



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado Integrado de Medicina veterinária

Artigo de revisão

**O PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO
DA OSTEOARTRITE DOS EQUINOS**

Louis Deconinck

Coimbra, 26 de julho 2024



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado integrado de Medicina Veterinária

Artigo de revisão

**O PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO
DA OSTEOARTRITE DOS EQUINOS**

Coimbra, 26 de julho 2024

Louis Deconinck

Constituição do Júri

Presidente do júri: Professora Doutora Ana
Catarina Pais dos Santos Figueira

Arguente: Professora Doutora Ana Rita
Caseiro Santos

Orientador: Joana Leal Freire Quelhas Reis

Trabalho realizado sob a orientação do/a(s)

Professora Doutora Joana Quelhas

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos conducente ao Grau de:

Mestre em Medicina Veterinária da EUVG.

INDICE GERAL:

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
1) ARTICULAÇÃO E OSTEOARTRITE ASSOCIADA.....	4
1)1) ANATOMIA E FISILOGIA ARTICULAR.....	4
1)1)1) O osso subcondral.....	5
1)1)2) A cartilagem.....	6
1)1)3) A cápsula articular.....	6
1)1)4) A membrana e o líquido sinoviais	6
1)2) A OSTEOARTRITE	7
1)2)1) Prevalência e etiopatogenia da doença.....	7
1)2)2) Sinais clínicos e diagnóstico.....	9
1)2)3) Tratamentos convencionais	10
2) O PRP E SEU USO NA OSTEOARTRITE.....	11
2)1) CONSIDERAÇÕES GERAIS E PREPARAÇÃO.....	12
2)2) APLICAÇÃO NA OSTEOARTRITE.....	14
2)2)1) Protocolos de tratamento.....	14
2)2)2) Mecanismo de ação.....	15
2)3) OUTRAS APLICAÇÕES DO PRP.....	17
3) RESULTADOS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	18
4) CONCLUSÃO.....	20
5) BIBLIOGRAFIA.....	21

INDICE DE FIGURAS E TABELAS:

Figura 1: Representação esquemática de uma articulação equina adaptada do artigo «The Anatomy of a Joint». Duffy, 2019, USEA.....	5
Figura 2: Diagrama mostrando as possíveis etapas para degradação da cartilagem articular resultando de um trauma na articulação do cavalo (McIlwraith <i>et al.</i> , 2012).....	9
Figura 3: Protocolo de preparação do PRP adaptado do artigo de Miranda <i>et al.</i> , (2019).....	14
Tabela 1: Funções dos diferentes fatores de crescimento contidos nas plaquetas (adaptado de Cole <i>et al.</i> , (2010) e Carmona <i>et al.</i> , (2011)).....	16

INDICE DE ABREVIATURAS:

ACS: Soro Autólogo Condicionado (*Autologous Conditioned Serum*)

AINES: Anti-inflamatórios não esteroides

COX-1 e COX-2: Ciclo-oxigenase 1 e 2

FC: Fatores de Crescimento

OA: Osteoartrite

PGE2: Prostaglandina E2

PL-PGE2: Prostaglandina E2 plasmática

PRP: Platelets Rich Plasma ou Plasma Rico em Plaquetas

RM: Ressonância Magnética

TC: Tomografia Computorizada

Xg: Força de centrifugação

G: Gauge

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

mM: Milimole

U/mL: Unidade por mililitro

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF-β1: Fator de crescimento transformador beta 1

bFGF: Fator de crescimento fibroblástico básico

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

IGF: Fator de crescimento insulínico

EGF: Fator de crescimento epidérmico

HGF: Fator de crescimento hepatocístico

ADP: Difosfato de Adenosina

ATP: Trifosfato de Adenosina

O PRP (PLATELETS RICH PLASMA) NO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE DOS EQUINOS

Louis André Joseph Michel Deconinck ^{a)}, Joana Leal Freire Quelhas Reis ^{a)}

^{a)} Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (louisduck359@gmail.com), (joana.quelhas@euvg.pt)

RESUMO:

As patologias articulares, particularmente a osteoartrite, representam uma parte significativa nas perdas de bem-estar e de performances nos equinos. Esta doença da cartilagem articular, de natureza degenerativa, é altamente complexa e os tratamentos convencionais com anti-inflamatórios mostram-se insuficientes. No sentido de limitar a degenerescência precoce e a perda de função da articulação, o interesse crescente pela medicina regenerativa tem levado a um aumento considerável de estudos relativos ao Plasma rico em plaquetas e à sua utilização neste tipo de patologias. Graças a uma técnica simples de colheita e dupla centrifugação e com um custo moderado, pode ser obtida uma solução concentrada em plaquetas. Esta substância permite a liberação de fatores de crescimento e de citocinas diretamente no local da lesão. Os fatores de crescimento ajudam na proliferação celular, na reparação dos tecidos e, conseqüentemente, na regeneração da cartilagem. Eles são suplementados pelas citocinas que são responsáveis pela regulação do catabolismo e da reação inflamatória intra-articular. O alívio da dor e dos sinais clínicos permite alcançar retorno ao exercício ou aumento do conforto na vida de muitos cavalos. Mesmo tendo em conta a variabilidade individual, este produto autólogo apresenta resultados muito positivos e promissores no futuro da medicina veterinária. No entanto, mais estudos são necessários para definir um consenso sobre protocolos de preparação e de aplicação do Plasma Rico em Plaquetas, bem como para obter mais informação sobre a eficiência e a fiabilidade do tratamento.

PALAVRAS-CHAVE: Plasma Rico em Plaquetas, PRP, medicina regenerativa, articulação, cartilagem, cavalos, osteoartrite.

ABSTRACT:

Joint pathologies, particularly osteoarthritis , represent a significant portion of welfare and performance losses in horses. This degenerative joint disease is highly complex, and conventional treatments with anti-inflammatories often prove insufficient. In an effort to limit early degeneration and joint function loss, the growing interest in regenerative medicine has led to a considerable increase in studies regarding Platelets Rich Plasma and its use in such pathologies. Thanks to a simple technique of collection and double centrifugation, and with moderate cost, a platelet-rich plasma solution can be obtained. This substance allows for the release of growth factors and cytokines directly at the site of the lesion. The growth factors aid in cell proliferation, tissue repair, and consequently, cartilage regeneration. They are supplemented by cytokines responsible for regulating catabolism and the intra-articular inflammatory reaction. Relief from pain and clinical signs enables a return to exercise or an increase in the quality of life for many horses. Despite individual variability, this autologous product shows very positive and promising results for the future of veterinary medicine. However, further studies are needed to establish a consensus on Platelets Rich Plasma preparation and application protocols, as well as to obtain more information on treatment efficiency and reliability.

