

## Plasma rico em plaquetas: estudo comparativo entre a dupla centrifugação e o filtro E-PET (*Equine Platelet Enhancement Therapy*)<sup>1</sup>

Mariana L. Conceição<sup>2</sup>, Marina L. Alvarenga<sup>2</sup>, Jaqueline B. Souza<sup>2</sup>, Luiz Henrique L. Mattos<sup>2</sup>, Celso A. Rodrigues<sup>2</sup>, Marcos J. Watanabe<sup>2</sup>, Carlos Alberto Hussni<sup>2</sup> e Ana Liz G. Alves<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.-** Conceição M.L., Alvarenga M.L., Souza J.B., Mattos L.H.L., Rodrigues C.A., Watanabe M.J., Hussni C.A. & Alves A.L.G. 2017. [**Comparative study of double spin and use of E-PET filter (*Equine Platelet Enhancement Therapy*) to obtain platelet rich plasma in horses.**] Plasma rico em plaquetas: estudo comparativo entre a obtenção através da dupla centrifugação e filtro E-PET (*Equine Platelet Enhancement Therapy*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37(3):215-220. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: [anaalves@fmvz.unesp.br](mailto:anaalves@fmvz.unesp.br)

The platelet-rich plasma (PRP) consists of a high concentration of platelets in a small volume of plasma, four times greater (average) than the serum concentration. The use of PRP is justified by the high concentration of growth factors present in granules in the platelets, which have several functions such as cell proliferation, chemotaxis, angiogenesis and differentiation, which extend the power of tissue repair. There are several protocols to obtain PRP in horses described in the literature, among which are highlighted the double centrifugation, automated and filters. There are substantial differences in the PRP content depending on its method of production, especially when it concerns the amount of leukocytes, platelets and concentration of growth factors. Thus, the aim of this study was to compare the use of platelet concentrates obtained by double centrifugation protocol and obtained by the filter E-PET (*Equine Platelet Enhancement Therapy*) taking into account the platelet and leukocyte final concentration, the quantification of growth factors (TGF $\beta$  and PDGF-BB) and the facility to do those methods. Nine horses were used to obtain PRP by double centrifugation and through the E-PET filter, with no statistical difference ( $p>0.05$ ) between the methods relative to the platelet and leukocyte concentration; however, there was statistical difference ( $p=0.002$  and  $p=0.004$  respectively) compared with the concentration of TGF $\beta$  and PDGF-BB. It was concluded that the E-PET filter proved to be a more effective method possible to use in the field and to provide a higher concentration of growth factors (TGF $\beta$  and PDGF-BB).

**INDEX TERMS:** Double spin, E-PET filter, *Equine Platelet Enhancement Therapy*, platelet rich plasma, horses, growth factors, regenerative therapy.

**RESUMO.-** O plasma rico em plaquetas (PRP) consiste em uma alta concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma, sendo, em média, quatro vezes maior que

a concentração sérica. O uso de PRP é justificado pela alta concentração de fatores de crescimento presentes em grânulos no interior das plaquetas, que possuem diversas funções como proliferação celular, quimiotaxia, angiogênese e diferenciação celular, que ampliam o poder de reparação tecidual. Há diversos protocolos para obtenção do PRP em equinos descritos na literatura, dentre os quais destacam-se os de dupla centrifugação, os automatizados e os filtros. Há diferenças substanciais no conteúdo do PRP dependendo do seu método de obtenção, principalmente no que se

<sup>1</sup> Recebido em 19 de outubro de 2015.

Aceito para publicação em 11 de agosto de 2016.

<sup>2</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. \*Autor para correspondência: [anaalves@fmvz.unesp.br](mailto:anaalves@fmvz.unesp.br)

