

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Letícia Bisso Paz

**EFEITOS DE RAÇA, IDADE E GÊNERO SOBRE O PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM EQUINOS E CORRELAÇÃO DA CONTAGEM
PLAQUETÁRIA COM O ASPECTO FÍSICO**

Santa Maria, RS
2021

Letícia Bisso Paz

**EFEITOS DE RAÇA, IDADE E GÊNERO SOBRE O PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM EQUINOS E CORRELAÇÃO DA CONTAGEM PLAQUETÁRIA
COM O ASPECTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. PhD. Flávio Desessards De La Côte

Santa Maria, RS

2021

Paz, Letícia Bisso

Efeitos de raça, idade e gênero sobre o Plasma Rico em Plaquetas em equinos e correlação da contagem plaquetária com o aspecto físico / Letícia Bisso Paz.- 2021.

42 p.; 30 cm

Orientador: Flávio Desessards De La Côte

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Plasma Rico em Plaquetas 2. Equinos 3. Fatores intrínsecos 4. Análise física I. De La Côte, Flávio Desessards II. Título.

Letícia Bisso Paz

**EFEITOS DE RAÇA, IDADE E GÊNERO SOBRE O PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM EQUINOS E CORRELAÇÃO DA CONTAGEM PLAQUETÁRIA
COM O ASPECTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

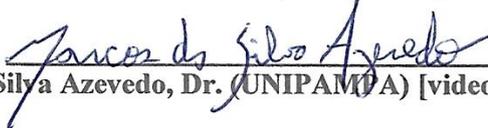
Aprovado em 06 de setembro de 2021:



Flávio Desessards De La Côte, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Alexandre Krause, Dr. (UFSM)



Marcos da Silva Azevedo, Dr. (UNIPAMPA) [videoconferência]

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde da minha família;

Ao meu pai Roberto “*in memorian*” por despertar em mim o gosto pelos cavalos e por guiar meus caminhos;

À minha mãe Fátima por me proporcionar condições de seguir meus sonhos, por todo o carinho, amizade e companheirismo em todos os momentos de minha vida;

À minha irmã Patrícia, cunhado Antônio pelo apoio e incentivo em minhas decisões e às minhas sobrinhas Mariana e Giovana por tornarem a minha vida mais feliz;

À Universidade Federal de Santa Maria, por minha formação;

Ao meu orientador, professor Flávio Desessards De La Côte, pela oportunidade, por todos os ensinamentos e contribuições transmitidos durante este período;

À minha co-orientadora, mentora e maior incentivadora desta pesquisa, professora Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, pela confiança, amizade e todo o auxílio prestado durante o meu mestrado;

À equipe de colaboradores do grupo de Medicina Esportiva Equina da UFSM e estagiários do bloco 4, pelo auxílio na execução deste projeto;

Ao meu colega de pós-graduação Antônio Alcemar Beck Júnior e à minha amiga Maria Inês Frank, pelo convívio diário, companheirismo e amizade que fizeram grande diferença durante meu período de mestrado;

Ao meu colega de mestrado João Vicente Gonçalves Mucha, por embarcar nesta jornada comigo e por contribuir na execução deste projeto;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

EFEITOS DE RAÇA, IDADE E GÊNERO SOBRE O PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM EQUINOS E CORRELAÇÃO DA CONTAGEM PLAQUETÁRIA COM O ASPECTO FÍSICO

AUTORA: Letícia Bisso Paz

ORIENTADOR: Flávio Desessards De La Côte

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte de diversos fatores de crescimento e outras moléculas que participam na modulação da resposta inflamatória e na reparação tecidual. Na medicina equina o PRP tem se destacado por sua ação benéfica no tratamento de feridas, além do seu uso em diversas afecções nas quais necessita-se redução de inflamação e reparo tecidual. Entretanto, ainda existem fatores intrínsecos que diferem entre os protocolos estabelecidos e podem influenciar na qualidade do produto final. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de raça, idade e gênero no PRP equino e correlacionar seu aspecto físico com a contagem plaquetária. Foram coletadas 50 amostras de sangue de animais de cinco raças diferentes (Puro Sangue de Corrida - PSC, Brasileiro de Hipismo - BH, Crioulo - C, Pônei Brasileiro - PB e Sem Raça Definida - SRD) para confecção de PRP e os mesmos foram investigados quanto à concentração plaquetária em relação à raça, idade e gênero. Além disso, um escore de análise física do PRP foi estabelecido para correlacioná-lo com a contagem plaquetária. A contagem celular foi realizada pelo método automático e manual, já a análise física do PRP baseou-se na cor, aspecto visual e capacidade de separar hemocomponentes. PB tiveram concentração plaquetária significativamente maior que dos BH ($p < 0.05$), mas as demais comparações entre raças não apresentaram diferença quanto à contagem plaquetária. Não houve diferença estatística para gênero, mas a idade apresentou correlação fraca com as concentrações plaquetárias do PRP ($r_s = -0.24$). A maioria dos PRPs apresentaram coloração amarela, a separação dos hemocomponentes não apresentou correlação com a contagem plaquetária, mas o aspecto visual apresentou uma correlação moderada ($r_s = 0,30$). Nossos resultados sugerem que a concentração plaquetária do PRP pode ser influenciada por fatores intrínsecos, como a raça. Além disso, a análise do aspecto visual do PRP pode ajudar na avaliação da qualidade do produto, quando não há acesso à contagem plaquetária.

Palavras-chave: PRP. Cavalos. Fatores intrínsecos. Análise física.

ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP) is a source of several growth factors and other molecules that participate in modulating the inflammatory response and tissue repair. In equine medicine, PRP has stood out for its beneficial action in the treatment of wounds, in addition to its use in several conditions in which inflammation reduction and tissue repair are needed. However, there are still intrinsic factors that differ between established protocols and can influence the quality of the final product. This study aimed to evaluate the effects of race, age and gender on equine PRP and to correlate its physical appearance with platelet count. Fifty blood samples were collected from animals of five different breeds (Thoroughbred - TB, Brazilian Sport Horses - BSH, Brazilian Criollo Horses - BCH, Miniature Horses - MH and Cross Breed horses - CB) for the preparation of PRP and they were investigated as to platelet concentration in relation to race, age and gender. In addition, a PRP physical analysis score was established to correlate its appearance with the platelet count. Cell count was performed by automatic and manual methods, while the physical analysis of the PRP was based on color, appearance and ability to separate blood components. MH had significantly higher platelet concentration than BSH ($p < 0.05$), but the other comparisons between breeds showed no difference in platelet count. There was no significant difference for gender but there was a weak correlation of age with PRP platelet concentrations ($r_s = -0.24$). Most of the PRP presented yellow colour, the separation of blood components showed no correlation but the aspect showed a moderate correlation ($r_s = 0.30$) with platelet count. Results suggest that PRP platelet concentration can be influenced by intrinsic factors such as breed. Additionally, the analysis of PRP aspect can help to evaluate the quality of the product, when there is no access to platelet counts.

Keywords: PRP. Horses. Intrinsic factors. Physical analysis.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figure 1** - Twelve of the fifty pictures of PRP after first centrifugation, evaluated on color, aspect and capacity to separate blood components in the first centrifugation.....25
- Figure 2** - Different average platelet concentration ($p < 0.0001$) was observed between samples from whole blood and PRP (*)26
- Figure 3** - A) Red blood cell count in whole blood and PRP. B) White blood cell count in whole blood and PRP.....27
- Figure 4** - Platelet concentration comparison between Thoroughbreds (TB), Brazilian Criollo Horses (BCH), Brazilian Sport Horses (BSH), Miniature Horses (MH) and Cross Breed horses (CB).....28
- Figure 5** - Correlation between age (years) of the animals and platelet concentration in their PRP samples.....29
- Figure 6** - Correlation between PRP physical aspect (1 - Clear, 2 - Nearly turbid, 3 - Turbid) and platelet concentration.....31

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1 - General results for platelet, red blood cell and white blood cell count of whole blood and platelet rich plasma (PRP).....27

Table 2 - Whole blood and platelet rich plasma (PRP) platelet count between Thoroughbreds (TB), Brazilian Criollo Horses (BCH), Brazilian Sport Horses (BSH), Miniature Horses (MH) and Cross Breed horses (CB) with its percent concentration rate (PRP/PI*100)29

Table 3 - Distribution of the platelet rich plasma samples analyzed by color30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS	12
2.1.1 Uso do PRP na medicina humana	13
2.1.2 Uso do PRP na medicina equina	13
2.1.3 Fatores extrínsecos que influenciam na qualidade celular do PRP	14
2.1.4 Fatores intrínsecos que influenciam na qualidade celular do PRP	15
2.1.5 Uso homólogo/heterólogo do PRP na medicina humana e veterinária	16
2.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO PRP	17
2.2.1 Métodos de contagem plaquetária	17
2.2.2 Quantificação de fatores de crescimento	18
3 ARTIGO	20
Abstract	21
Resumo	22
Introduction	23
Materials and Methods	24
Results and Discussion	26
Conclusions	31
References	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
5 REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto biológico obtido pela separação de componentes sanguíneos e concentração plaquetária (EVERTS et al., 2006; TEXTOR, 2011). Um número alto de plaquetas com seus fatores de crescimento bioativos pode alcançar efeitos terapêuticos, como a redução da inflamação e o aumento da reparação tecidual (MARX, 2004; FORTIER et al., 2011). Estes fatores de crescimento são derivados dos grânulos α das plaquetas (NURDEN, 2011) e promovem efeitos anabólicos e angiogênicos, sendo cruciais no processo de cicatrização. Portanto, sendo utilizado como uma forma de terapia regenerativa com diversos benefícios clínicos, o interesse pelo PRP cresceu nos últimos anos e seu uso se espalhou entre a odontologia (PETRUNGARO, 2001), medicina humana (ANITUA et al., 2004) e veterinária (CARTER et al., 2003; TAMBELLA et al., 2018).