KEY WORDS: Platelet Rich Plasma, PRP, regenerative medicine, joint, cartilage, horses, osteoarthritis

INTRODUÇÃO:

Os equídeos, e mais precisamente os equídeos de desporto, devido á sua utilização, são mais sujeitos ao desenvolvimento de patologias musculoesqueléticas. Este tipo de patologias representa grande parte dos diagnósticos em medicina veterinária equina e tendem a diminuir a função atlética do animal ou até pior, acabar prematuramente a sua carreira desportiva (Ribitsch *et al.*, 2021).

As patologias articulares, muitas vezes, são do tipo crónico e degenerativo e neste caso, mais frequentemente designadas de osteoartrite (OA). A OA, também designada de afeção articular degenerativa, é caracterizada pela erosão da cartilagem articular que desencadeia remodelação prematura da estrutura óssea e dos tecidos associados. Infelizmente, elas nem sempre apresentam respostas satisfatórias aos tratamentos convencionais pela administração de anti-inflamatórios intra-articulares ou analgésicos a médio e longo prazo, pois só permitem diminuir os sinais sem tratar a lesão em si (Bogers SH. 2018).

Esta situação reforça o interesse e a investigação da medicina chamada de «regenerativa». Ela implica o uso de substâncias autólogas (Plasma Rico em Plaquetas (PRP), células estaminais ou *autologous conditioned serum* (ACS) e a regeneração autónoma do organismo em vez de terapias medicamentosas (Abu-Seida, 2015). No caso do plasma rico em plaquetas, trata-se da colheita do sangue do próprio animal, da centrifugação e da reinjeção do mesmo na área da lesão. O PRP tem função regenerativa e anti-inflamatória que permite a estimulação da cura e o alívio da dor ao nível da lesão (Garbin *et al.*, 2021). Esta técnica simples, interessante do ponto de vista económico e com resultados promissores tem e terá, sem dúvida, grande interesse no tratamento das doenças articulares, nomeadamente na osteoartrite.

O objetivo desta revisão é apresentar uma compilação dos artigos mais recentes, publicados relativamente ao PRP, do seu uso e dos seus desafios de futuro no contexto do tratamento da osteoartrite nos equinos.

1. ARTICULAÇÃO E OSTEOARTRITE ASSOCIADA

1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA ARTICULAR

As articulações representam uma parte importante do sistema musculoesquelético. Permitem a ligação de partes do esqueleto, de forma flexível, possibilitando a deformação do corpo e, assim, sua locomoção, sem comprometer a rigidez dos segmentos individuais. Os movimentos também são

condicionados pelo equilíbrio entre a transmissão das forças e a lubrificação dos pontos de mobilidade, que são as articulações (Van Weeren, R. 2013). Existem três tipos diferentes de articulações, mas aquelas de interesse principal neste caso são as articulações sinoviais (McIlwraith *et al.*, 2016). Estas articulações são compostas por várias estruturas que vão ser apresentadas mais adiante e que estão resumidas na figura 1.

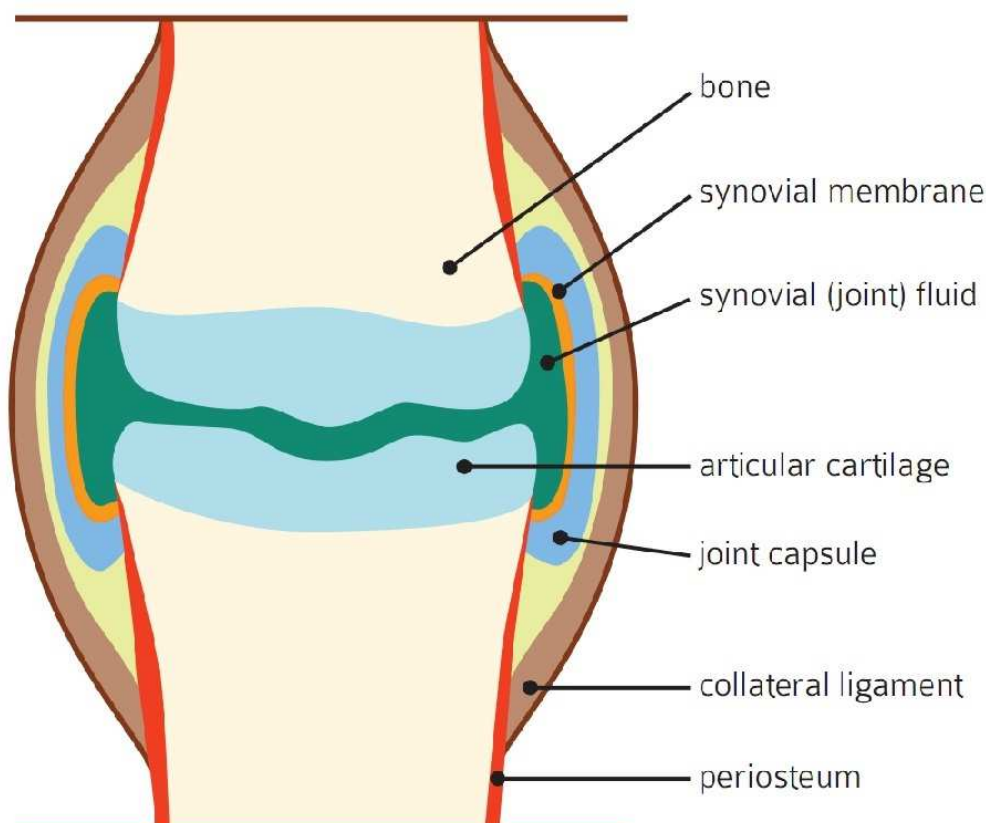


Figura 1: Representação esquemática de uma articulação equina adaptada do artigo «The Anatomy of a Joint». Duffy, 2019 - USEA

1.1.1. O osso subcondral

O osso subcondral é constituído por osso trabecular subcondral e placa óssea subcondral, que formam o osso peri-articular nas margens articulares. A placa óssea subcondral está ligada ao osso trabecular de um lado e a cartilagem calcificada marca a separação com a cartilagem articular do outro lado (Goldring, 2010). Esta camada óssea de constituição mais rígida que o osso trabecular tem como principal função o suporte estrutural do corpo. O osso trabecular, que apresenta mais elasticidade, é responsável pela absorção dos choques mecânicos devido as cargas do corpo em movimento, sem

sofrer deformação. Constituído por nervos e por uma rede vascular bem desenvolvidos, o osso subcondral também tem um papel importante na percepção da dor nas patologias articulares (Van Weeren, 2014).