diz respeito à quantidade de leucócitos, plaquetas e concentração de fatores de crescimento. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar a utilização do concentrado de plaquetas obtido por protocolo de dupla centrifugação e o obtido pelo filtro E-PET (*Equine Platelet Enhancement Therapy*), levando-se em consideração a concentração plaquetária e leucocitária final, a quantificação de fatores de crescimento (TGF $\beta$  e PDGF-BB) e a facilidade de realização entre tais métodos. Utilizou-se nove animais para a obtenção de PRP por dupla centrifugação e através do filtro E-PET, não havendo diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os métodos de obtenção em relação à concentração plaquetária e leucocitária, entretanto, houve diferença estatística ( $p=0,002$ ;  $p=0,004$ , respectivamente) em relação a concentração de TGF $\beta$  e PDGF-BB. Dessa forma, concluiu-se que o filtro E-PET mostrou-se um método mais efetivo, sendo possível sua utilização à campo, além de proporcionar uma maior concentração de fatores de crescimento TGF $\beta$  e PDGF-BB.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Plasma rico em plaquetas, PRP, dupla centrifugação, filtro E-PET, *Equine Platelet Enhancement Therapy*, equinos, fatores de crescimento, terapia regenerativa.

## INTRODUÇÃO

As plaquetas derivam-se de células gigantes (megacariócitos) produzidas pela medula óssea e são caracterizadas primordialmente por serem responsáveis pela hemostasia (Gobbi & Vitale 2012). Quando ativadas, liberam fatores de crescimento e proteínas que residem no seu interior em grânulos (grânulos densos, lisossomos e alpha grânulos). Há dezenas de fatores de crescimento, entre os quais destacam-se o TGF $\beta$  (*transforming growth factor*) e PDGF-BB (*platelet-derived growth factor*). Tais fatores ligam-se aos seus receptores transmembrânicos na superfície de células locais ou circulantes, iniciando, assim, a expressão de proteínas responsáveis por quimiotaxia (principalmente o PDGF ao atrair quimicamente células tronco mesenquimais e monócitos), angiogênese, síntese de matriz extracelular e proliferação (através da ação do TGF $\beta$  ao estimular a mitose de fibroblastos e a produção de matriz extracelular) (Mishra et al. 2009). Dessa forma, a liberação de fatores de crescimento em uma região lesada promove o aumento da permeabilidade vascular, permitindo que células atraídas quimicamente pela inflamação (principalmente leucócitos) e pelos fatores degranulados pelos alpha grânulos (quimiotaxia) possam realizar transposição através do endotélio rumo ao foco lesado. Além de glóbulos brancos, diversas outras células, como células-tronco mesenquimais adultas, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e epidermais expressam receptores de membrana para os fatores de crescimento degranulados pelas plaquetas (Marx 2004).

Os fatores de crescimento PDGF-BB e TGF- $\beta$  estão envolvidos em todas as etapas do processo de reparação tecidual (Barrientos et al. 2008) e são os mais citados na literatura do plasma rico em plaquetas (Textor 2013). Além disso, comumente o PRP é aplicado em conjunto com células-tronco mesenquimais, e tais fatores de crescimen-

to foram identificados como dois dos três fatores cruciais para a diferenciação das células-tronco mesenquimais (Ng et al. 2008).

Segundo Arguelles et al. (2008), o PRP é definido como plasma sanguíneo com uma concentração plaquetária, em média, quatro vezes superior à concentração normal.

Há diferenças substanciais no conteúdo do plasma rico em plaquetas produzido pelos diferentes métodos de obtenção, o que pode causar impacto no resultado clínico (Hessel et al. 2015). Uma das principais diferenças é a concentração plaquetária, uma vez que a concentração das plaquetas está diretamente relacionada ao efeito biológico do produto, uma vez que uma quantidade baixa de plaquetas não favorecerá um resultado esperado após aplicação. A quantidade de leucócitos no PRP também é uma diferença, uma vez que os leucócitos possuem propriedades antimicrobianas, podendo ter um papel importante na aceleração do processo de reparação tecidual, porém também podem levar ao aumento da inflamação local (Castillo et al. 2011). Além disso, os leucócitos estão relacionados a maior liberação de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento responsável por promover angiogênese (Werther et al. 2002).

No mercado europeu, encontra-se um filtro de preparação rápida de concentrado de plaquetas, chamado de *Equine Platelet Enhancement Therapy* (E-PET). O E-PET consiste na filtração do sangue através de um filtro seletivo à plaquetas por meio de uma interação complexa por tamanho e adsorção. Dessa forma, as plaquetas são retidas, enquanto que as células vermelhas passam no filtro. O concentrado de plaquetas é em seguida recuperado por uma retro-lavagem com a aplicação de uma solução hipersaturada que encaminha as plaquetas rumo ao local de recolhimento. Segundo Castelijn et al. (2011), o E-PET fornece sete vezes mais plaquetas e quatro vezes mais leucócitos em comparação ao sangue total. É indicado para o tratamento de feridas, lesões ligamentares e tendíneas, além de osteoartrites. O E-PET, diferentemente dos protocolos de dupla centrifugação, não necessita de um laboratório, podendo ser utilizado ao lado animal.