Existem vários protocolos de preparação de PRP descritos para a espécie equina, mas, os estudos têm mostrado que os mais eficientes em termos de concentração plaquetária e qualidade foram obtidos por duas centrifugações (PEREIRA et al., 2013) que separam as hemácias e leucócitos do plasma, seguido pela concentração das plaquetas (FOSTER et al., 2009).

Com base em sua conhecida ação benéfica na cicatrização de feridas em cavalos (DE ROSSI et al., 2009), o uso do PRP na medicina equina também já foi estudado como adjunto para a cicatrização de fraturas (CARMONA & LÓPEZ, 2011), lesões condrais (YÁMADA et al., 2012), queimaduras cutâneas (MACIEL et al., 2012), laminite (CARMONA et al., 2012), endometrite (REGHINI et al., 2014), lesões de tendões e ligamentos (PEREIRA et al., 2018), osteoartrite (SMIT et al., 2019) e seu uso experimental em feridas cutâneas de membros distais de equinos (PEREIRA et al., 2019).

Apesar de todas as suas diversas aplicações clínicas na medicina equina, ainda existem fatores que diferem entre os autores e podem influenciar na qualidade do PRP. Os diversos métodos de preparo (CARMONA, 2017) e a experiência da pessoa que processa o plasma são aspectos extrínsecos que podem interferir na composição do produto final. Além disso, idade, raça e gênero (GIRALDO et al., 2013; MIRANDA et al., 2018) são considerados fatores intrínsecos que podem tornar os componentes finais do PRP variáveis entre diferentes indivíduos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da raça, idade e sexo no PRP entre cinco raças diferentes e correlacionar seu aspecto físico com a contagem de plaquetas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto obtido a partir da centrifugação de sangue venoso, o qual resulta em um determinado volume de plasma que contém alta concentração de plaquetas, fatores de crescimento, proteínas plasmáticas e ainda alguns leucócitos e hemácias (TEXTOR, 2011), dependendo do método de extração. É uma terapia autóloga utilizada para acelerar a cicatrização de tecidos já que, além das funções na coagulação, os fatores de crescimento constituintes dos α -grânulos plaquetários desempenham um papel fundamental no controle da inflamação e na reparação tecidual (FORTIER et al., 2011).

Existem diferentes métodos de preparação de PRP descritos para a espécie equina. Os protocolos para a obtenção do mesmo podem envolver uma (MESSORA et al., 2009) ou duas (BARBOSA et al., 2008) centrifugações. Pereira et al. (2013), analisaram sete protocolos e constataram que os protocolos mais seguros para concentrar plaquetas eram aqueles compostos por duas centrifugações. Após a primeira centrifugação, o sangue encontra-se separado em três camadas, sendo a inferior constituída pelos eritrócitos, a camada média (zona de névoa) contendo leucócitos e algumas plaquetas e a superior constituída por plaquetas e plasma. Este plasma é aspirado e colocado em outro tubo para uma segunda centrifugação, onde as plaquetas são concentradas, produzindo o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) e o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) (FOSTER et al, 2009).

Estudos realizados para avaliar a segurança e a efetividade do PRP demonstraram que o efeito terapêutico do mesmo deriva da concentração plaquetária e, conseqüentemente, dos fatores de crescimento presentes em suas plaquetas (MARX, 2004). As plaquetas dos equinos são constituídas por três tipos de grânulos: os lisossomais, os densos e os grânulos alfa. Estes últimos contêm, no mínimo, 10 fatores de crescimento diferentes (NURDEN, 2011), liberados por degranulação após ativação plaquetária, os quais são conhecidos por possuírem propriedades anabólicas e angiogênicas, sendo considerados parcelas essenciais para o processo de cicatrização.

Dentre os fatores de crescimento já estudados, os mais relevantes quanto a funções terapêuticas são: Fator de Crescimento de Transformação- β 1 (TGF- β 1), Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de

Crescimento do Tecido Conjuntivo (CTGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1(IGF-1), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) (FOLKMAN; BROWDER; PALMBLAD, 2001). Gonshor (2002), afirma que os efeitos do PRP, além de seus fatores de crescimento, também estão associados às quimiocinas e citocinas encontradas nos grânulos alfa das plaquetas.

2.1.1 Uso do PRP na medicina humana

A utilização do PRP em humanos foi descrita pela primeira vez por Ferrari et al. (1987) para transfusão suporte durante cirurgias cardíacas. O PRP como componente autólogo reduziu a necessidade de transfusões pós-operatórias e ainda evitou os riscos de aloimunização e transmissão de patógenos que são possíveis consequências em uma transfusão de sangue homólogo.

Posteriormente, possuindo maior conhecimento de suas propriedades, pesquisadores começaram a implementar o PRP como agente potencializador na cicatrização de tecidos moles e na regeneração óssea. Marx et al. (1998) utilizaram o PRP para potencializar a reconstrução de defeitos ósseos na mandíbula através de enxertos ósseos, já Petrunaro (2001) adicionou PRP em enxertos de tecido conjuntivo para tratar cirurgicamente pacientes com recessão gengival. Ambos os autores observaram uma maior e mais rápida neoformação tecidual nos pacientes que receberam o tratamento regenerativo junto aos enxertos.

Mishra e Pavelko (2006) aplicaram PRP em pacientes com tendinite crônica e dor persistente no cotovelo, obtendo, com apenas uma aplicação percutânea do PRP, a melhora de 80% da dor por até 6 meses após o tratamento. Duymus et al. (2016) compararam a eficácia do plasma rico em plaquetas, ácido hialurônico e ozônio terapia intra-articular para tratamento de osteoartrite em joelho e demonstraram que o PRP foi clinicamente superior aos demais tratamentos, promovendo redução total da dor por pelo menos 12 meses. Tendo elucidados os benefícios do plasma rico em plaquetas na medicina humana, a terapia tornou-se uma aposta nos últimos tempos inclusive em outras áreas como a medicina veterinária.

2.1.2 Uso do PRP na medicina equina

Os primeiros relatos de uso do plasma rico em plaquetas na medicina equina foram para tratamento de feridas em membros com o PRP na forma de gel, o qual proporcionou bons

resultados terapêuticos de cicatrização epitelial e organização do colágeno dérmico (CARTER et al., 2003; DE ROSSI et al., 2009). Baseando-se empiricamente em relatos desta terapia como conduta para diversas lesões inflamatórias em humanos (CARMONA et al, 2007), iniciou-se a pesquisa com o PRP para tratamento de diferentes tipos de lesões em equinos.

Além da sua conhecida ação benéfica em feridas, já foi descrita a utilização do PRP na medicina equina para auxílio na cicatrização de fraturas (CARMONA; LÓPEZ, 2011), lesões condrais (YÁMADA et al., 2011), queimaduras (MACIEL et al., 2012), laminite (CARMONA; LÓPEZ; SAMUDIO, 2012), endometrite (REGHINI et al, 2014), lesões tendíneas e ligamentosas (PEREIRA et al., 2018) e para tratamento de osteoartrite (SMIT et al., 2019) e seu uso experimental em feridas cutâneas de membros distais em equinos (PEREIRA et al., 2019). A maioria destes estudos provém de uma casuística limitada e, portanto, devem estar em constante processo de aprimoramento.

Em razão da popularidade que as terapias regenerativas celulares vêm ganhando na medicina veterinária assim como na medicina humana, novas pesquisas a respeito do plasma rico em plaquetas tornam-se muito interessantes para expandir sua aplicação. Na área de medicina de equinos, apesar dos já conhecidos efeitos benéficos desta terapia, o uso ambulatorial do PRP longe dos centros clínicos e hospitalares segue limitado devido à necessidade de experiência profissional e ambiente laboratorial para garantir a qualidade do produto.