1.1.2. A cartilagem

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo altamente específico que cobre o osso subcondral na extremidade dos ossos. Ela permite a lubrificação e fornece uma superfície lisa e macia que auxilia na transmissão das forças, reduzindo a fricção entre as diferentes partes da articulação (Fox *et al.*, 2009). É principalmente acelular, avascular, aneural e alifática e ainda constituída por uma matriz extracelular muito densa contendo algumas células, como os condrócitos. Esta matriz é constituída por água e fibras de colagénio maioritariamente do tipo II, contrariamente à maior parte do corpo que é constituído por colagénio do tipo I, hialuronato, proteoglicanos e outras proteínas, tendo como função a retenção da água. Isso permite a existência de alguma elasticidade, compensando a solidez e firmeza da rede de fibras de colagénio (Van Weeren *et al.*, 2001).

1.1.3. A cápsula articular

A cápsula articular é uma camada fibrosa densa ligada ao osso que envolve as articulações. Ela fornece uma estrutura de suporte passiva, pela limitação física dos movimentos e contribui para a estabilidade articular ativa, graças à presença de muitas terminações nervosas que indicam ao cérebro a posição precisa da articulação. (Ralphs *et al.*, 1994). A cápsula também permite a delimitação da cavidade articular em que estão contidas todas as outras estruturas (Van Weeren, 2016).

1.1.4. A membrana e o líquido sinovial

A membrana sinovial ou sinóvia é uma camada posicionada na face interna da cápsula articular até a sua inserção no osso e sobre o osso até o início da cartilagem articular (Danila, 2014). Esta camada é constituída por dois tipos de células: os sinoviócitos envolvidos na fagocitose e na pinocitose (macrófagos) e os sinoviócitos com função de liberação de proteínas (fibroblastos) (Frisbie, 2012). Estes últimos produzem lubrificina e hialuronato ou ácido hialurónico, uma macromolécula (glicosaminoglicano não sulfatado) que têm um papel maior na composição da matriz extracelular e do líquido sinovial nomeadamente a sua viscosidade. Ambas as células têm a capacidade,

principalmente em caso de patologia articular, de produzir citocinas, fatores de crescimento e mediadores da inflamação (Van Weeren, 2014). A membrana, muito fina, comporta entre uma a quatro camadas de células. Ela delimita a cavidade articular, que tem grande importância na homeostasia da articulação e na constituição do líquido sinovial (Frisbie, 2012).

O líquido sinovial é formado por ácido hialurônico, lubrificina e outros metabolitos libertados pelas células sinoviais num fluido semelhante ao plasma sanguíneo ultrafiltrado. (Tew et al., 1981). Além da sua principal função, que é a lubrificação da articulação para diminuir a fricção e o desgaste na cartilagem, o fluido permite o transporte de nutrientes necessários para a nutrição e a remoção dos produtos indesejáveis da cartilagem articular (Van Weeren, 2014).

1.2. A OSTEOARTRITE

1.2.1. Prevalência e etiopatogenia da doença

O termo de osteoartrite (OA) é utilizado para definir uma patologia degenerativa das articulações dos cavalos. Representa uma das maiores causas de perdas de bem-estar e de performances nos cavalos de desporto. (Goodrich *et al.*, 2006). A prevalência desta patologia varia dependendo do grupo de estudo e, principalmente, da idade. Um estudo que envolveu 50 cavalos de corrida, entre 2 e 9 anos (período de carreira desportiva), demonstrou que um terço dos cavalos (entre os 2 a 3 anos) já apresentavam lesões articulares e mais concretamente na cartilagem. Este estudo revelou ainda que a proporção e a gravidade das lesões aumentam significativamente por volta dos 6 anos e o treino intensivo influencia o aparecimento precoce da OA (Neundorf *et al.*, 2010). De forma mais geral, cerca de 50% dos cavalos desenvolvem OA depois dos 15 anos e mais de 80% depois dos 30 anos (Baker *et al.*, 2022). Além disto, estima-se que mais de 60% das claudicações são relacionadas com OA (McIlwraith *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que a condição corporal do animal está relacionada com a quantidade de biomarcadores da inflamação no plasma libertada, a prostaglandina E2 plasmática (PL-PGE2). Associado ao nível de exercício físico, o aumento do *score* de condição corporal, favorece a inflamação intra-articular o que induz um aumento da prevalência de OA (Pearson *et al.*, 2018).

A OA é uma patologia complexa e multifatorial, que se caracteriza pela degradação progressiva da cartilagem articular (perda de proteoglicanos e de colagénio do tipo II e pelo aumento da atividade dos condrócitos), muitas vezes acompanhada de modificações ósseas (osteófitos) e da inflamação dos tecidos vizinhos (Ribitsch *et al.*, 2021). A OA tem uma multitude de etiologias como traumas articulares, conformações anormais, sobrecarga articular, genética, idade ou ainda a nutrição. Pode

ser separada em dois processos patofisiológicos principais ligados entre eles: os processos primários, envolvendo a inflamação da cápsula articular (capsulite) e da membrana sinovial (sinovite) com a degradação bioquímica das estruturas de suporte (tipo I), ou secundários, que implicam trauma relevante com lesão da cartilagem articular e dano físico na estrutura de suporte (tipo II) (Ross et al., 2010; McIlwraith *et al.*, 2016). O primeiro tipo de OA, também designada de OA primária, está relacionada com a repetição crônica de microtraumas, com predisposições sistêmicas do indivíduo ou ainda com as repercussões do uso mecânico da articulação (sobrecarga, idade ou exercício físico intenso) (Labens *et al.*, 2012). Ainda é incerto se o processo de sinovite ou capsulite ocorre em primeiro lugar, principalmente pela intervenção de células como os macrófagos sinoviais e os condrócitos, ou se é secundário à degradação da cartilagem e do osso subcondral (Menarim *et al.*, 2020). A inflamação da cápsula e da membrana sinovial conduz a libertação de mediadores catabólicos e pro inflamatórios como as citocinas (Interleucina-1 β , Interleucina 6, fator de necrose tumoral α), a prostaglandina E2, o óxido nítrico, e os neuro-peptídeos que estimulam a degradação da matriz extracelular da cartilagem articular (Baccarin *et al.*, 2022). Por outro lado, a OA secundária pode ser causada por dano físico direto na cartilagem ou no osso subcondral, como em casos de fraturas articulares, artrites traumática ou séptica ou ainda osteocondrose (Labens *et al.*, 2012). Em condições normais, as cargas mecânicas do corpo podem ser absorvidas pela matriz extracelular cartilaginosa sem causar danos nem reação inflamatória (Baccarin *et al.*, 2022). No entanto, a ulceração da cartilagem e fraturas intra-articulares podem ser causados por choques repetidos e assim desencadear enfraquecimento da cartilagem. Este processo vai conduzir a diminuição do poder de absorção da articulação e a libertação dos mediadores da dor e da inflamação até evoluir para sinovite e/ou capsulite reforçando a degradação da cartilagem (McIlwraith *et al.*, 2016).