Não existe uma padronização nos métodos de obtenção do PRP, o que causa diferenças no conteúdo deste. Assim, comparou-se um protocolo utilizado no Laboratório de Terapia Celular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp-Botucatu e que vem obtendo bons resultados e repetibilidade e o filtro E-PET que é uma boa opção no mercado. Esse trabalho contribui para um estudo de duas técnicas consagradas, o que trará benefícios significativos ao tratamento utilizando prp. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi comparar o PRP obtido por protocolo de dupla centrifugação e pelo filtro E-PET em relação a concentração plaquetária e leucocitária, quantificação de fatores de crescimento TGF $\beta$  e PDGF-BB e facilidade para realização.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais.** Foram selecionados nove equinos mestiços crioulos, com 8-12 anos de idade, média de peso de 340-460kg, machos e fêmeas. Sua higidez foi comprovada por meio de exames físicos e laboratoriais (hemograma completo) (Comitê de Ética nº

064/2013). Esses animais permaneceram em baias individuais, com alimentação baseada em feno coast-cross, sal mineral e água *ad libitum*.

Todos os animais foram utilizados como amostragem em ambos os métodos de obtenção, a ordem dos animais e a veia jugular de coleta foram escolhidas aleatoriamente. Foram coletados 55 mL para o filtro E-PET e 20 mL para a dupla centrifugação em momentos diferentes com uma hora de intervalo.

**Obtenção do PRP através do filtro E-PET.** Após assepsia da veia jugular, foram coletados, com a utilização de agulhas 40x12mm, 55mL de sangue total em uma seringa de 60mL já incluso 5mL de solução anticoagulante e transferidos para bolsas próprias do “kit”, ambas fornecidas pelo fabricante do filtro (PALL®). Nesta bolsa, injetou-se 9 mL de “solução de captura” (água de injeção estéril) e fez-se a homogeneização com o sangue com anticoagulante. A bolsa permaneceu acima do filtro. Sob ação da gravidade, as plaquetas chegaram ao filtro e foram retidas seletivamente (seleção segundo o tamanho e absorção, de forma que a maioria das hemácias passa pelo filtro). Ao fim de toda a filtração (duração média de 14 minutos), 8 mL de uma solução hipersaturada foi utilizada para recuperar as plaquetas do filtro, formando-se, assim, o concentrado de plaquetas pronto para uso terapêutico. O volume obtido foi de cerca de 8mL.

**Obtenção do PRP através do protocolo de dupla centrifugação (Yamada et al. 2016).** Após assepsia da veia jugular, foram coletados 20mL de sangue total em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio (1 parte de citrato para 9 de sangue) (BD Vacutainer®) através do uso de agulhas próprias para coleta de tubos à vácuo 32x8mm (BD Vacutainer®). O sangue foi transferido para tubos tipo Falcon e deixado em repouso por 30 minutos. Após o repouso, foi realizada a primeira centrifugação (300g por 5 minutos). Fez-se outro repouso de 40 minutos. Em seguida, separou-se todo o plasma e realizou-se a segunda centrifugação (700g por 17 minutos). Após esta centrifugação, descartou-se os 75% superiores, sendo o restante (25% inferiores) o PRP, que foi homogeneizado e transferido para um eppendorf.

**Contagem plaquetária e leucocitária.** As plaquetas foram contadas utilizando a câmara de Neubauer com a diluição de 2mL de Brecher para 20µL de sangue/PRP homogeneizado. O cálculo final foi feito multiplicando-se o número de células contadas por 2525, fator de correção segundo Stockham & Scott (2008).

A contagem de leucócitos foi feita utilizando-se a câmara de Neubauer com a diluição de 400µL de Turk para 20µL de sangue/PRP homogeneizado. O cálculo final foi feito multiplicando-se o número de células contadas por 52,5 - fator de correção segundo Stockham & Scott (2008).