2.1.3 Fatores extrínsecos que influenciam na qualidade celular do PRP

Diversos aspectos extrínsecos podem interferir na composição final do plasma rico em plaquetas, modificando seu perfil celular e molecular de acordo com o processo de produção. Tais fatores podem estar associados à técnica utilizada para preparação ou ativação do plasma rico em plaquetas e, portanto, influenciam diretamente na qualidade final do produto (CARMONA et al., 2014). Harrison et al. (2011), constataram que algumas variáveis, como o número de centrifugações, a velocidade de rotação e o tempo de centrifugação durante o processamento do produto poderiam influenciar na integridade das plaquetas, composição final do PRP e inclusive na eficácia do mesmo, em humanos.

Já na medicina veterinária, estudos investigaram a influência de algumas etapas do processo, como os efeitos dos anticoagulantes sobre o produto em bovinos (CARMONA et al., 2014), constatando que o número de leucócitos no PRP bovino foi maior em amostra coletada

em Citrato de Sódio em comparação com a coletada em ACD-A (Ácido cítrico, Citrato de sódio, Dextrose e Adenina). Já em equinos, Argüelles et al. (2005) avaliaram diferentes métodos de preparação, como a centrifugação única ou dupla em tubos com citrato de sódio, resultando em concentração plaquetária e níveis de fator de crescimento transformador beta (TGF- β_1) maiores nos produtos obtidos por centrifugação única.

Tendo em vista estas características e a necessidade de se determinar o melhor protocolo para obtenção do PRP, sete diferentes protocolos para obtenção do PRP foram avaliados na espécie equina (PEREIRA et al., 2013), os quais diferiam na velocidade de rotação e no tempo das centrifugações. Os autores demonstraram algumas diferenças quanto ao número de hemácias e leucócitos presentes nas amostras analisadas e elencaram os protocolos com maior concentração plaquetária e níveis de TGF- β_1 , como recomendados para a espécie. Os leucócitos, que podem estar presentes no PRP de acordo com alguns protocolos, possuem efeitos benéficos como função imunomoduladora e antimicrobiana, no entanto, também podem ser associados à expressão de citocinas catabólicas em humanos (SUNDMAN et al., 2011), tornando-se pouco interessantes terapêuticamente. A contaminação com hemácias, por sua vez, de acordo com Pereira et al. (2013), é considerada inapropriada e pode ser atribuída à menor força de rotação ou menor tempo de centrifugação de certos protocolos, modificando a qualidade final do produto.

2.1.4 Fatores intrínsecos que influenciam na qualidade celular do PRP

Fatores intrínsecos como gênero e idade vêm sendo analisados, na medicina humana, como sendo fatores que demonstram diferença na qualidade do plasma rico em plaquetas, seja na contagem plaquetária ou até mesmo na concentração de seus fatores de crescimento. Evanson et al. (2014), demonstrou em sua pesquisa que tanto a idade quanto o gênero, podem representar variações em alguns dos fatores de crescimento presentes no PRP. Seguindo mesma linha de pesquisa, Xiong et al. (2018), demonstrou que homens e mulheres podem apresentar contagens plaquetárias semelhantes, no entanto, demonstram diferença nos níveis de citocinas e fatores de crescimento presentes no produto final.

Em equinos, os efeitos de gênero, idade e até mesmo raça estão sendo alvo de pesquisas na tentativa de explicar alguns resultados inconsistentes do uso clínico desta terapia. Giraldo et al. (2013) comparou 40 animais, sendo 20 da raça Crioula Argentina e 20 da raça Crioula Colombiana. O autor reportou contagem plaquetária significativamente maior nos animais da

raça Crioula Colombiana e ainda um número de plaquetas mais elevado nas fêmeas, representando uma influência significativa da raça e gênero na composição final do PRP.

Miranda et al. (2018) comparou a diferença na concentração plaquetária de 24 animais entre as raças Quarto de Milha, Puro Sangue de Corrida, Mangalarga Marchador e também Mulas. Os autores identificaram que o conteúdo plaquetário dos PRPs variou de acordo com cada raça e/ou espécie analisada, elegendo a raça Quarto de Milha como a maior concentradora de plaquetas.

Levando em consideração que determinadas raças ou até mesmo gêneros podem influenciar na qualidade final do PRP, maiores estudos sobre estes fatores poderão agregar um conhecimento importante para profissionais que fazem uso desta terapia na rotina. Além do mais, estes dados poderão vir a contribuir inclusive para pesquisas com relação a utilização homóloga do plasma rico em plaquetas.

2.1 5 Uso homólogo/heterólogo do PRP na medicina humana e veterinária

O plasma rico em plaquetas autólogo está presente em inúmeras pesquisas e condutas terapêuticas atualmente, tendo em vista seus efeitos benéficos já elucidados. No entanto, nem todos os pacientes são candidatos para esta terapia. Indivíduos com saúde geral debilitada, distúrbios hematológicos ou que estejam recebendo tratamento com diferentes princípios ativos (MARTINEZ, 2010) por tempo prolongado, podem sofrer efeitos indesejáveis pelo volume sanguíneo retirado para a confecção do produto.

De acordo com Bettoni et al. (2016), o PRP homólogo, quando obtido de doadores sanguíneos habituais e saudáveis, facilita a confecção do produto, atinge níveis plaquetários excelentes e proporciona uma acessibilidade praticamente ilimitada à esta terapia. Na medicina humana, estudos recentes vêm sendo realizados a fim de validar a utilização do PRP homólogo em diferentes terapêuticas. O uso tópico do produto homólogo, em forma de gel, já foi testado e obteve bom resultado em ferida contaminada (IESARI et al., 2017). Além deste, testes em periodontites (MARKOPOULOU et al., 2009), defeitos ósseos (GUBINA et al., 2014), lesões na córnea (RONCI et al., 2015), osteoartrites (BETTONI et al., 2016), alopecia (INCE et al., 2017) e úlceras cutâneas crônicas (PRABHU, et al., 2018) já foram realizados, com resultados promissores.

Na área da medicina veterinária, o PRP homólogo ainda é pouco estudado, entretanto os poucos estudos que reportam a sua utilização demonstraram efeitos benéficos. Por ser uma

opção terapêutica ainda recente, a maior porção das pesquisas existentes nesta linha envolvem animais de laboratório. Barrionuevo et al. (2015), compararam o efeito de PRP autólogo, homólogo e heterólogo (proveniente de cães) em feridas experimentais de 18 coelhos, confirmando que o PRP, independente da fonte, acelerou o processo de cicatrização, sendo confiável para tratamento cutâneo inclusive quando sangue autólogo não for uma opção viável. Seguindo mesma linha de pesquisa, Tahir et al. (2018) avaliaram o uso de PRP autólogo e homólogo em enxertos de pele em 16 coelhos, concluindo que o PRP autólogo foi mais eficiente ao promover a cicatrização local das feridas.

Gemignani, Perazzi e Iacopetti (2017) relataram um caso de uma ferida contaminada em um felino tratada com PRP proveniente de um canino, descrevendo que o uso heterólogo do mesmo no grande defeito cutâneo não apresentou efeitos adversos e estimulou a formação de um tecido de granulação saudável no local para cicatrização por segunda intenção. Em cães, a aplicabilidade do PRP homólogo foi testada para tratamento de osteoartrite com uma única dose do produto intra-articular, a qual foi eficaz em reduzir a dor em todos os 5 animais inclusos no estudo (CATARINO et al., 2020).

Em equinos, apenas um estudo descreve a aplicação do plasma rico em plaquetas homólogo na espécie. Pereira et al. (2019), avaliaram o efeito da aplicação de PRP autólogo, PRP homólogo e ainda PRP autólogo em gel em feridas experimentais de membro distal em 8 equinos, constatando que o PRP em gel garantiu a melhor cicatrização e que o PRP homólogo também pode ser recomendado para tratamento de animais em condições hematológicas limitadas. A utilização desta terapêutica na espécie ainda necessita de mais estudos.

2.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO PRP

2.2.1 Métodos de contagem plaquetária

Para garantir a eficácia clínica do plasma rico em plaquetas, o produto deve concentrar plaquetas com eficiência, sendo esta concentração considerada por Whitlow et al. (2008) como três a cinco vezes superior ao número de plaquetas avaliados no sangue total. Considerando que existem vários protocolos já previamente estabelecidos por Pereira et al. (2013) para a obtenção do PRP de equinos, a variabilidade na concentração plaquetária entre os protocolos é perceptível.

Com o intuito de contabilizar com precisão a concentração plaquetária, diversos métodos de contagem podem ser aplicados entre eles métodos manuais ou automatizados. Os métodos disponíveis para contagem plaquetária incluem microscopia manual, óptica, impedância e citometria de fluxo (BRIGGS et al., 2007). Enquanto contadores automáticos podem não reconhecer agregados plaquetários e representar um valor mais baixo de plaquetas (TASKER et al., 2001), os métodos manuais demandam tempo e estão sujeitos a um percentual de erro humano (HONG et al., 2009).

Considerando a realidade em medicina veterinária, principalmente na área de grandes animais, frequentemente fica inviável para o profissional realizar este tipo de análise a campo. Sendo assim, nota-se a necessidade de maiores estudos para encontrar uma forma de avaliação mais prática e/ou qualitativa da concentração plaquetária no plasma rico em plaquetas, um produto que vem sendo muito utilizado na rotina diária da medicina equina.