Os processos etiológicos, estreitamente interligados, chegam ao ponto comum de fibrilação, erosão e fissuras na cartilagem articular (Goodrich *et al.*, 2006), mas também podem criar osteólise, osteófitos, espessamento da membrana sinovial ou ainda esclerose do osso subcondral (Carmona *et al.*, 2009). Na figura 2 estão sistematizadas as etapas da degradação da cartilagem articular que resultam do trauma da articulação no cavalo (McIlwraith *et al.*, 2012)

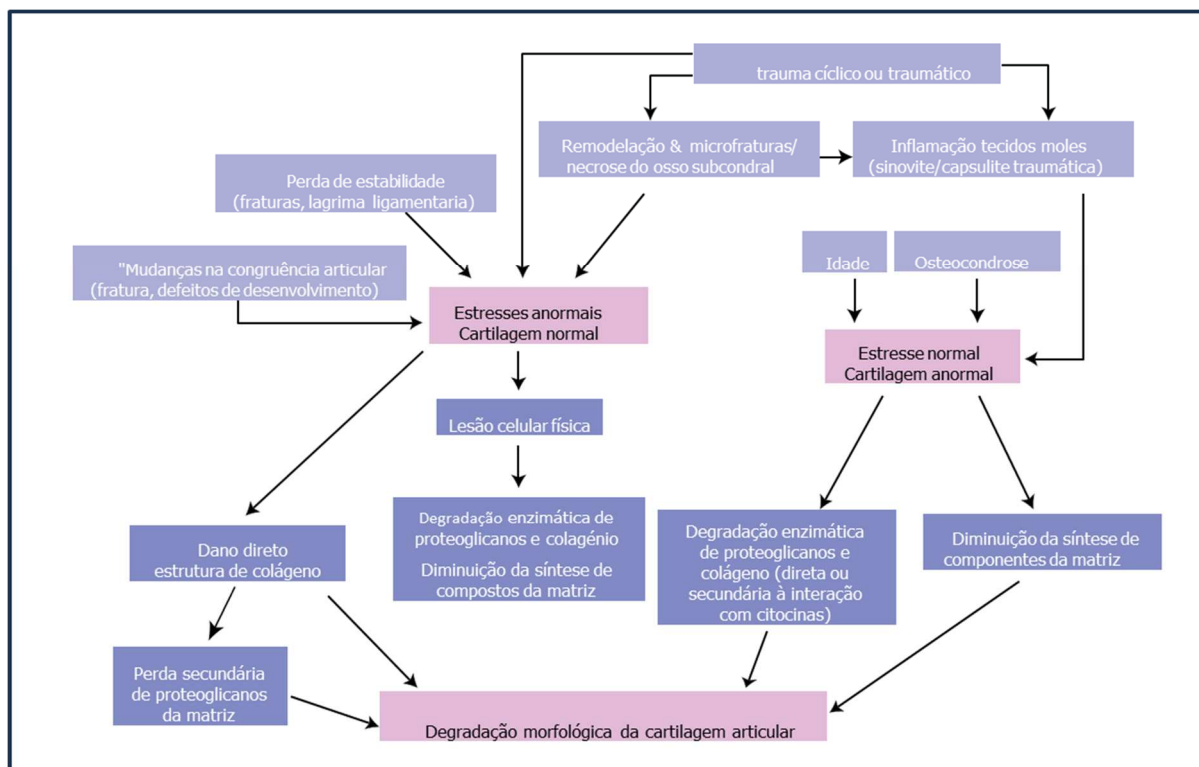


Figura 2: Etapas para degradação da cartilagem articular resultando de um trauma na articulação do cavalo (adaptado de McIlwraith *et al.*, 2012)

1.2.2. Sinais clínicos e diagnóstico

A osteoartrite apresenta uma multitude de sinais clínicos, tais como a dor articular. Ela induz a diminuição da capacidade de movimento e, de facto, a claudicação do animal com severidade variável, em função da severidade da OA e a perda de performances (De Souza, 2016). O cavalo afetado pode demonstrar reação à palpação e ser positivo ao teste de flexão. A articulação pode também apresentar-se quente, tumefata ou com crepitações (McIlwraith *et al.*, 2016).

A suspeita de OA pode ser surgir primeiramente no exame geral, acompanhado pelo exame locomotor do animal pelos sinais descritos anteriormente. Neste caso, é aconselhado avançar para a segunda etapa: os exames complementares de diagnóstico, nomeadamente imagiológicos (De Souza, 2016).

O exame radiográfico é essencial para se obterem mais informações sobre as estruturas ósseas atingidas e a importância das lesões na articulação. Em caso de OA pode ser observada a presença de novas formações ósseas irregulares (osteófitos), a lise ou esclerose do osso subcondral e a redução do espaço articular. No entanto, no raio X pode ser impossível de detetar modificações subtis no osso ou nos tecidos moles (Baccarin *et al.*, 2022; Bertoni *et al.*, 2020). Para compensar essa lacuna, a utilização

de ecografia apresenta-se como indispensável para avaliar o aspeto e o eventual espessamento da cartilagem (Nocera *et al.*, 2022). A ecografia permite também de revelar a quantidade e o aspeto do líquido sinovial, o estado da superfície articular e do osso subcondral ou ainda a presença de vascularização ou anomalias da cápsula articular (Yamada *et al.*, 2020). A outra vantagem do exame ecográfico reside na sua capacidade de mostrar sinais de OA mais precocemente contrariamente ao exame radiográfico, que apenas evidencia modificações ósseas (processos mais tardios da patologia) (Andersen *et al.*, 2022).