**Quantificação dos fatores de crescimento.** A quantificação dos fatores de crescimento (TGFβ e PDGF-BB) foi realizada através de kits ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) - Quantikine ELISA R&D Systems®, TGFβ e PDGF-BB humano. Os kits humanos são amplamente utilizados na quantificação de fatores de crescimento equinos por apresentarem resultados satisfatórios, como nos trabalhos Hessel et al. 2015 e McCarrel & Fortier 2009. Logo após o processamento do plasma rico em plaquetas, uma fração deste obtida por cada método foi separada para a quantificação de fatores de crescimento. A mensuração foi realizada seguindo as instruções do fabricante, sendo a metodologia do kit para TGFβ e PDGF-BB semelhantes. Pipetou-se as amostras nos poços previamente imunizados com receptores para TGFβ/PDGF-BB e ocorreu ligação destas. Após a lavagem das substâncias que não se ligaram, um anticorpo específico para TGFβ/PDGF-BB foi adicionado nos poços e em sequência procedeu-se outra lavagem para retirada das substâncias que não se ligaram ao anticorpo. Por fim, uma solução de substrato foi adicionada e os poços desenvolveram coloração de acordo com a quantidade do fator de crescimento

em questão que se ligou no primeiro passo. A intensidade da cor foi mensurada, quantificando-se, assim, o TGFβ/PDGF-BB contido em cada amostra de PRP.

**Avaliação estatística.** Com base nos dados obtidos, foram calculados os valores de média e desvio padrão, expressados em (média ± desvio padrão plaquetas/µL; leucócitos/µL; pg/mL) através do programa GraphPad 5.0. Para avaliação estatística da concentração de plaquetas e leucócitos foi utilizado o método *One-way ANOVA* para avaliar a diferença entre os grupos filtro, centrífuga e concentração sérica. Para a avaliação estatística da concentração de TGF-β e PDGF-BB foi utilizado o método *T-Student*, avaliando a diferença entre o grupo “filtro” e “centrífuga”.

## RESULTADOS

A concentração plaquetária apresentou, sob utilização do filtro E-PET (Fig.1), média de 950.944±339.824 plaquetas/µL e por dupla centrifugação 746.547±317.272 plaquetas/µL (Fig.2), não apresentando diferença estatística entre os métodos utilizados ( $p>0,05$ ), porém ambos os métodos apresentaram diferença quando comparados ao grupo controle (concentração sérica :177.089±30.650) ( $p<0,05$ ). O filtro E-PET apresentou média de enriquecimento de



Fig.1. Filtro E-PET durante o processo de filtração para obtenção do plasma rico em plaquetas.

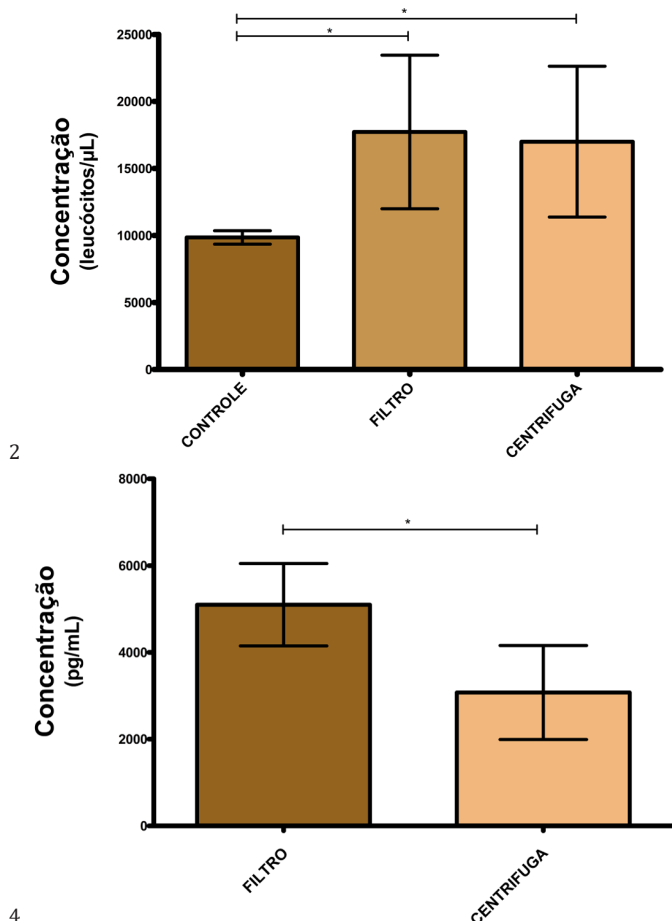


Fig. 2. Comparativo entre a média e desvio padrão (plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) da concentração plaquetária no sangue total (controle), filtro E-PET (filtro) e dupla centrifugação (centrífuga).

