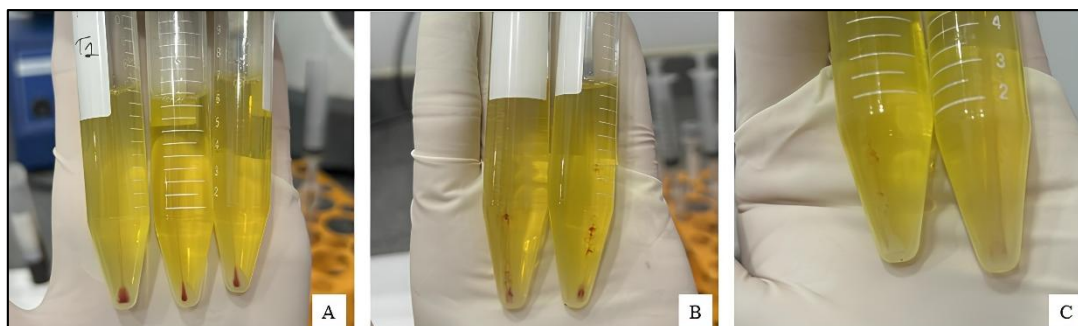


FIGURA 6 - Formação do botão plaquetário após a segunda centrifugação (A) Presença de botão de plaquetas e hemácias. (B e C) Ausência de formação do botão de plaquetas e hemácias em PRP produzido pelo Método 1.

DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo mostram que o novo protótipo de kit de PRP é uma técnica confiável para produção do concentrado de plaquetas em equinos e tem potencial na aplicação clínica. Os dois métodos testados foram eficazes em concentrar plaquetas e reduzir hemácias e leucócitos, como descrito em outros estudos em equinos (Freitas et al., 2023; Guidoni et al., 2024; Segabinazzi et al., 2021).

Apesar do protocolo ser o mesmo em relação ao tempo e velocidade de centrifugação, volume do plasma e ao anticoagulante utilizado, houve diferença significativa entre a concentração final de plaquetas dos dois métodos, com maior contagem de plaquetas no Método 1, produzido com o protótipo de kit. As principais diferenças entre os métodos são o volume de sangue por tubo e o material do tubo, pois no Método 1 foi utilizado tubo de plástico de 15 mL, enquanto no Método 2 usou-se tubo de vidro de 8,5 mL. Em um estudo em humanos que avaliou o coágulo de Fibrina Rica em Plaquetas (PRF), não foi observada interferência do tipo de tubo no produto final (Dohan ehrenfest et al., 2010). Em outra pesquisa que comparou protocolos comerciais na produção de PRF registrou-se que os produtos obtidos de tubo de vidro apresentavam

concentração menor de fatores de crescimento que os do tubos de plástico (Dohan Ehrenfest et al., 2018). No entanto, deve ser considerado que os protocolos e o produto final são diferentes do presente estudo. É importante ressaltar que, nesta pesquisa, o Método 1 foi mais eficaz em recuperar plaquetas.

A contagem de leucócitos totais foi reduzida em todas as amostras e se observou maior concentração em todos os tempos no Método 1. Mesmo com valores mais altos de glóbulos brancos, nenhuma amostra teve contagem maior que o sangue total, o que caracterizaria outro tipo de concentrado de plaquetas, o plasma rico em plaquetas e rico em leucócitos (L-PRP) (Dohan Ehrenfest et al., 2014; Lin et al., 2022). Assim como para outros parâmetros celulares do PRP, não há na literatura padronização da contagem de leucócitos no produto final. Mesmo que haja poucas evidências sobre a contribuição de glóbulos brancos para o processo de cicatrização e suas propriedades inflamatórias, um efeito benéfico foi sugerido devido à sua atividade contra bactérias (Dohan et al., 2006; Neves et al., 2007). No entanto, outros estudos apontam que essas células são prejudiciais para o ambiente articular e podem causar um processo inflamatório agudo (Boswell et al., 2014). Portanto, não há consenso a respeito de concentrações leucocitárias no PRP para induzir tais efeitos (Castillo *et al.*, 2011).

O tempo entre a coleta do sangue e o preparo foi investigado devido à possibilidade do processamento não ocorrer logo após a coleta na prática clínica. Sabe-se que as plaquetas possuem vida útil curta e muitas vezes o armazenamento em temperatura ambiente (entre 22 a 24°C) é realizado para melhorar a recuperação e a viabilidade plaquetária; no entanto essa prática pode aumentar a chance de contaminação bacteriana (Mack; Miles; Stolla, 2020; Rumjantseva; Hofmeister, 2010). Além disso, as plaquetas são metabolicamente ativas em armazenamento em temperatura ambiente e isso pode diminuir sua função ao longo do tempo (Rumjantseva; Hofmeister, 2010).