Além destas duas técnicas, outras ferramentas de diagnóstico como a ressonância magnética (RM) e a tomografia computadorizada (TC), respetivamente no estudo dos tecidos moles e dos tecidos ósseos da articulação, surgem e são de grande utilidade no diagnóstico da OA (McKnight, A. 2012). Elas tornam possíveis a avaliação transversal, tridimensional e com precisão muito superior das estruturas articulares (Bertoni *et al.*, 2020). A RM, comparativamente a ecografia, fornece um maior contraste dos tecidos o que permite visualizar melhor as lesões na cartilagem, quantificar a efusão do líquido e analisar precisamente a presença e a importância de osteófitos. (Olive *et al.*, 2010). A RM também pode fornecer imagens relevantes para detetar anomalias na superfície do osso e particularmente do osso subcondral (Smith *et al.*, 2016).

A última técnica, aTC, também pode ser utilizada no diagnóstico da osteoartrite e ser complementar às outras técnicas. Tem a capacidade de revelar lesões ósseas extremamente pequenas e com a ajuda de produtos de contraste, evidenciar lesões cartilaginosas indetetáveis pelos outros exames imagiológicos (Honkanen *et al.*, 2023). No entanto, o estudo de Bolz *et al.* (2023), revelou que as performances de diagnóstico entre a ressonância magnética e a tomografia computadorizada eram muito parecidas. A diferença residia numa maior especificidade da TC (66%) relativamente a RM (52%), mas uma maior sensibilidade da RM com 66% contra 53% da TC. Infelizmente, essas técnicas ainda não são muito utilizadas neste contexto devido a necessidade de exposição a radiação, e de representar um tempo e um custo muito relevante (Li *et al.*, 2016).

1.2.3. Tratamentos convencionais

No manejo da OA equina, o tratamento deve ter como objetivo a combinação da diminuição dos sintomas com a resolução das causas primárias da patologia (McIlwraith *et al.*, 2012). Um dos sinais clínicos mais importante é a dor. Ela provem da inflamação e é responsável pela claudicação e pela limitação da função locomotora. Para aliviar essa dor, o tratamento mais usado continua a ser os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) sistémicos. (Van Weeren *et al.*, 2010). Os AINES, além de

reduzirem a inflamação, têm função analgésica e antipirética. Eles funcionam principalmente graças ao bloqueio das enzimas de ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) que são responsáveis pela produção de prostaglandinas. Estas moléculas são mediadores químicos que têm um papel muito importante na cascada da resposta inflamatória (Jacobs *et al.*, 2022). Mas este tipo de medicamento tem como limite a não seleção entre os dois tipos de ciclo-oxigenases. De facto, as duas enzimas têm função muito diferentes: a COX-1 está relacionada com a homeostasia corporal, a proteção da mucosa gástrica e dos rins enquanto que a COX-2 é essencial na produção das prostaglandinas, que induzem o processo inflamatório (Clegg, P., & Booth, T., 2000). Na inibição da COX-1, os AINES impedem o efeito benéfico que tem no organismo, criando um desequilíbrio na homeostasia do organismo e o aparecimento de efeitos adversos, principalmente gástricos e renais (Goodrich *et al.*, 2006; Flood *et al.*, 2022).

Alguns estudos tendem a promover o uso de AINES seletivos para COX-2 no âmbito de reduzir os efeitos indesejáveis (Ziegler *et al.*, 2017). Contudo, os AINES não seletivos continuam a ser muito mais prescritos no contexto das patologias articulares e principalmente, a fenilbutazona e a flunixina meglumina, tendo menor custo e maior tempo de ação (Jacobs *et al.*, 2022).

Além do manejo sistémico da dor, podem ser usadas substâncias intra-articulares no tratamento da OA. Alguns estudos mostram que o uso de anti-inflamatórios esteroides têm efeitos benéficos para aliviar a inflamação e a dor intra-articular (Souza, M. V. 2016). No entanto, os esteroides têm de ser usados com muitas precauções relativamente a dosagem e a técnica podendo, no caso contrário, causar danos irreversíveis a cartilagem. Explica-se pelas diferenças de pH entre o produto e a cartilagem. É aconselhado usa-los combinados com ácido hialurónico, polissulfato de glicosaminoglicano e recetores antagonistas da proteína interleucina 1 para minimizar os riscos (Goodrich *et al.*, 2006; Labens *et al.*, 2012).

Em alguns casos muitos avançados da patologia e quando a abordagem terapêutica já não se mostra suficiente, o tratamento da OA também pode ser cirúrgico. O objetivo principal é a estabilização pela imobilização total da articulação. A técnica é chamada de artrodese e visa dar mais conforto e qualidade de vida ao cavalo (Delco *et al.*, 2009; Chapman *et al.*, 2019).

Para completar as terapias precedentes, o manejo do cavalo incluindo a regulação da atividade e o controlo da condição corporal, também representam uma parte importante do processo (Labens *et al.*, 2012).

2. O PLASMA RICO EM PLAQUETAS E SEU USO NA OSTEOARTRITE

O PRP é um conceito que apareceu pelos hematologistas dos anos 70 no âmbito do tratamento da

trombocitopénia na medicina humana. Dez anos mais tarde, começaram a usar essa técnica para cirurgia maxilofacial antes de a exportar para o tratamento de muitas outras patologias, incluído os transtornos músculo-esqueléticos, devido as suas propriedades de proliferação celular e anti-inflamatórias (Cao *et al.*, 2021). Nos anos 90 surgiram os primeiros estudos na área dos equídeos, mas só em 2003 é que surgiu o primeiro documento. O PRP continua a ser, atualmente, um assunto de grande atenção na investigação científica (Garbin *et al.*, 2019).

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PREPARAÇÃO

O PRP é uma preparação biológica autóloga e está incluído nas técnicas de medicina regenerativa (Miranda *et al.*, 2019). Baseia-se na ação dos fatores de crescimento e de moléculas contidas no plasma sanguíneo, nos leucócitos e nas plaquetas. Os efeitos clínicos parecem depender principalmente da concentração destas moléculas no local de lesão (Ionita *et al.*, 2014).

O plasma sanguíneo é um componente do sangue, representando cerca de 55% do volume total, de cor amarelada, que pode ser considerado como o fator líquido do sangue. Ele permite o transporte homogéneo dos atores responsáveis pela função fisiológica do sangue: os glóbulos vermelhos (eritrócitos), os glóbulos brancos (leucócitos) e os trombócitos (plaquetas). É composto por 91-92% de água e o restante são sólidos nomeadamente as substâncias coagulantes, principalmente fibrinogénio, proteínas plasmáticas, como albumina e globulina que mantêm o equilíbrio osmótico, eletrólitos que asseguram o pH, como sódio, potássio, bicarbonato, cloreto e cálcio e, por fim, imunoglobulinas que permitem de combater infeções acompanhadas por outras moléculas como enzimas, hormonas e vitaminas (Mathew *et al.*, 2023).