Fig. 4. Comparativo entre a média e desvio padrão (pg/mL) da concentração do fator de crescimento TGF $\beta$  no filtro E-PET (filtro) e na dupla centrifugação (centrífuga).

536,98%, quando que a dupla centrifugação apresentou 421,56%.

Na avaliação da concentração leucocitária, a média obtida pelo filtro E-PET foi de  $17.724 \pm 5.728$  leucócitos/ $\mu\text{L}$ , enquanto por dupla centrifugação foi de  $16.999 \pm 5.626$  leucócitos/ $\mu\text{L}$  (Fig.3), não apresentando diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ), porém ambos os métodos apresentaram diferença quando comparados ao grupo controle (concentração sérica:  $9.851 \pm 5.010$ ) ( $p < 0,05$ ). O filtro E-PET e a dupla centrifugação apresentaram valores próximos em relação à média de enriquecimento (179,92% e 172,56%, respectivamente).

Na quantificação de fatores de crescimento, a concentração média de TGF $\beta$  obtida por filtro E-PET foi de  $12.090 \pm 1.202$  pg/mL, enquanto quando utilizado o processo de dupla centrifugação a média obtida foi de  $8.696 \pm 2.341$  pg/mL (Fig.4), apresentando diferença estatística entre os métodos ( $p = 0,002$ ). Para a concentração de PDGF-BB, pelo processo utilizando o filtro E-PET obteve-se média de  $5.100 \pm 950$  pg/mL e pelo processo de dupla centrifugação  $3.074 \pm 1083$  pg/mL (Fig.5), apresentando diferença estatística entre os métodos utilizados ( $p = 0,004$ ). Os resultados estão apresentados no Quadro 1.

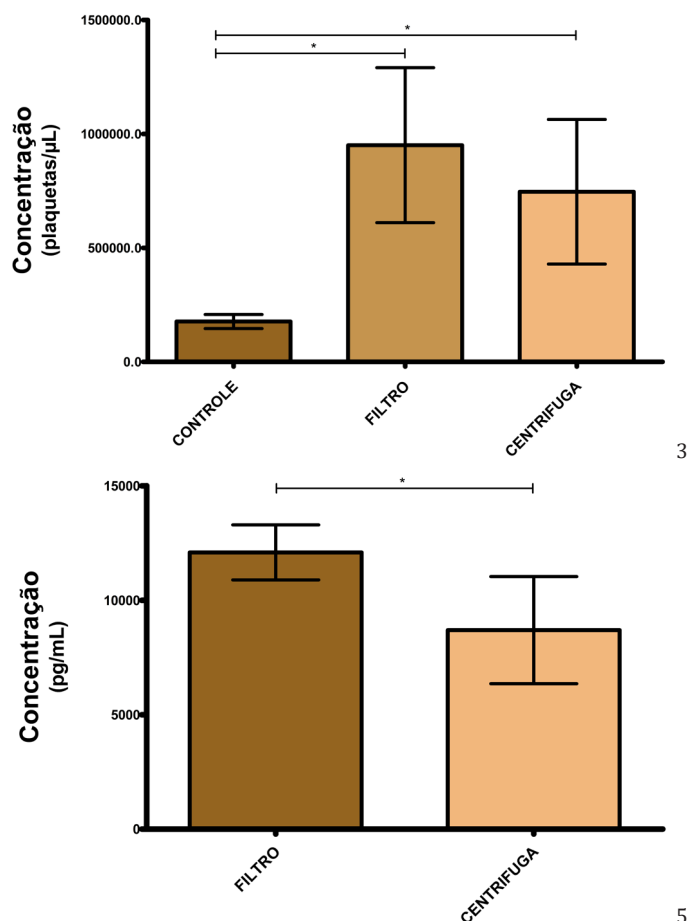


Fig. 3. Comparativo entre a média e desvio padrão (leucócitos/ $\mu\text{L}$ ) da concentração leucocitária no sangue total (controle), filtro E-PET (filtro) e dupla centrifugação (centrífuga).