2.2.2 Quantificação de fatores de crescimento

Com a finalidade de confirmar a ação benéfica das plaquetas contidas no PRP, aplicadas terapêuticamente, a quantificação de alguns fatores de crescimento específicos pode ser realizada. Para quantificação de fatores como PDGF, TGF- β_1 , VEGF, EGF e IGF-1, Eppley, Woodell e Higgins (2004) separaram amostras de sangue total e de PRP, que foram ativadas com trombina bovina, centrifugadas e congeladas a -70°C para ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) através de kits comerciais específicos para cada teste. Conforme os mesmos autores, o teste inclui a adição de padrões e amostras a uma microplaca pré-revestida com anticorpos específicos contra cada fator de crescimento, para que ocorra a ligação dos mesmos, lavagens para eliminar substâncias não ligadas e adição de uma solução de substrato a qual desenvolve uma cor proporcional à quantidade de fatores de crescimento encontrados que é interpretada por um leitor.

Em contrapartida, El-Sharkawy et al. (2007), escolheram o imuno-ensaio baseado em citometria de fluxo para quantificar PDGF, VEGF e EGF. As amostras, previamente ativadas, centrifugadas e congeladas receberam anticorpos, foram incubadas em ambiente escuro, lavadas, receberam proteína fluorescente, foram lavadas novamente e então foram analisadas quanto a quantidade de fluorescência.

A maior parte dos estudos realizados na espécie equina, principalmente os de caráter experimental, realizam a quantificação dos fatores de crescimento através do ELISA (Carter et

al., 2003; Pereira et al., 2013; Smit et al., 2019). No entanto, a técnica exige equipamentos e equipe técnica especializada, tornando-se, muitas vezes, de difícil acesso e inviável em questão dos custos, para profissionais que utilizam o PRP em sua rotina clínica e a campo.

3 ARTIGO

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO
Periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFFECTS OF BREED, AGE AND GENDER ON EQUINE PLATELET RICH
PLASMA AND CORRELATION OF PLATELET COUNT WITH PHYSICAL
ASPECT**

**L. B. Paz¹, A. A. Beck Jr¹, A. M. Engelmann¹, J. V. G. Mucha¹, M. I. Frank², R. C. F.
Pereira³, A. Krause⁴, F. D. De La Côte³**

¹Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

²Universidade Federal de Santa Maria – Curso de Medicina Veterinária, Santa Maria, RS

³Departamento de Clínica de Grandes Animais – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

⁴Departamento de Clínica de Pequenos Animais – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

1 **Effects of breed, age and gender on equine Platelet Rich Plasma and correlation of**
2 **platelet count with physical aspect**

3 *[Efeitos de raça, idade e gênero sobre o Plasma Rico em Plaquetas em equinos e correlação da contagem*
4 *plaquetária com o aspecto físico]*

5 *L. B. Paz¹, A. A. Beck Jr¹, A. M. Engelmann¹, J. V. G. Mucha¹, M. I. Frank², R. C. F.*
6 *Pereira³, A. Krause⁴, F. D. De La Côte³*

7
8 **ABSTRACT**

9 Platelet rich plasma samples from 50 healthy horses of five different breeds (Thoroughbreds –
10 TB, Brazilian Criollo Horses – BCH, Brazilian Sport Horses – BSH, Miniature Horses – MH
11 and Cross Breed horses - CB), were investigated as to breed, age and gender effect for platelet
12 concentration. Moreover, a score for physical analysis was established to correlate PRP physical
13 aspect with platelet count. Platelet count was performed by an automatic haematology analyser
14 and by manual count. PRP physical analysis was based on color, aspect and capacity to separate
15 blood components. MH showed significant higher platelet concentration than BSH ($p < 0.05$),
16 while the other breed comparisons showed no significant difference. There was no significant
17 difference for gender but there was a weak correlation of age with PRP platelet concentrations
18 ($r_s = -0.24$). Most of the PRP presented yellow colour, the separation of blood components
19 showed no correlation but the aspect showed a moderate correlation ($r_s = 0.30$) with platelet
20 count. Results suggest that PRP platelet concentration can be influenced by intrinsic factors
21 such as breed. Additionally, the analysis of PRP aspect can help to evaluate the quality of the
22 product, when there is no access to platelet counts.

23 **Keywords:** PRP, horses, intrinsic factors, physical analysis

24
25
26
27
28
29

RESUMO

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

Amostras de plasma rico em plaquetas de 50 cavalos saudáveis, de cinco raças diferentes (Puro Sangue de Corrida, Crioula, Brasileiro de Hipismo, Pônei Brasileiro e Sem raça definida), foram investigados quanto à concentração plaquetária em relação à raça, idade e sexo. Além disso, um escore foi estabelecido para correlacionar o aspecto físico do PRP com a contagem plaquetária. A contagem celular foi realizada por um analisador hematológico automático e pelo método manual. Análise física baseou-se na cor, aspecto e capacidade de separar hemocomponentes. Pôneis tiveram concentração plaquetária significativamente maior que dos Brasileiros de Hipismo ($p < 0.05$), mas as demais comparações entre raças não apresentaram diferença quanto à contagem plaquetária. Não houve diferença para gênero, mas a idade apresentou correlação fraca com as concentrações plaquetárias do PRP ($r_s = -0.24$). A maioria dos PRPs apresentaram coloração amarela, a separação dos hemocomponentes não apresentou correlação com a contagem plaquetária, mas o aspecto apresentou uma correlação moderada ($r_s = 0,30$). Os resultados deste estudo sugerem que a concentração plaquetária do PRP pode ser influenciada por fatores intrínsecos, como a raça. Além disso, a análise do aspecto do PRP pode ajudar na avaliação da qualidade do produto, quando não há acesso à contagem plaquetária.

Palavras-chave: PRP, cavalos, fatores intrínsecos, análise física

INTRODUCTION

58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89

Platelet rich plasma (PRP) is a biological product obtained by blood separation of components and platelet concentration (Everts et al., 2006; Textor, 2011). High counts of platelets and its bioactive growth factors can achieve therapeutic effects such as reducing inflammation and enhancing tissue repair (Marx, 2004; Fortier et al., 2011). The growth factors are derived by platelet's α -granules (Nurden, 2011) and promote anabolic along with angiogenic effects, being crucial in the healing process. Therefore, once known as another form of regenerative therapy with many clinical benefits, the interest on PRP has grown and its use has been spreading to dentistry (Petrungraro, 2001), human (Anitua et al., 2004) and veterinary medicine areas (Carter et al., 2003; Tambella et al., 2018).

There are several protocols of PRP preparation described for the equine species, but studies have shown that the most reliable ones were composed by two centrifugations (Pereira et al., 2013) that separates the red blood cells and leukocytes from plasma followed by concentration of the platelets (Foster et al., 2009). Based on its well-known beneficial action on wound healing in horses (De Rossi et al., 2009), the use of PRP in equine medicine has already been applied as support to healing fractures (Carmona & López, 2011), as treatment for chondral injuries (Yámada et al., 2012), skin burns (Maciel et al., 2012), laminitis (Carmona et al., 2012), endometritis (Reghini et al., 2014), tendon and ligament injuries (Pereira et al., 2018), osteoarthritis (Smit et al., 2019) and its homologous use in equine distal limb skin wounds (Pereira et al., 2019).

Despite all its various clinical applications in equine medicine, there are still factors that differ between authors and can influence in the PRP quality. The several preparation methods (Carmona, 2017) and experience of the person processing the plasma are extrinsic aspects that can interfere in the composition of the final product. In addition, age, breed and gender (Giraldo et al., 2013; Miranda et al; 2018) are considered intrinsic factors that can make PRP final components variable among different individuals. The aim of this study was to evaluate the effects of breed, age and gender in PRP between five different breeds and to correlate its physical aspect with the platelet count.