As plaquetas são pequenos fragmentos de células, anucleares e de forma discoide, e resultam da fragmentação dos megacariócitos. Após serem libertadas na corrente sanguínea, elas participam ativamente na cascata de coagulação e no processo de inflamação. Elas também têm um papel fundamental na homeostasia, na integridade vascular e na regeneração celular graças à secreção dos fatores de crescimento contidos nos grânulos- α (Ghoshal *et al.*, 2014).

Na literatura, tendo com objetivo comum a obtenção de uma solução concentrada em plaquetas, são descritas várias técnicas relativamente ao processo de preparação de PRP para utilização. Existem três tipos principais, como os procedimentos automatizados, semi-automatizado e o manual. Os procedimentos automatizados estão reportados na medicina veterinária, como uma das técnicas utilizadas até aos dias de hoje. Os processos semi-automatizados, existentes sobre a forma de *kits* prontos para ser utilizados, contendo um dispositivo, um recipiente estéril para colheita de sangue e

um dispositivo para centrifugação. Apresentam a vantagem de ser de simples utilização, mas têm um custo mais elevado (Garbin *et al.*, 2021). O último tipo de procedimento, sem dúvida o mais usado, é o manual. Os estudos que relatam inúmeros protocolos para este tipo de técnica e muitas vezes com opiniões divergentes relativamente as condições de centrifugação temperatura, tempo, velocidade de centrifugação. No entanto, quase todos os estudos tendem a convergir em processos gerais (Cao *et al.*, 2021).

Neste ponto, é importante de colocar em evidência que os procedimentos de colheita, de preparação e de armazenamento, têm de ser realizados em condições ótimas. Sabendo que a fonte principal de contaminação da preparação provem da pele do animal, da flora ou do trato respiratório superior do clínico, é essencial de realizar o processo completa com uma assepsia rigorosa, num ambiente o mais limpo possível e sem correntes de ar descontroladas (Camargo Garbin *et al.*, 2021).

O primeiro passo reside na colheita de sangue do próprio animal usando agulhas 16 Gauge (G) em tubos contendo citrato de sódio 3.2% ou em bolsas de sangue contendo citrato/fosfato/dextrose/adenina como anticoagulante (Pereira *et al.*, 2013). O volume de sangue colhido dependerá da quantidade de PRP desejada tendo em conta que a quantidade de sangue será dividida entre 5 a 10 vezes para o volume final de PRP obtido (Dhurat *et al.*, 2014).

Depois da colheita, a amostra necessita de ser sujeita a centrifugação, que permite a separação das moléculas em função do peso molecular graças a rotação em alta velocidade (Stephenson, F. H. 2016). Alguns artigos evocaram a possibilidade de usar a sedimentação, mas revelou-se menos eficiente por aumento da contaminação e diminuição da concentração em plaquetas (Segabinazzi *et al.*, 2021). Além disso, o tempo necessário da técnica torna o processo muito mais demorado e pode potencialmente provocar o dano das componentes biológicas do sangue (Dhurat *et al.*, 2014). Segundo Miranda *et al.* (2019), pode ser utilizado um protocolo de dupla centrifugação com uma primeira de 10 minutos com força de 120xg com o objetivo de separar os glóbulos vermelhos e uma segunda com força de 240xg e uma duração também de 10 minutos para concentrar as plaquetas, minimizando assim a destruição celular (Miranda *et al.*, 2019; Dhurat *et al.*, 2014). Após esta segunda centrifugação, o sobrenadante, que representa plasma pobre em plaquetas, é descartado para obtenção do produto final enriquecido (Pereira *et al.*, 2013). Na figura 3, está esquematizado o processo acima descrito de preparação de PRP.

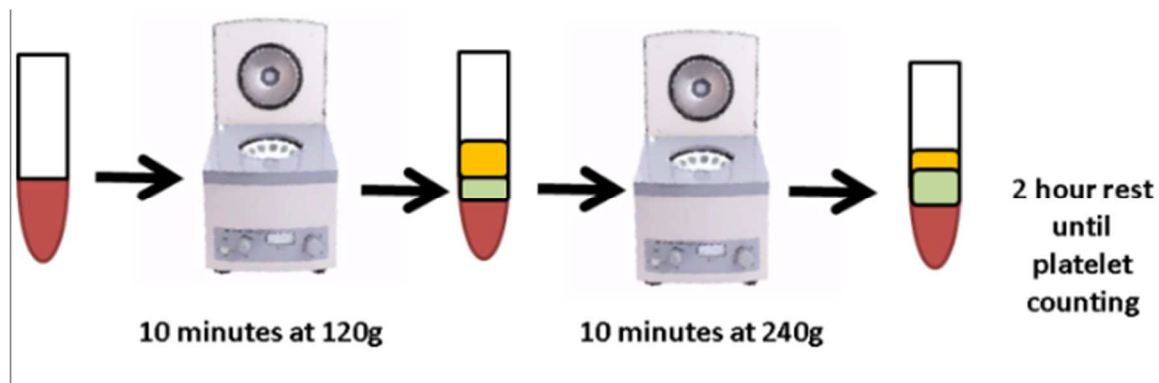


Figura 3: Protocolo de preparação do PRP (adaptado do artigo de Miranda *et al.*, 2019)

Relativamente ao armazenamento, foi demonstrado que o Plasma Rico em Plaquetas podia ser conservado a temperatura ambiente várias horas sem risco de dano graças a ação do anticoagulante. No entanto, é sempre preferível usar o produto quando está pronto para evitar contaminação. (Hauschild *et al.*, 2016).

A qualidade mínima do PRP para ter efeitos terapêuticos satisfatórios ainda é muito controversa e necessita mais investigação. O valor base da concentração de plaquetas no sangue dos equinos situa-se acerca das 150000 plaquetas/ μL (Holanda *et al.*, 2013) e estima-se que a concentração mínima do PRP de três vezes ou mais superior a concentração fisiológica parece suficiente para mostrar melhoria dos sinais clínicos (Rinnovati *et al.*, 2016; Cole *et al.*, 2010). Em caso de concentração demasiada elevada, o PRP pode ter efeito contraprodutivo e reforçar o processo inflamatório. A notar que além das condições de preparação, a qualidade do PRP é um processo autólogo e também pode ser influenciada por muitos fatores individuais como a idade, a raça, o género ou o estado de saúde do próprio cavalo (Miranda *et al.*, 2018).