Neste estudo, o tempo de espera de quatro horas em temperatura ambiente produziu PRP com contagem de plaquetas significativamente menor nos dois métodos testados. Essa perda na contagem plaquetária também foi observada em outra investigação que avaliou a viabilidade de plaquetas após 24 horas de armazenamento, mas em temperatura de refrigeração (Segabinazzi et al., 2021), na qual os autores correlacionaram a menor viabilidade plaquetária à maior contaminação por leucócitos e hemácias no PRP produzido. A presença de leucócitos aumentados no PRP pode afetar a atividade metabólica das plaquetas e aumentar o consumo de glicose com produção de lactato (Segabinazzi et al., 2021). No presente estudo, a média de contagem de hemácias

e leucócitos foi menor em T4 em comparação a T1, o que não permite fazer essa correlação. As plaquetas sofrem uma variedade de alterações durante o processo de armazenamento, como mudança no formato de discoide para esférica, aumento da produção de lactato, diminuição do pH, liberação de conteúdo de grânulos, diminuição da sua função e redução da recuperação e sobrevivência (Bozorgmanesh et al., 2019), sendo provável que esse metabolismo tenha diminuído a concentração de plaquetas durante o armazenamento no T4 para os dois métodos. Apesar de não haver diferença significativa, também foi observada uma leve redução da contagem de plaquetas entre o tempo de espera de duas horas (Método 1: $589 \pm 201,6 \times 10^3/\text{uL}$; Método 2: $422 \pm 160,5 \times 10^3/\text{uL}$), quando comparado a 1 hora (Método 1: $675 \pm 138 \times 10^3/\text{uL}$; Método 2: $426 \pm 74 \times 10^3/\text{uL}$). O fato de os tubos não ficarem em movimentação delicada durante o tempo de espera, provavelmente favoreceu a diminuição na contagem após processamento. Sabe-se que para manter boa recuperação plaquetária é importante que os tubos ou bolsas de coleta estejam em constante movimentação (Van der Meer; Korte, 2011).

A presença do botão plaquetário é relatada de maneira escassa nos trabalhos, e é apenas citada com presente após centrifugação em alguns estudos (Guidoni *et al.*, 2024; Mota *et al.*, 2022; Tognoloni *et al.*, 2023; Torres *et al.*, 2023). Nesse trabalho essa avaliação foi realizada para avaliar a correlação entre a sua formação com a concentração adequada de plaquetas no PRP. Os animais que não apresentaram formação do botão plaquetário adequado tiveram as menores contagens de plaquetas do grupo e não alcançaram incremento plaquetário de pelo menos quatro vezes. Com isso, sugere-se que a formação do botão plaquetário em protocolos manuais de PRP com utilização de tubos pode ser um parâmetro avaliado, caso não haja a possibilidade de realizar contagem plaquetária.

O custo para a produção do PRP é maior para o Método 1 (R\$ 36,64) quando comparado ao Método 2 (R\$ 14,15). No entanto, em relação a insumos, há certa dificuldade no acesso aos tubos ACD (BD Vacutainer®ACD 8,5 mL), uma vez que, frequentemente, esse material fica ausente no mercado. Isso leva ao clínico a adquirir tubos de outras marcas, contendo diferentes anticoagulantes para a produção do PRP, o que pode resultar em um PRP de qualidade inferior. Além disso, até a presente pesquisa, desconhece outra marca de tubo que contenha o anticoagulante ACD.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o protótipo de kit para produção de PRP, Método 1, é eficaz para produzir um concentrado de plaquetas, garantindo contagem de plaquetas significativamente maior que o Método 2, manual tradicional. Ainda, o tempo entre a coleta de sangue e o início do processamento do PRP afeta diretamente a concentração final de plaquetas do PRP. A presença do botão plaquetário pode ser um indicativo de contagem adequada de plaquetas no PRP.

REFERÊNCIAS

BOSWELL, S. G. et al. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *American Journal of Sports Medicine*, v.42, n.1, p.42–49, 2014. doi: 10.1177/0363546513507566.

BOZORGMANESH, R. et al. Equine platelet concentrate preparation and validation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.33, n.3, p.1500–1506, 2019. doi: 10.1111/jvim.15472.

CAMARGO GARBIN, L.; LOPEZ, C.; CARMONA, J. U. A Critical Overview of the Use of Platelet-Rich Plasma in Equine Medicine Over the Last Decade. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, p.1–10, 2021. doi:10.3389/fvets.2021.641818.

CASTILLO, T. N. et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *American Journal of Sports Medicine*, v.39, n.2, p.266–271, 2011. doi: 10.1177/0363546510387517.

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v.101, n.3, 2006. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.010.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v.4, n.1, p.3–9, 2014. doi:10.32098/mltj.01.2014.02.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*, v.81, n.4, p.546–555, 2010. doi: 10.1902/jop.2009.090531.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. The impact of the centrifuge characteristics and

centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, v.29, n.2, p.171–184, 2018. doi: 10.1080/09537104.2017.1293812.