MATERIALS AND METHODS

90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121

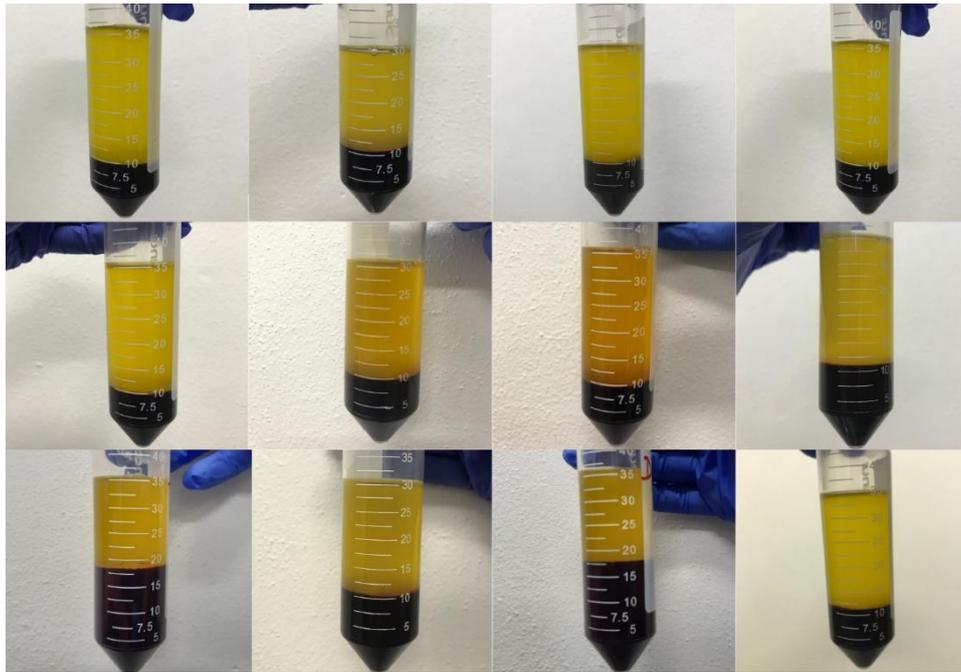
Based on the existing population of horses in the Southern Brazil, five different breeds were selected to be included in this research: Thoroughbreds (TB), Brazilian Criollo Horses (BCH), Brazilian Sport Horses (BSH), Miniature Horses (MH) and Cross Breed Horses (CBH). Fifty healthy horses with the mean age of 9.12 (± 5.44) years old, were included in the study based on owners' consent, absence of hematologic and clinical abnormalities.

Ten TB horses (5 males and 5 females), ten BCH (7 males and 3 females), ten BSH (5 males and 5 females), ten MH (6 males and 4 females) and ten CBH (6 males and 4 females) participated in the study. All animals were located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The horses were kept in individual stables, fed commercial feed, ad libitum water, and alfalfa hay.

The PRP preparation was based on the protocol previously described by Pereira et al. (2013). Initially, 450 ml of blood was collected aseptically from each horse by puncture of the external jugular vein using a commercial blood-transfusion bag containing citrate-phosphate-dextrose solution with adenine as an anticoagulant (CPDA). From each collection, 100ml of whole blood was distributed in three Falcon type polypropylene 50ml tubes (35ml of blood in two tubes and 30ml in the last one).

The tubes with blood were centrifuged at 224g during 10 minutes to separate the blood components (red blood cells, buffy coat with leukocytes and plasma with platelets) and the supernatant plasma portion obtained was transferred to two new Falcon tubes and centrifuged at 440g for 10 minutes. After the second centrifugation step, the supernatant platelet-poor fractions were discarded and 10ml of platelet rich plasma were obtained.

PRP physical analysis was performed by a blind evaluator and was based on color, aspect and capacity to separate blood components in the first centrifugation. This score was created according to our team's experience with PRP and it was analyzed through pictures (Fig. 1). Color was graded in yellow, light yellow, strong yellow and reddish. Aspect was considered clear (1), nearly turbid (2) and turbid (3). The separation of blood components was analyzed based on how the layers were presented in the Falcon tube after first centrifugation. The ones that did not separate the blood components after the first centrifugation, the separation was graded poor (I). The layers that had a short portion mixed was considered median (II) and the ones that presented three layers perfectly distinguished, the separation was considered good (III).



122

123 Figure 1 Twelve of the fifty pictures of PRP after first centrifugation, evaluated on color, aspect and capacity to
 124 separate blood components in the first centrifugation.

125

126 The platelet, red blood cell and leukocyte count was performed by an automatic
 127 hematology analyzer (Mindray BC-2800Vet) and the platelet count was also determined by the
 128 manual method, as described by Roshal and Gil (2019). It was performed in a Neubauer
 129 chamber, using a binocular optical microscope with a magnification of 400 x. Each PRP sample
 130 was diluted and homogenized in Brecher liquid with 1% ammonium oxalate to determine the
 131 number of platelets. The whole protocol of manually processing PRP was done in a laminar
 132 flow cabinet to prevent contamination.

133 All data were analyzed with the software GraphPad Prism 6.0. Normality of variables was
 134 investigated using the Shapiro-Wilk test. Non parametric samples were evaluated by Wilcoxon
 135 or Kruskal-Wallis test as required. When necessary, adjustments for multiple comparisons
 136 with the Dunn's test were performed. Parametric samples were examined by the unpaired t-test
 137 and specific correlations by Spearman's test. The interpretation of the values followed Dancey
 138 and Reidy (2004) literature.

139

140

141

142

143

RESULTS AND DISCUSSION

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

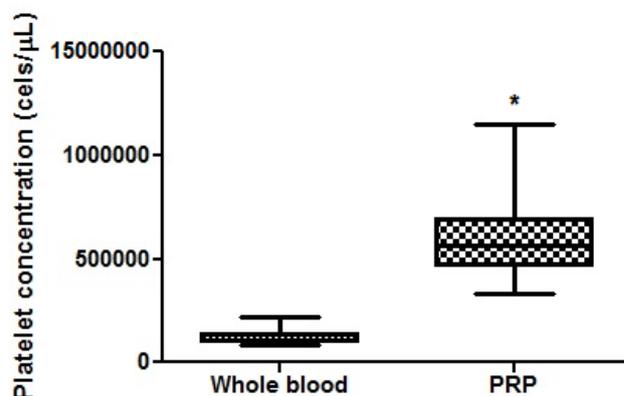
155

156

157

There were significant ($p < 0.0001$) differences for platelet, red blood cell and white blood cell count evaluated between equine whole blood and platelet rich plasma (Fig. 2). As expected, the PRP platelet concentration was significantly higher than the whole blood platelet count in all horses included in the study (Tab. 1). It means that the PRP preparation method used was able to concentrate platelets successfully. The platelet count in PRP is dependent on the whole blood platelet concentration (Barbosa et al., 2008) and the method of preparation (Rinnovati et al., 2016) as well.

Whitlow et al. (2008) showed that platelet concentrations in PRP are commonly three to five-fold over whole blood concentration levels in humans. Although, there is lack of information on platelet counts for each species in veterinary medicine. Horses have the lowest reported platelet count of mammals (Boudreaux & Ebbe, 1998) and cannot be compared with human absolute values taking into account relevant species differences. In these cases, the fold change or percent concentration are used to evaluate the quality of platelet concentrates.



158

159

160

161

162

163

164

165

Figure 2 Different average platelet concentration ($p < 0.0001$) was observed between samples from whole blood and PRP(*).

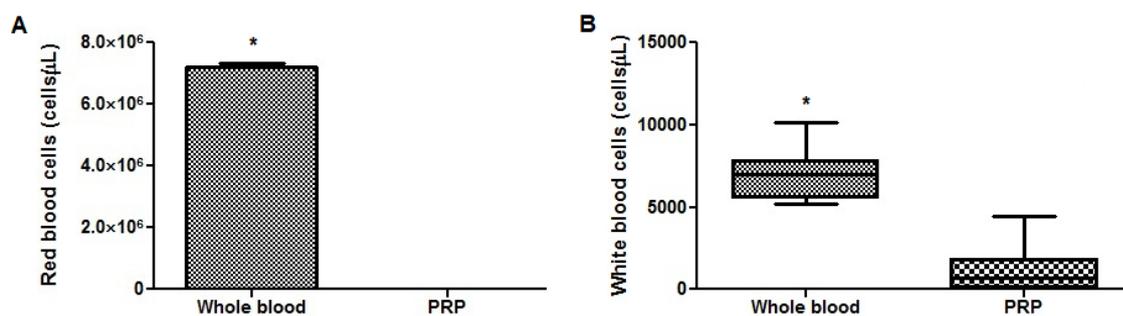
166 Table 1 – General results for platelet, red blood cell and white blood cell count of whole blood
 167 and platelet rich plasma (PRP).

Variable	Whole blood (n=50)	PRP (n=50)
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	177.72 (± 39.95)	596.13 (± 238.77)
Red Blood Cell ($10^6/\mu\text{L}$)	7.20 (± 1.37)	0.00
White Blood Cell ($10^3/\mu\text{L}$)	7.02 (± 0.22)	1.11 (± 0.17)

168

169 All horses presented significant lower ($p < 0.0001$) red blood cells and white blood cells
 170 in the processed PRP when compared with whole blood (Fig. 3). The PRP is composed by
 171 plasma, platelets and some white blood cells, depending on the method of preparation.
 172 According to Fontenot et al. (2012), there is an uncertain definition about the real composition
 173 of PRP final product in the literature. Some protocols of PRP preparation leaves a portion of
 174 red blood cells in the final product and that can be considered inappropriate (Pereira et al.,
 175 2013). The presence of white blood cells (WBC) in the PRP sample have beneficial effects
 176 such as immunomodulatory and antimicrobial function, however leukocytes also have been
 177 correlated with expression of catabolic cytokines in human PRP (Sundman et al., 2011),
 178 consequently a reduced leukocyte count in the PRP is recommended.