2.2. AÇÃO E APLICAÇÃO NA OSTEOARTRITE

2.2.1. Protocolos de tratamento

Após o seguimento do plano de preparação descrito anteriormente, é importante realizar a assepsia do local de injeção. A contaminação bacteriana apresenta-se com o maior risco de complicação desta técnica o que implica a desinfeção cuidadosa das mãos e o uso de luvas de procedimentos (Guermazi *et al.*, 2020). Depois de ser realizada a tricotomia da zona, deve ser realizada uma lavagem com solução antisséptica (solução de clorexidina 2% ou povidona-iodada 10%) durante 3 minutos seguida por irrigação com álcool a 70%. O processo deve ser repetido 3 vezes com objetivo de obter uma

esterilidade de nível cirúrgico (Baima *et al.*, 2008). O ambiente também deve ser controlado, privilegiando áreas limpas e minimizando as correntes de ar. O operador pode prosseguir, usando luvas estéreis, com a recolha estéril do PRP numa seringa. No cavalo em estação e sob sedação, a preparação de PRP é administrada via intra-articular no local da lesão com uma agulha 21G. A quantidade da preparação com PRP a administrar depende do tipo de lesão e da articulação afetada. O recurso a ecografia para guiar a administração é recomendado, permitindo uma maior precisão e um menor risco de lesão secundária. Existem muitos protocolos que preconizam uma só injeção, mas um estudo de Carmona, (2006) indica a realização de três injeções, com duas semanas de intervalo entre cada uma, para maximizar o efeito terapêutico (Carmona, J.U. 2006).

A discussão relativamente a ativação das plaquetas previamente à administração continua a ser controversa. Na prática, e numa parte importante da literatura, não é geralmente mencionada a ativação plaquetária. No entanto, muitos estudos recentes demonstram a importância deste processo (Cavallo *et al.*, 2016). O objetivo principal é o aumento da concentração dos fatores de crescimento derivados de plaquetas BB (PDGF-BB) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) contido no PRP (Fukuda *et al.*, 2020). Pode ser realizada graças a várias técnicas como a congelação múltipla, o uso de trombina autóloga ou bovina a 5% ou o uso de derivados cálcio como CaCl₂. Segundo Fukuda *et al.* (2020), a dupla congelação da solução apresenta-se como a técnica ótima para o uso de PRP criopreservado, tendo apresentado melhores resultados que a congelação simples, mas sem diferença com três ou mais congelações. A congelação faz com que os grânulos das plaquetas rebentem, proporcionando assim a libertação dos fatores de crescimento. Por outro lado, a melhor técnica para o uso instantâneo de PRP parece ser a trombina autóloga combinada com Cálcio (Fukuda *et al.*, 2020). Este conceito está confirmado por Textor *et al.* (2012), que adiciona a eficiência da trombina bovina (5U/mL) e reforça que o uso de CaCl₂ (23mM) se apresenta como um meio mais económico e eficaz da ativação plaquetária com mais de 80% de PDGF ativado. A utilização de trombina bovina, mesmo sendo mais eficiente, é proveniente de outro organismo e requer uma atenção particular na dose, pois o seu uso pode criar reações inflamatórias indesejáveis (Textor & Tablin, 2012). A trombina tem como função a polimerização do fibrinogénio em fibrina e a desgranulação dos grânulos interplaquetários, enquanto que o CaCl₂ serve como antagonista do anticoagulante. Estes processos vão permitir a formação de um gel que favorece a adesão e a ação do PRP no local da lesão. (A. Yamada *et al.*, 2012).

2.2.2. Mecanismo de ação

O funcionamento do PRP assenta principalmente numa concentração três a cinco vezes superior das

plaquetas no local da lesão do que no sangue circulante (Ribitsch *et al.*, 2021). A ação das plaquetas baseia-se em vários mecanismos e, mais particularmente, na ação de diferentes fatores de crescimento. A ativação das plaquetas permite a desgranulação dos grânulos α que contém a maior parte desses fatores, nomeadamente o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que estimula a proliferação das células, a síntese da matriz extracelular e é essencial para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese) e reparação dos tecidos. Outro fator que desempenha um papel crucial na modulação da inflamação, na regulação da reparação tecidual e também favorece a produção de colágeno e a diferenciação das células estaminais é denominado de transformador beta 1 (TGF- β 1). O terceiro fator é o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) que está envolvido na reparação de tecidos moles e ossos, estimulando a proliferação de fibroblastos e células endoteliais, e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que estimula a angiogénese, necessária para fornecer nutrientes e oxigénio às áreas lesionadas. A lista pode ser finalizada com os fatores de crescimento insulínico (IGF), epidérmico (EGF) ou hepatocístico (HGF) que auxiliam na regeneração dos tecidos ao estimular o crescimento e a diferenciação das células (Tabela 1). Estes fatores ligam-se a recetores específicos que vão iniciar o processo de cicatrização. As plaquetas também libertam citoquinas e fatores bioativos como adenosina difosfato e trifosfato (ADP e ATP), íões de cálcio, histamina, serotonina e dopamina, que são ativos na modulação celular e na regeneração tecidual. (Cole *et al.*, 2010; Textor *et al.*, 2011; Silva, V. P, 2017). A matriz de fibrina criada pela polimerização do fibrinogénio devida a ativação plaquetária prévia como explicada anteriormente ou à ação da tromboplastina endógena também tem um papel importante na retenção das plaquetas responsáveis pela secreção das substâncias cicatrizantes (Wes Sutter, 2007). Este fenómeno de desgranulação intervém depois de 10 minutos após o processo de coagulação fisiológica que acontece no momento da administração do PRP. Na primeira hora, cerca de 90% dos fatores de crescimento ativos são libertados e outros continuam a ser secretados durante os 5 a 10 dias seguintes (Lichtarska & Sokol, 2021; Wes Sutter, 2007).