Fig. 5. Comparativo entre a média e desvio padrão (pg/mL) da concentração do fator de crescimento PDGF-BB no filtro E-PET (filtro) e na dupla centrifugação (centrífuga).

**Quadro 1. Concentração plaquetária, leucocitária e dos fatores de crescimento PDGF-BB e TGF- $\beta$  séricos e no PRP obtivo por dupla centrifugação e filtro E-PET**

|   | Sérico  | Dupla Centrifugação | E-PET   |
|---|---------|---------------------|---------|
| <b>Plaquetas</b>                          |         |                     |         |
| n   | 9       | 9                   | 9       |
| Média (plaquetas/ $\mu\text{L}$ )         | 177.089 | 746.547             | 950.944 |
| Desvio padrão (plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) | 30.650  | 317.272             | 339.824 |
| Média de enriquecimento (%)               | -       | 421,56              | 536,98  |
| <b>Leucócitos</b>                         |         |                     |         |
| N   | 9       | 9                   | 9       |
| Média (leucócito/ $\mu\text{L}$ )         | 9.851   | 16.999              | 17.724  |
| Desvio padrão (leucócito/ $\mu\text{L}$ ) | 5.010   | 5.626               | 5.728   |
| Média de enriquecimento (%)               | -       | 172,56              | 179,92  |
| <b>PDGF-BB</b>                            |         |                     |         |
| n   | 9       |                     |         |
| Média (pg/mL)                             | -       | 3.074               | 5.1     |
| Desvio padrão (pg/mL)                     | -       | 1083                | 950     |
| Média de enriquecimento (%)               | -       | -                   | -       |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>             |         |                     |         |
| n   | -       | 9                   | 9       |
| Média (pg/mL)                             | -       | 8.696               | 12.09   |
| Desvio padrão (pg/mL)                     | -       | 2.341               | 1.202   |
| Média de enriquecimento (%)               | -       | -                   | -       |

## DISCUSSÃO

A obtenção do PRP em relação a concentração plaquetária em ambos os métodos utilizados mostrou-se eficaz pela definição de plasma rico em plaquetas de Arguelles et al. (2008), uma vez que se obteve 5,2 vezes mais plaquetas do que a concentração sérica no filtro E-PET e 4,1 vezes mais na dupla centrifugação.

A concentração leucocitária obtida nesse estudo no método de dupla centrifugação demonstrou ser superior à obtida por Vendruscolo et al. (2012) (2.460 +- 763 leucócitos/ $\mu$ L de sangue), em que se utilizou um protocolo proposto por Carmona et al. (2007) (primeira centrifugação: 120g por 10 minutos e segunda centrifugação: 240g por 10 minutos). Comumente é descrito na literatura o efeito positivo dos leucócitos na inflamação, imunidade e sinalização celular (Boswell et al. 2012), assim como na liberação de fatores de crescimento, principalmente relacionado ao VEGF (Werther et al. 2002). Entretanto, aos leucócitos também são atribuídos efeitos indesejáveis, já que ao atuar como sinalizadores de células pró-inflamatórias podem provocar catabolismo tecidual. Considerando a relação antagonista entre plaquetas e leucócitos, o PRP obtido nesse presente estudo através dos dois métodos está de acordo com o PRP ideal descrito por Wasterlain et al. (2012), que indica que este deve conter uma proporção elevada de plaquetas em relação aos leucócitos, de forma a promover uma ação mais anabólica do que catabólica.

O filtro E-PET obteve maior concentração dos fatores de crescimento TGF- $\beta$  e PDGF-BB do que a dupla centrifugação, mesmo não demonstrando diferença estatística em relação à concentração plaquetária obtida pelos dois métodos. Dessa forma, pode-se inferir que, como se trata de um circuito fechado (Castelijns et al. 2011), as plaquetas no filtro não sofrem tantas alterações como no protocolo de dupla centrifugação. As plaquetas são ativadas por uma série de influências físicas e químicas (Textor 2012) e, assim, possivelmente há ativação e consequente desgranulação dos fatores de crescimento por estímulos durante a manipulação no processo de dupla centrifugação, o que levaria ao resultado de uma menor concentração de fatores de crescimento no PRP final obtido por dupla centrifugação quando comparado ao aquele obtido pelo filtro E-PET.