179



180

181 Figure 3 A) Different ($p < 0.0001$) red blood cell count between whole blood (*) and PRP. B) Different ($p <$
 182 0.0001) white blood cell count between whole blood and PRP.

183

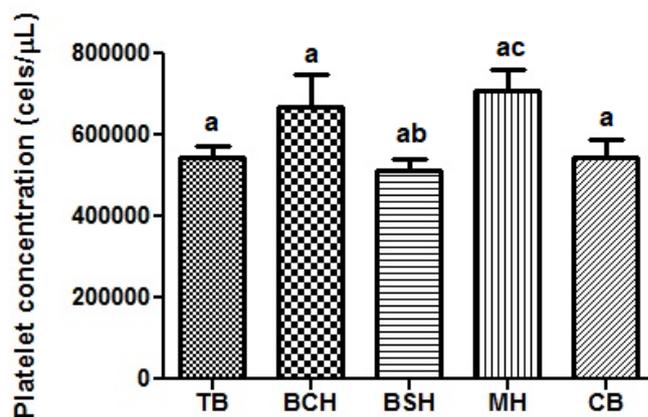
184

185

186 Apart from the MH that showed significant higher platelet concentration than BSH (p
 187 < 0.05), all the other breed comparisons showed no significant difference ($p > 0.05$) due to
 188 similar PRP platelet values between these groups (Fig. 4). Furthermore, considering the platelet
 189 percent concentration (Tab. 2) based on formula described by Miranda et al. (2018), there was
 190 a trend for higher platelet concentrations in the Miniature Horse breed.

191 Giraldo et al. (2013) evaluated the effects of the breed on cellular content from equine
 192 PRP samples. The author reported higher platelet counts in Colombian Criollo Horses when
 193 compared to Argentinean Criollo Horses, representing a significant breed influence on PRP
 194 final components. Following the same research line, Miranda et al. (2018) compared platelet
 195 concentration between Quarter Horses, Thoroughbreds, Mangalarga Marchador pacers and
 196 mules, identifying that the PRP platelet content varied according to breed and species of equid.
 197 These data in addition with the results of our research, improves the advance of homologous
 198 PRP new researches.

199



200

201 Figure 4 Platelet concentration comparison between Thoroughbreds (TB), Brazilian Criollo Horses (BCH),
 202 Brazilian Sport Horses (BSH), Miniature Horses (MH) and Cross Breed horses (CB). Different letters indicate
 203 statistical difference between groups ($p < 0.05$).

204

205

206

207

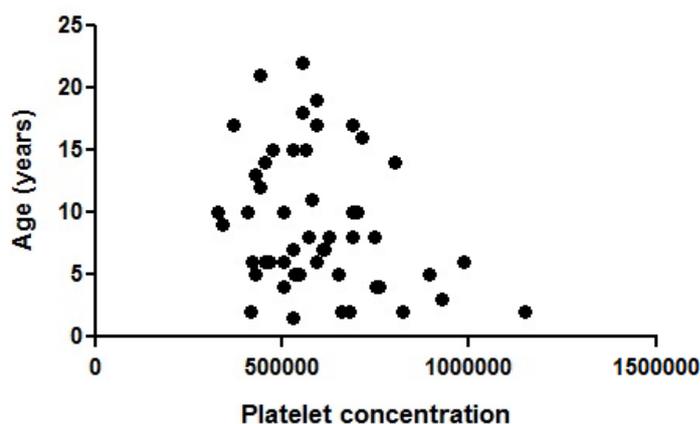
208 Table 2 – Whole blood and platelet rich plasma (PRP) platelet count between Thoroughbreds
 209 (TB), Brazilian Criollo Horses (BCH), Brazilian Sport Horses (BSH), Miniature Horses (MH)
 210 and Cross Breed horses (CB) with its percent concentration rate (PRP/PI*100).

Breed	Initial platelet concentration (PI) ($10^3/\mu\text{L}$)	PRP platelet concentration ($10^3/\mu\text{L}$)	Percent concentration (%)
TB	120.80 (± 41.05)	544.80 (± 29.30)	450.99
BCH	129.90 (± 32.93)	670.15 (± 77.02)	515.89
BSH	104.20 (± 17.03)	510.75 (± 31.65)	490.16
MH	107.70 (± 16.81)	710.07 (± 48.95)	659.30
CB	126.60 (± 20.24)	544.90 (± 43.39)	430.41

211

212 There was a weak correlation of age with PRP platelet concentrations (Fig. 5),
 213 demonstrated by the Spearman's rank correlation coefficient ($r_s = -0.24$), as the negative value
 214 means that as the age increases, the platelet counts tend to decrease. Weibrich et al. (2002)
 215 investigated growth factor levels in human platelet-rich plasma and correlations with donor age
 216 and platelet count but the author did not find significant influence on the outcome. However,
 217 Giraldo et al. (2013) reported that equine PRP cellular content and the growth factors
 218 concentration were also influenced by age.

219



220

221 Figure 5 Correlation between age (years) of the animals and platelet concentration in their PRP samples.

222

223

224

225 The PRP platelet values analyzed in this research presented different statistical behavior
 226 for gender. It showed no significant difference ($p = 0.09$) between females in comparison with
 227 males. Platelet counts in human PRP, tends to be slightly higher in women than in men, as
 228 described by Weibrich et al. (2002). Similarly, Giraldo et al. (2013) reported that platelet counts
 229 for equine PRP were significantly higher in females when compared to males, therefore the
 230 numerical imbalance in their study between genders (30 male and 10 female) may have
 231 interfered on the final analysis of these authors.

232 Subsequently, the PRP physical analysis data revealed interesting results. According to
 233 the blind evaluation, most of the platelet rich plasma samples presented yellow colored (Tab.
 234 3), that is considered the normal plasma presentation (Nin et al., 2009).

235
 236 Table 3 – Distribution of the platelet rich plasma samples analyzed by color.

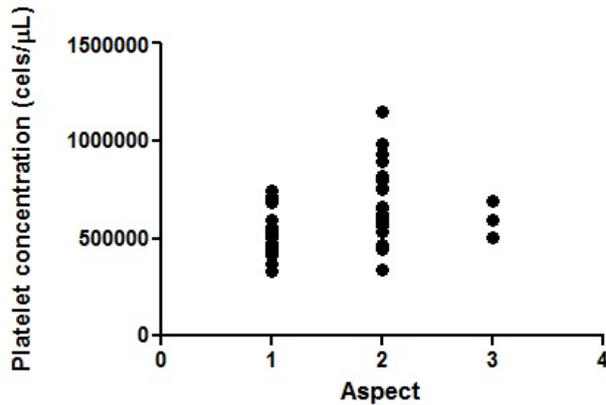
Color scale	Percent rate
Yellow	48%
Light yellow	32%
Strong Yellow	14%
Reddish	6%

237

238 In addition, the scores for aspect and separation of blood components were analyzed in
 239 correlation with PRP platelet count. The aspect showed a moderate correlation with PRP
 240 platelet count due to the Spearman's rank correlation coefficient ($r_s = 0.302$) and the scale for
 241 separation of blood components indicated no correlation taking into consideration the
 242 Spearman's coefficient ($r_s = 0.070$). It means that the samples with nearly turbid (2) or turbid
 243 (3) aspect can probably have the best platelet concentration (Fig. 6).

244 There is limited information available regarding the platelet rich plasma physical
 245 presentation in human literature (Nin et al., 2009) and there are no described reference ranges
 246 of equids PRP physical appearance in veterinary reports, to the best of our knowledge. It is
 247 believed that this information can help veterinary practitioners in the daily routine to evaluate
 248 PRP quality when there is no possibility of access to a laboratory in the field and to determine
 249 the real platelet counts.