FREITAS, N. P. P. et al. Freeze-dried Platelet-rich Plasma and Stem Cell-conditioned Medium for Therapeutic Use in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 121, 2023. doi:10.1016/j.jevs.2022.104189.

GIRALDO, C. E. et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research*, v.9, 2013. doi: 10.1186/1746-6148-9-29.

GUIDONI, K. et al. The Combined Use of Triamcinolone and Platelet-Rich Plasma in Equine Metacarpophalangeal Joint Osteoarthritis Treatments: An In Vivo and In Vitro Study. *Animals*, v.14, n.24, p.1–13, 2024. doi: 10.3390/ani14243645.

HAGEN, A. et al. Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v.8, p.1–19, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2020.613621.

KNOTT, L. E. et al. Current use of biologic therapies for musculoskeletal disease: A survey of board-certified equine specialists. *Veterinary Surgery*, v.51, n.4, p.557–567, 2022. doi: 10.1111/vsu.13805.

LIN, K. Y. et al. Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma Has Better Stimulating Effects on Tenocyte Proliferation Compared With Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, v.10, n.3, p.1–8, 2022. doi: 10.1177/23259671221084706.

MACK, J. P.; MILES, J.; STOLLA, M. Cold-Stored Platelets: Review of Studies in Humans. *Transfusion Medicine Reviews*, v.34, n. 4, p. 221–226, 2020. doi: 10.1016/j.tmr.2020.08.003.

MCCARREL, T. M. Equine Platelet-Rich Plasma. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, v.39, n.3, p.429–442, 2023. doi: 10.1016/j.cveq.2023.06.007.

MOTA, M. L. et al. Desenvolvimento de um dispositivo para obter plasma rico em plaquetas (PRP). *Revista Brasileira de Ortopedia*, v.57, n.02, p.289–294, 2022. doi:10.1055/s-0040-1721835.

NEVES, A. P. et al. Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Animal Reproduction Science*, v.97,

n.3–4, p.314–322, 2007. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.01.010.

PENG, C. et al. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of platelet-rich plasma products for treatment of equine joint disease. *Equine Veterinary Journal*, v.56, n.5, p.858–869, 2024. doi: 10.1111/evj.14042.

RUMJANTSEVA, V.; HOFMEISTER, K. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. *Tranfus Apher Sci*, v.42, n.1, p.63–70, 2010. doi: 10.1016/j.transci.2009.10.008.

SEGABINAZZI, L. G. T. M. et al. Three manual noncommercial methods to prepare equine platelet-rich plasma. *Animals*, v.11, n.6, p.1–16, 2021. doi:10.3390/ani11061478.

TOGNOLONI, A. et al. Platelets Rich Plasma Increases Antioxidant Defenses of Tenocytes via Nrf2 Signal Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v.24, n.17, 2023. doi: 10.3390/ijms241713299.

TORRES, L. E. C. et al. Antimicrobial Activity of Plasma Rich in Platelets (PRP) on the Ocular Microbiota of Healthy Horses from Minas Gerais: In Vitro Study. *Veterinary Medicine International*, 2023. doi: 10.1155/2023/2407768.

VAN DER MEER, P. F.; KORTE, D. de. Platelet preservation: Agitation and containers. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 44, n. 3, p. 297–304, 2011. doi: 10.1016/j.transci.2011.03.005.

WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, v.27, n.4, p.825–853, 2016. doi: 10.1016/j.pmr.2016.06.002 ZANOTTO, G. M.; FRISBIE, D. D. Current joint therapy usage in equine practice: Changes in the last 10 years. **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], vol. 54, no. 4, p. 750–756, 2022. <https://doi.org/10.1111/evj.13489>.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O PRP é uma terapia que vem crescendo exponencialmente e ganhando espaço em hospitais, clínicas e no atendimento a campo de equinos. O cuidado com o processamento, para garantir um produto final asséptico e de qualidade, e o entendimento sobre os fatores que influenciam o PRP são extremamente importantes, estando diretamente relacionados ao sucesso do tratamento e à responsabilidade com o paciente.

Em meio a uma época de excesso de informações, é essencial basear-se em evidências científicas para um melhor direcionamento do tratamento do paciente. Desenvolver um protocolo por meio de um kit a baixo custo favorece a comunidade veterinária de equinos pois permite mais uma opção de tratamento atual para diversas lesões, especialmente musculoesqueléticas.

Este estudo desenvolveu e validou um sistema semifechado de baixo custo para produção de PRP em equinos, utilizando componentes de baixo custo e impressão 3D. O protótipo apresentou concentrações plaquetárias significativamente superiores ao método convencional ($p < 0,05$), com manutenção da esterilidade e compatibilidade para uso clínico. O tempo entre a coleta e o processamento do PRP influenciou negativamente a concentração final de plaquetas, evidenciando a necessidade de processamento rápido (<2h) para obtenção de melhores resultados.