Em relação ao tempo, o processo de obtenção de PRP através do filtro E-PET apresentou-se mais rápido, sendo que a filtração em si teve duração média de 14 minutos, como também ocorreu no trabalho de Castelijns et al. (2011). Enquanto que o processo de dupla centrifugação durou, em média, 2 horas. Esse fato é relevante quando se diz respeito à aplicação do PRP à campo, uma vez que o filtro nesse quesito se mostra mais eficaz.

Entretanto, o filtro E-PET apresenta um valor elevado (média de USD 250,00/filtro), indisponível para compra no Brasil até o momento e de uso descartável. Já a dupla centrifugação necessita de uma centrífuga, porém, uma vez que já se possui esta, o custo do PRP obtido por esse método é mínimo. Além disso, é possível processar várias amostras ao mesmo tempo (dependendo da capacidade da centrífuga) e passível de reutilização para outros processamentos.

Quanto a padronização das técnicas, o filtro E-PET apre-

sentou menor variação entre os animais, principalmente em relação à concentração plaquetária e fatores de crescimento. Isso provavelmente se deve ao fato do filtro ser um sistema fechado, não sofrendo alterações por variáveis físicas e químicas que poderiam ativar as plaquetas (Textor 2012). Em contrapartida, o sucesso da dupla centrifugação é variável de acordo com o operador, como explicitado no trabalho de Ehrenfest et al. (2008).

O volume de PRP obtido por filtro E-PET é único (em torno de 8 mL), já que é indicado pelo fabricante a coleta de 55 mL de sangue (Castelijns et al. 2011), diferentemente do que ocorre no protocolo de dupla centrifugação, uma vez que o volume final obtido nesse método depende da quantidade de sangue total coletado.

Já em relação ao ambiente, o filtro E-PET não necessita de um ambiente específico para o seu uso, podendo ser utilizado ao lado do animal, otimizando, assim, o tempo de processamento (Castelijns et al. 2011). O protocolo de dupla centrifugação, por sua vez, necessita de ambiente laboratorial e uma centrífuga, o que dificulta sua utilização a campo. Além disso, o filtro E-PET praticamente não apresenta risco de contaminação, uma vez que se trata de um sistema fechado (Castelijns et al. 2011). Já o protocolo de dupla centrifugação possui maior risco, pois há grande manipulação do material. Dessa forma, é necessário a utilização deste último método em ambiente laboratorial e, se o PRP for ser aplicado in vivo, o ideal é o processamento deste em câmara de fluxo laminar.

Os valores médios do TGF $\beta$  no PRP no presente estudo (dupla centrifugação: 8.129 pg/mL; filtro: 12.121pg/mL) colaboram com os resultados obtidos por Textor et al. (2011) (1.153-22.677pg/mL) em seis equinos sadios. O mesmo não ocorre com o PDGF-BB, cujos valores médios foram superiores (dupla centrifugação: 2.886pg/mL; filtro: 4.962pg/mL) aos obtidos por Giraldo et al. (2013) (1.208 +- 624,3pg/mL). O uso de kits ELISA humanos para a quantificação de fatores de crescimento é válido para amostras equinas (McCarrel & Fortier 2009).

O PRP obtido por filtro E-PET apresentou maior concentração de TGF $\beta$  e PDGF-BB do que aquele obtido pela dupla centrifugação. Além disso, foi possível observar que ocorreu uma correlação positiva entre os PRPs dos animais que obtiveram a maior concentração plaquetária e a maior concentração de fatores de crescimento no filtro E-PET, o que colabora com o resultado de Souza et al. (2014). Tal correlação não ocorreu na dupla centrifugação.

Dessa forma, o estudo mostrou-se eficaz em comparar dois métodos de obtenção, uma vez que foi utilizado um n=9 animais, apresentando diferença estatística em relação a quantificação de fatores de crescimento TGF $\beta$  e PDGF-BB e utilizando-se um protocolo de dupla centrifugação consolidado no serviço do Laboratório de Terapia Celular (FMVZ-Unesp, Botucatu).

## CONCLUSÕES

Os dois métodos testados mostraram-se eficazes na obtenção de PRP (Plasma rico em plaquetas), uma vez que obtiveram alta concentração plaquetária, assim como uma alta concentração leucocitária.