250



251 Figure 6 Correlation between PRP physical aspect (1 - Clear, 2 - Nearly turbid, 3 - Turbid) and platelet
 252 concentration.
 253

254 CONCLUSIONS

255 Overall, the results in this study suggests that PRP platelet concentration can be
 256 influenced by intrinsic factors such as age and confirms that it can be influenced by breed.
 257 Methods of PRP preparation and sample handling should be standardized to reduce these
 258 effects. Moreover, with moderate results, physical aspect analysis should be a promising PRP
 259 quality evaluation when there is no access to platelet counts. It does not replace laboratorial
 260 analysis, but considering field routine, a skilled practioner would be able to correlate these
 261 aspects to the final product quality.
 262
 263

264 ACKNOWLEDGEMENTS

265 This study was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education
 266 (CAPES) and Foundation to Support Science and Technology (FATEC), agreement
 267 FATEC/UFSM (Grant 5.03.0046).
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276

REFERENCES

- 277
278
279 ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B. et al. Autologous platelets as a source of proteins
280 for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.*, v.91, n.1, p.4–15, 2004.
281
282 BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C. et al. Plasma rico em plaquetas para
283 reparação de falhas ósseas em cães. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, 2008.
284
285 BOUDREAUX, M. K.; EBBE, S. Comparison of platelet number, mean platelet volume and
286 platelet mass in five mammalian species. *Comp. Haematol. Int.*, v. 8, n. 1, p. 16–20, 1998.
287
288 CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder
289 injury in a horse. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 31, n.9, p. 1-5, 2011.
290
291 CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous platelet concentrate as an
292 adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction.
293 *J. Equine Vet. Sci.*, v.33, n. 3, 2012.
294
295 CARTER, C. A.; JOLLY, D. G.; WORDEN, C. E. et al. Platelet-rich plasma gel promotes
296 differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.*, v.74, n.3,
297 p.244–255, 2003.
298
299 DANCEY, C.; REIDY, J. Statistics without maths for psychology: using SPSS for windows.
300 *Prentice-Hall*, 2004.
301
302 DE ROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S. et al. Effects of platelet-rich plasma gel
303 on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir. Bras.*, v.24, n.4, p.276-281, 2009.
304 EVERTS, P. A.; KNAPE, J. T.; WEIBRICH, G. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a
305 review. *J. Extra Corpor. Technol.*, v.38, n.2, p.174–187, 2006.
306
307 FONTENOT, R. L., SINK, C. A., WERRE, S. R. et al. Simple tube centrifugation for
308 processing platelet-rich plasma in the horse. *Can. Vet. J.*, v. 53, n. 12, p.1266–1272, 2012.
309

- 310 FORTIER, L. A.; BARKER, J. U.; STRAUSS, E. J. et al. The role of growth factors in cartilage
311 repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* v.469, p. 2706–2715, 2011.
- 312
- 313 FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R. et al. Platelet-rich plasma: from
314 basic science to clinical applications. *Am. J. Sports Med.*, v. 37, n. 11, p. 2259-2272, 2009.
- 315
- 316 GIRALDO, C.; LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. E., et al. Effects of the breed, sex and age on
317 cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-
318 platelet rich gel. *BMC Vet. Res.*, v.9, n.29, 2013.
- 319
- 320 MACIEL, F.B., DE ROSSI, R., MÓDOLO, T.J., et al. Scanning electron microscopy and
321 microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel
322 treatment. *Burns*, v. 38, n. 7, p. 1058-1065, 2012.
- 323
- 324 MARX, R. E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.
325 62, p. 489–496, 2004.
- 326
- 327 MIRANDA S.; COSTA, M. F. D. M.; SENNA, J. J. et al. Effects of breed/species and gender
328 on platelet concentration in autologous platelet rich plasma. *Acta Veterinaria*, v.68, n.4, p.474-
329 483, 2018.
- 330 NIN, J. R. V.; GASQUE, G. M.; AZCÁRATE, A. V. et al. Has Platelet-Rich Plasma Any Role
331 in Anterior Cruciate Ligament Allograft Healing? *Arthroscopy*, v. 25, n. 11, p. 1206-1213,
332 2009.
- 333
- 334 NURDEN, A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.*, v. 105,
335 p.13–33, 2011.
- 336
- 337 PEREIRA, R. C. F., ZACARIAS G.V. F., CANTARELLI, C., et al. Avaliação de sete
338 protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. *Cienc. Rural*, v.43,
339 p. 1122-1127, 2013.
- 340
- 341 PEREIRA, R. C. F.; DE LA CÔRTE, F. D., BRASS, K. E., et al. The effect of platelet-rich
342 plasma in the treatment of tendonitis and Desmitis in horses: report of eight clinical cases. *Int.*
343 *J. Dev. Res.*, v. 8, n. 2, p. 18772-18774, 2018.

344

345 PEREIRA, R. C. F.; DE LA CÔRTE, F. D.; BRASS, K. E., et al. Evaluation of Three Methods
346 of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Equine Distal Limb Skin Wounds. *J. Equine Vet. Sci.*,
347 v. 72, p. 1-7, 2019.

348

349 PETRUNGARO, P. S. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic
350 periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent.*, v. 22, n. 9, p. 729-746, 2001.

351

352 REGHINI, M. F. S.; BUSSIÈRE, M. C. C.; RAMIRES NETO, C., et al. Effect of use of platelet
353 rich plasma on post-breeding uterine inflammatory response of mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v.
354 34, n. 1, p. 127, 2014.

355

356 RINNOVATI, R.; ROMAGNOLI, N.; GENTILINI, F. et al. The influence of environmental
357 variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Vet. Scand.*, v. 58, n.45,
358 2016.

359

360 ROSHAL, M.; REYES GIL, M. Measurement of Platelet Count, Mean Platelet Volume, and
361 Reticulated Platelets. *Transf. Med. Hem.* 3ed. Elsevier, 2019. c. 137, p. 811–815.

362

363 SMIT, Y.; MARAIS, H. J.; THOMPSON, P. N., et al. Clinical findings, synovial fluid cytology
364 and growth factor concentrations after intra-articular use of platelet-rich product in horses with
365 osteoarthritis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 90, 2019.

366

367 SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine
368 concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am. J. Sports
369 Med.*, v. 39, p. 2135–2140, 2011.

370

371 TAMBELLA, A. M.; MARTIN, S.; CANTALAMESSA, A., et al. Platelet-rich Plasma and
372 Other Hemocomponents in Veterinary Regenerative Medicine. *Wounds*, v.30, n.11, p.329–336,
373 2018.

374

375 TEXTOR, J. A. Autologous biological treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-
376 rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.*, v. 27, n.
377 2, p. 275-298, 2011.

378

379 WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K.; HAFNER, G.; HITZLER, W. E. Growth factor levels in
380 platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J*
381 *Craniomaxillofac Surg.*, v. 30, n. 2, p. 97–102, 2002.

382

383 WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A.; SIEVERT, A.; SISTINO, J. Barriers to the acceptance
384 and use of autologous platelet gel. *Perfusion*, v. 23, n. 5, p. 283–289, 2008.

385

386 YÁMADA, A.L.M.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, P. G. G., et al. Plasma rico em
387 plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em
388 equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arq. Bras. Med. Vet.*
389 *Zootec.* v. 64, n. 2, p. 323-332, 2012.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a ascensão da terapia com plasma rico em plaquetas na medicina veterinária, uma avaliação ampla do produto e dos fatores que influenciam na qualidade do mesmo traz segurança aos profissionais que desejam utilizá-lo na rotina. Os resultados deste estudo sugerem que a concentração plaquetária do PRP pode ser influenciada por fatores intrínsecos como a idade e ainda confirma que a mesma pode ser influenciada pela raça. Os métodos de produção do PRP e a manipulação das amostras devem ser padronizados para reduzir estes efeitos.

Além disso, sugerimos que a análise do aspecto físico pode ser um método promissor de avaliação da qualidade do PRP quando não há acesso à contagem de plaquetas, proporcionando assim melhores condições para que a terapia não seja utilizada de forma empírica. Esta análise não substitui a laboratorial, mas considerando a rotina de campo, um profissional experiente seria capaz de correlacionar esses aspectos à qualidade do produto final. A maximização do conhecimento destes profissionais sobre o PRP, tende a ampliar a sua utilização na medicina equina e beneficiar diversos animais.

5 REFERÊNCIAS

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.; PASTOR, J. & IBORRA, ANTONI & VIÑALS, L & MARTÍNEZ, PAZ & BACH, E & PRADES ROBLES, MARTA. Evaluation of single and double centrifugation tube method for concentrating equine platelets. **Research in veterinary science**, v. 82, 2006.

BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.

BARRIONUEVO, D. V.; LAPOSY, C. B.; ABEGÃO, K. G.; NOGUEIRA, R. M.; NAI, G. A.; BRACALE, B. N.; DELFIM, I. G. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. **Laboratory animals**, v. 49, n. 3, p. 209–214, 2015.

BOTTEGONI, C.; DEI GIUDICI, L.; SALVEMINI, S.; CHIURAZZI, E.; BENCIVENGA, R.; GIGANTE, A. Homologous platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis in

selected elderly patients: an open-label, uncontrolled, pilot study. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 8, n.2, p. 35–41, 2016.

BRIGGS, C.; HARRISON, P.; MACHIN, S. J. Continuing developments with the automated platelet count. **Internal Journal of Laboratory Hematology**, v. 29, p. 77-91, 2007.

CARMONA, J. U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F; PRADES, M. 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.

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n.9, p. 1-5, 2011.

CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous platelet concentrate as an adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n. 3, 2012.

CARMONA, J. U; RÍOS, E.; VILAR, J. M.; GIRALDO, C. E.; LÓPEZ, C. Effect of two anticoagulants on the cell count and platelet activation parameters from bovine platelet rich plasma. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 46, n. 3, p. 375-380, 2014.

CARTER, C. A.; JOLLY, D. G.; WORDEN, C. E.; HENDREN, D. G.; KANE, C. J. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 244-255, 2003.

CATARINO, J.; CARVALHO, P.; SANTOS, S.; MARTINS, Â.; REQUICHA, J. Treatment of canine osteoarthritis with allogeneic platelet-rich plasma: review of five cases. **Open veterinary journal**, v. 10, n. 2, p. 226–231, 2020.