Há limitações neste estudo que devem ser consideradas. A heterogeneidade em relação ao gênero da unidade experimental impediu uma correlação adequada sobre a interferência do gênero na produção do PRP. Além disso, a escolha de animais saudáveis impossibilitou a avaliação de possíveis alterações na concentração plaquetária do PRP em animais com distúrbios orgânicos. Ainda, o teste de ELISA foi realizado em amostras de PRP congelado, e não em PRP fresco, o que pode ter causado variações na viabilidade plaquetária e na concentração de fatores de crescimento do produto final. Apesar de todas as limitações, os dados sugerem que o protótipo desenvolvido é uma alternativa viável para aplicações em medicina equina.

Estudos futuros devem avaliar a aplicabilidade clínica do PRP produzido, testar a padronização da metodologia em diferentes espécies e realizar validação microbiológica sistemática.

O principal obstáculo para o desenvolvimento do estudo foi a limitação financeira. O projeto não recebeu auxílio financeiro, e todos os custos foram arcados com

recursos próprios, o que impediu a realização de mais análises e a utilização de tecnologias que tornariam o trabalho mais robusto e completo.

Conduzir esta pesquisa foi uma experiência enriquecedora, repleta de aprendizado e satisfação. Apesar dos desafios enfrentados, tive o apoio de dois criadores que gentilmente abriram as portas de seus haras, proporcionando-me total liberdade para desenvolver o estudo.

Goiânia, 07 de março de 2022.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 010/22

I - Finalidade do projeto de pesquisa:

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA: Pesquisa –Doutorado**
- Data de término: 31/03/2024**
- Data do atendimento da pendência: 22/02/22**
- Título do projeto:** Desenvolvimento de um protótipo de kit para a produção de plasma rico em plaquetas em equinos
- Pesquisador Coordenador no SIGAA/ Unidade:** Luciana Ramos Gaston Brandstetter/EVZ/UFV
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Helena Tavares Dutra/EVZ/UFV
- Pesquisadores Participantes/ Unidade:** Eugênio Gonçalves de Araújo/EVZ/UFV, Pedro Henrique Gonçalves PTS/UFV, Ana Carolina Barros da Rosa Pedroso EVZ/UFV e Álvaro José de Oliveira Neto EVZ/UFV
- Médico Veterinário/CRMV:** Helena Tavares Dutra/ 7186-GO
- Unidade onde será realizada a pesquisa:** EVZ/UFV

III – Respostas as pendências:

1- **Solicitação da CEUA:** Justificar o uso de 30 animais para experimentação considerando “cálculo de n amostral” ou outras referências semelhantes que justificariam este uso (neste caso escrever a referência completa).

Resposta do Pesquisador Responsável: Serão utilizados 24 animais para obtenção do sangue total para produção do PRP e análises sanguíneas. Utilizou se a fórmula de tamanho amostral para população finita: $n = N * \sigma^2 * (Z\alpha/2)^2 / (N-1) * (E)^2 + \sigma^2 * (Z\alpha/2)^2$ cuja confiança foi de 95% ($Z\alpha / 2 = 1,96$), precisão foi de 5% ($E = 0,05$), N de 24 (número animais encaminhados para o HV/EVZ/UFV para tratamento com Plasma Rico em Plaquetas desde que o serviço foi oferecido à população); e σ de 285 (desvio padrão da variável contagem de plaquetas dos PRP realizados no mesmo serviço), resultando em um tamanho amostral de 23,99 equinos.

2- **Solicitação da CEUA:** Informar se haverá a colheita de 80 ml de sangue (conforme afirmado no item 14 da ficha protocolo) ou se será de 70ml (conforme a soma dos procedimentos a serem realizados como descrito no item 18 da ficha protocolo);

Resposta do Pesquisador Responsável: Serão colhidos 70 mL de sangue total de cada animal.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de março de 2024**.

VII - Data da reunião: 07/03/22.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada " Desenvolvimento de um protótipo de kit para a produção de plasma rico em plaquetas em equinos", registrada com o protocolo nº **010/22**, sob a responsabilidade de Luciana Ramos Gaston Brandstetter e Helena Tavares Dutra que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **07/03/2022**.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 07/03/22 a 31/03/2024
- Espécie/linhagem/raça: Equino, quarto de milha.
- Nº de animais autorizados: 26
- Peso/Idade: 450kg, 5-14 anos.
- Sexo: 13 machos e 13 fêmeas.
- Instalação onde serão mantidos os animais: Nas propriedades que pertencem.
- Origem (fornecedor): Centros equestres.

Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com