Porém, a alta concentração leucocitária altera a ação do PRP, uma vez que os leucócitos, apesar de possuírem uma ação antimicrobiana, também acabam por causar uma maior inflamação, podendo apresentar efeito prejudicial local-dependente.

Em relação aos fatores de crescimento TGF- $\beta$  e PDGF-BB, foi possível concluir que o filtro E-PET se mostrou mais eficiente, uma vez que obteve maior média de enriquecimento e amostras mais padronizadas (menor desvio padrão).

O filtro ainda apresenta a vantagem de poder ser utilizado ao lado do animal no ambiente à campo e de forma rápida.

**Agradecimentos.**- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de iniciação científica à M.L. Conceição.

## REFERÊNCIAS

- Arguelles D., Carmona J.U. & Climent F. 2008. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet. Rec.* 162:208-211.
- Barrientos S., Stojadinovic O. & Golinko M.S. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16:585-601.
- Boswell S.G., Cole B.J., Sundman E.A., Karas V. & Fortier L. 2012. Platelet rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28:429-439.
- Castelijns G., Crawford A., Schaffer J., Ortolano G.A., Beaugard T. & Smith R.K.W. 2011. Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. *Vet. Comp. Orthopaed.* 24:363-369.
- Carmona J.U., Arguelles D., Climent F. & Prades M. 2007. Autologous platelet concentrates as a treatment for horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J. Equine. Vet. Sci.* 27:167-170.
- Castillo T.N., Pouliot M.A., Kim H.J. & Dragoo J.L. 2011. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am. J. Sports Med.* 39:266-271.
- Ehrenfest D.M.D., Rasmusson L. & Albrektsson T. 2008. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 27:158-167.
- Giraldo C.E., Lopez C., Alvarez M.E., Samudio I.J., Prades M. & Carmona J.U. 2013. 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. *Vet. Res.* 9:29.
- Gobbi G. & Vitale M.D. 2012. Platelet-rich plasma preparations for biological therapy: applications and limits. *Oper. Tech. Orthop.* 22:10-15.
- Hessel L.N., Bosch G., Van Weeren P.R. & Ionita J.C. 2015. Equine autologous platelet concentrates: a comparative study between different available systems. *Equine Vet. J.* 47:319-325.
- Marx R.E. 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62:489-496.
- McCarrel T. & Fortier L. 2009. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J. Orthopaed. Res.* 27:1033-1042.
- Mishra A., Woodall J. & Vieira A. 2009. Treatment of tendon and muscle using platelet rich plasma. *Clin. Sports Med.* 28:113-125.
- Ng F., Boucher S. & Koh S. 2008. PDGF, TGF-beta and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. *Blood J.* 112:295-307.
- Stockham S.L. & Scott M.A. 2008. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, p.62-63. Vol.1. Blackwell, Iowa, p.62-63.
- Souza M.V., Pinto J.O., Costa M.M.S., Eliziaria C., Garcia S.L.R. & Oliveira L.L. 2014. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesq. Vet. Bras.* 34:599-612.
- Textor J.A. 2012. Activation of equine platelet-rich plasma: comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Vet. Surg.* 41:784-794.
- Textor J.A. 2013. Intra-articular use of platelet-rich plasma product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. *Vet. Surg.* 42:499-510.
- Textor J.A., Noriis J.W. & Tablin F. 2011. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Am. J. Vet. Res.* 72:271-278.
- Vendruscolo C.P., Carvalho A.M., Moraes L.F., Maia L., Queiroz D.L., Watanabe M.J., Yamada A.L.M. & Alves A.L.G. 2012. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pesq. Vet. Bras.* 32:106-110.
- Wasterlain A.S., Braun H.J. & Dragoo J.L. 2012. Contents and formulations of platelet rich plasma. *Oper. Tech. Orthop.* 22:33-42.
- Werther K., Christensen I.J. & Nielsen H.J. 2002. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leukocytes and platelets. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62:343-350.
- Yamada A.L.M., Alvarenga M.L., Brandão J.S., Watanabe M.J., Rodrigues C.A., Hussni C.A. & Alves A.L.G. 2016. Arcabouço de PRP-gel associado a células-tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesq. Vet. Bras.* 36(6):461-467.