DE ROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S.; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, G. G.; BRUM, K. B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.4, p.276-281, 2009.

DUYMUS, T.M.; MUTLU, S.; DERNEK, B.; KOMUR, B.; AYDOGMUS, S.; KESIKTAS, F. N. Choice of intra-articular injection in treatment of knee osteoarthritis: platelet-rich plasma, hyaluronic acid or ozone options. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 25, p. 485-492, 2016.

EL-SHARKAWY, H.; KANTARCI, A.; DEADY, J.; HASTURK, H.; LIU, H.; ALSHAHAT, M., VAN DYKE, T. E. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 4, p. 661–669, 2007.

EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 114, n. 6, p. 1502–1508, 2004.

EVANSON, J. R.; GUYTON, M. K.; OLIVER, D. L.; HIRE, J. M.; TOPOLSKI, R. L.; ZUMBRUN, S. D.; MCPHERSON, J. C.; BOJESCU, J. A. Gender and age differences in growth factor concentrations from platelet-rich plasma in adults. **Military medicine**, v. 179, n. 7, p. 799–805, 2014.

FERRARI, M.; ZIA, S.; VALBONESI, M.; HENRIQUET, F.; VENERE, G.; SPAGNOLO, S.; GRASSO, M. A.; PANZANI, I. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. **The International Journal of Artificial Organs**, v.10, n.1, p. 47-50, 1987.

FOLKMAN, J.; BROWDER, T.; PALMBLAD, J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 1, p. 23-33, 2001.

FORTIER, L. A.; BARKER, J. U.; STRAUSS, E. J.; McCARREL, T. M.; COLE, B. J. The role of growth factors in cartilage repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v.469, p. 2706–2715, 2011.

FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, M. B.; RODEO, S. A. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 11, p. 2259-2272, 2009.

GEMIGNANI, F.; PERAZZI, A.; IACOPETTI, I. Use of canine sourced platelet-rich plasma in a feline contaminated cutaneous wound. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, v. 58, n.2, p. 141–144, 2017.

GIRALDO, C.; LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. 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, n.29, 2013.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 22, p. 547–557, 2002.

GUBINA, B.; ROŽMAN, P.; BIŠCEVIĆ, M.; DOMANOVIĆ, D.; SMRKE, D. The influence of allogeneic platelet gel on the morphology of human long bones. **Collegium Antropologicum**, v. 38, p. 865–870, 2014.

HARRISON, S.; VAVKEN, P.; KEVY, S.; JACOBSON, M.; ZURAKOWSKI, D.; MURRAY, M. M. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. **American Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 4, p. 729–734, 2011.

HONG, K. H.; KIM, M.J., LEE, K.W.; PARK, K. U.; KIM, H. S.; SONG, J. Platelet count evaluation using three automated haematology analysers compared with the immunoplatelet referencemethod, estimation of possible inadequate platelet transfusion. **Internal Journal of Laboratory Hematology**, v. 31, p. 298-306, 2009.

IESARI, S.; LAI, Q.; RUGHETTI, A.; DELL'ORSO, L.; CLEMENTE, K.; FAMULARI, A.; PISANI, F.; FAVI, E. Infected Nonhealing Wound in a Kidney Transplant Recipient: Successful Treatment with Topical Homologous Platelet-Rich Gel. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 15, n. 2, p. 222-225, 2017.

INCE, B.; YILDIRIM, M. E. C., DADACI, M., AVUNDUK, M. C., & SAVACI, N. Comparison of the efficacy of homologous and autologous platelet-rich plasma (PRP) for treating androgenic alopecia. **Aesthetic plastic surgery**, v. 42, n. 1, p. 297-303, 2018.

MACIEL, F.B., DEROSI, R., MÓDOLO, T.J., PAGLIOSA, R.C., LEAL, C.R. Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. **Burns**, v. 38, n. 7, p. 1058-1065, 2012.

MARKOPOULOU, C.; MARKOPOULOS, P.; DEREKA, X.; PEPELASSI, E.; VROTSOS, I. Effect of homologous PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblasts. In vitro preliminary study. Report of a case. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 9, p. 167–172, 2009.

MARTINEZ, S. Practical guidelines for using PRP in the orthopaedic office. **AAOS Now**, 2010.

MARX, R. E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEORGEFF, K.R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 62, p. 489–496, 2004.

MESSORA, M. R.; NAGATA, M. J. H.; FURLANETO, F. A. C.; DELIBERADOR, T. M.; MELO, L. G. N.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)-estudo experimental em coelhos. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 3, p. 291-296, 2009.

MIRANDA S.; COSTA, M. F. D. M.; SENNA, J. J. et al. Effects of breed/species and gender on platelet concentration in autologous platelet rich plasma. **Acta Veterinaria**, v.68, n.4, p.474-483, 2018.

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of Chronic Elbow Tendinosis with Buffered Platelet-Rich Plasma. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 11, p. 1774-1778, 2006.

NURDEN, A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 105, p.13–33, 2011.

PEREIRA, R. C. F., ZACARIAS G.V. F., CANTARELLI, C., CORRÊA, M. M. B., SILVA, G.B., BARBOSA, A.L.T. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. **Ciência Rural**, v.43, p. 1122-1127, 2013.

PEREIRA, R. C. F.; DE LA CÔRTE, F. D., BRASS, K. E., et al. The effect of platelet-rich plasma in the treatment of tendonitis and Desmitis in horses: report of eight clinical cases. **International Journal of Development Research.**, v. 8, n. 2, p. 18772-18774, 2018.

PEREIRA, R. C. F.; DE LA CÔRTE, F. D.; BRASS, K. E., 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.

PETRUNGARO, P. S. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. **Compendium of continuing education in dentistry**, v. 22, n. 9, p. 729-746, 2001.

PRABHU, R.; VIJAYAKUMAR, C.; BOSCO CHANDRA, A. A.; BALAGURUNATHAN, K.; KALAIARASI, R.; VENKATESAN, K.; RAJA, E. S.; SWETHA, T. Efficacy of Homologous, Platelet-rich Plasma Dressing in Chronic Non-healing Ulcers: An Observational Study. **Cureus**, v.10, n.2, 2018.

REGHINI, M. F. S.; BUSSIERE, M. C. C.; RAMIRES NETO, C.; CASTRO-CHAVES, M. M. B.; RESENDE, H. L.; FIORATTI, E.; FARRAS, M. C.; ALVARENGA, M. A. Effect of use of platelet rich plasma on post-breeding uterine inflammatory response of mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 127, 2014.

RONCI, C.; FERRARO, A. S.; LANTI, A.; MISSIROLI, F.; SINOPOLI, S.; DEL PROPOSTO, G.; CIPRIANI, C.; DE FELICI, C.; RICCI, F.; CIOTTI, M.; CUDILLO, L.; ARCESE, W.; ADORNO, G. Platelet-rich plasma as treatment for persistent ocular epithelial defects. **Transfusion and apheresis science: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis**, v. 52, n. 3, p. 300–304, 2015.

ROSHAL, M.; REYES GIL, M. Measurement of Platelet Count, Mean Platelet Volume, and Reticulated Platelets. **Transfusion Medicine and Hemostasis**. 3ed. Elsevier, 2019. c. 137, p. 811–815.

SMIT, Y.; MARAIS, H. J.; THOMPSON, P. N.; MAHNE, A. T.; GODDARD, A. Clinical findings, synovial fluid cytology and growth factor concentrations after intra-articular use of platelet-rich product in horses with osteoarthritis. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 90, 2019.

SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; FORTIER, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. **American Journal of Sports Medicine**, v. 39, p. 2135–2140, 2011.

TAHIR, M.; DURRANI, U.; MAHMOOD, A.; AKHTAR, R.; HUSSAIN, R.; HUSSAIN, A.; MATLOOB, K.; ZAHID, B. Evaluation of autologous and homologous platelet rich plasma as a surgical wound healing promoter in rabbits. **Indian Journal of Animal Research**, v. 52, n. 7, p. 1068-1070, 2018

TASKER, S.; CRIPPS, P. J.; MACKIN, A. J. Evaluation of methods of platelet counting in the cat. **Journal of Small Animal Practice**, v.42, n.7, p.326-332, 2001.

TEXTOR, J. A. Autologous biological treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. **The veterinary clinics of North America: Equine practice**. v. 27, n. 2, p. 275-298, 2011.

XIONG, G.; LINGAMPALLI, N.; KOLTSOV, J. C.; LEUNG, L. L.; BHUTANI, N.; ROBINSON, W. H.; CHU, C. R. Men and women differ in the biochemical composition of platelet-rich plasma. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 2, p. 409-419, 2018.

WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A.; SIEVERT, A.; SISTINO, J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v.23, p. 283-289, 2008.

YÁMADA, A.L.M.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, P. G. G.; FELISBINO, S. L.; QUEIROX, D. L.; WATANABE, M. J.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G. 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. 323-332, 2012.