Fator de crescimento	Ação
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula a produção de fibroblastos e de colagénio - Estimula a angiogénese - Estimula o fator de crescimento transformador-β1 (TGF-β1) - Regula positivamente a quimiotaxia e a síntese de proteoglicanos.
Fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-β1)	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula a proliferação de fibroblastos - Reforça a formação da matriz extracelular e a viabilidade celular - Regula a inflamação - Suprime os efeitos mediados por interleucina 1 na síntese de proteoglicanos na cartilagem - Estimula a angiogénese
Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF)	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula angiogénese - Favorece a proliferação dos mioblastos - Estimula a produção de colagénio
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	<ul style="list-style-type: none"> - Reforça a proliferação das células do endotélio vascular - Estimula angiogénese - Favorece a chegada das células inflamatórias
Fator de crescimento insulínico (IGF)	<ul style="list-style-type: none"> - Reforça proliferação celular - Aumenta a produção de matriz extracelular
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula angiogénese - Promove a diferenciação celular - Estimula a proliferação das células mesenquimais e epiteliais.
Fator de crescimento hepatocístico (HGF)	<ul style="list-style-type: none"> - Reforça a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) - Estimula angiogénese

Tabela 1: Funções dos diferentes fatores de crescimento contidos nas plaquetas adaptado de Cole *et al.*, (2010) e de Carmona *et al.*, (2011)

2.3. OUTRAS APLICAÇÕES DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Além da aplicação do PRP nas patologias articulares, está a ser utilizado em outras áreas da medicina veterinária. Muitos estudos relatam a eficiência do uso do PRP no tratamento das lesões tendinosas. Este tipo de patologias necessita normalmente um tempo para a regeneração dos tecidos e este tempo de recuperação apresenta-se reduzido acerca dos 30% graças a uma maior produção de colagénio e de glicosaminoglicanos, uma melhor produção e organização celular do tendão. Segundo os mesmos princípios, o tratamento das lesões ligamentosas e musculares parecem igualmente apresentar resultados muito positivos (Garbin *et al.*, 2021; Kunze *et al.*, 2019; Silva, V. P, 2017).

Mais controverso, o uso do PRP aplica-se também no tratamento das feridas dos cavalos. Elas podem ter uma cicatrização morosa e complexa, ainda aumentada em presença de diabetes. Como já foi descrito, os FC têm um papel fundamental na cascata de cicatrização e o estudo de Carter *et al.*, (2003), demonstrou um efeito positivo significativo do PRP na histologia de uma ferida num cavalo (Carter *et al.*, 2003; Wes Sutter, 2007).

No contexto das patologias ósseas, como as fraturas, os testes *in-vitro* e *in-vivo* parecem também ter influência na produção, proliferação e migração das células ósseas como os osteoblastos e na estimulação do colagénio (Bacevich *et al.*, 2024).

Em éguas, estudos demonstram resultados muito promissores nos casos de endometrite. O uso de PRP antes ou depois da inseminação artificial permite a redução dos fluidos e das células polimorfonucleares. Favorece também a diminuição da enzima COX-2 e PGE-2 responsável pelo desenvolvimento da inflamação na endometrite (Garbin *et al.*, 2021).

Além da função curativa, o PRP pode ter um efeito anti-inflamatório muito importante graças à inibição ou na regulação de citocinas como TNF- α , IL-1, e COX-2, moléculas que induzem o processo inflamatório. O uso preventivo, pela redução da inflamação e da dor permite ao animal de manter um exercício físico reduzindo o risco de lesão (Garbin *et al.*, 2021; Ríos *et al.*, 2015)

3. RESULTADOS E PERSPECTIVAS FUTURAS DO PRP

O uso do plasma rico em plaquetas nas patologias articulares e, mais particularmente, no tratamento da OA ainda é recente e está a ser estudada com uma atenção crescente. No entanto, muitos estudos relativamente aos resultados clínicos já foram publicados. Um estudo de 2015, incluindo 123 casos demonstra efeitos positivos em 46,7% e sem efeito aparente em 43,3%, no contexto clínico. No quadro experimental, 73% apresentam efeitos benéficos contra 7,9% negativos (Brossi *et al.*, 2015). Outro

trabalho de Bertone *et al.*, (2014), investigou o efeito do PRP num grupo de 40 cavalos onde administraram em metade dos cavalos PRP e outra metade solução salina (grupo controlo). Relativamente ao exame locomotor, foi observado uma melhoria significativa do movimento comparativamente ao grupo de controlo, após 7 e 14 dias. Os cavalos apresentaram também menos dor a palpação, menos inchaço e, no exame químico da articulação, as células inflamatórias do líquido sinovial estavam diminuídas. Na imagiologia, não foram observadas mudanças significativas, após 7 e 14 dias. Finalmente, os animais foram seguidos pelos tutores durante 52 semanas e foram reportados na maioria dos casos a melhoria no conforto e a diminuição da dor. O estudo concluiu a eficiência do PRP no tratamento da OA (Bertone *et al.*, 2014).

Paralelamente, os clínicos recomendam muitas vezes um programa de reabilitação adaptado à lesão contraída pelo animal que conduzirá, sem dúvida à melhoria na recuperação e diminuição do tempo de convalescença (Silva, V. P. 2017).

No entanto, existem também muitos estudos que relatam uma diferença notável entre os resultados dos ensaios *in vitro* e a realidade do tratamento *in vivo*, no contexto clínico. (Moraes *et al.*, 2015). A interpretação dos estudos realizados pode ser subjetiva, nomeadamente por causa de falta de grupos controlo com tratamentos placebo, medidas de diagnóstico subjetivas ou períodos de avaliação curtos (Brossi *et al.*, 2015). Além disso, o perfil biológico do PRP depende da preparação, que varia em diferentes estudos. A variabilidade genética e fisiológica dos pacientes equinos ou dos sujeitos experimentais aumenta a inconsistência da eficácia do PRP entre os indivíduos (Garbin *et al.*, 2021). Os resultados dos estudos convergem e reforçam a necessidade de realizar mais investigações com objetivo de aprofundar os conhecimentos e os mecanismos de ação do PRP. O interesse e os fundos investidos na procura aumentaram consideravelmente nestes últimos anos e, proporcionalmente a eles, as áreas de utilização alargam-se ao longo do tempo (Dhillon *et al.*, 2012).

4. CONCLUSÃO

A utilização do PRP na OA equina oferece uma perspectiva extremamente interessante no contexto do tratamento veterinário, pois pode representar uma mudança significativa na forma como abordamos e tratamos essa condição debilitante em cavalos. Quando aplicado em áreas afetadas pela OA, o PRP pode ajudar a reduzir a inflamação, promover a regeneração do tecido cartilaginoso danificado e aliviar a dor associada. No entanto, apesar dos benefícios evidentes, é importante reconhecer que ainda há aspectos a serem explorados e refinados no uso do PRP para a OA equina. Por exemplo, é necessário compreender melhor os mecanismos exatos pelos quais o PRP promove a regeneração tecidual e determinar os protocolos de tratamento ideais, incluindo a dosagem e a frequência das administrações. Além disso, estudos de acompanhamento a longo prazo são essenciais para avaliar a durabilidade dos resultados obtidos com o tratamento com PRP e identificar possíveis complicações ou efeitos adversos a longo prazo.

Em suma, embora a utilização do PRP na OA equina represente um avanço promissor, mas ainda há espaço para mais investigação e desenvolvimento nesta área. Com o contínuo avanço da ciência e da tecnologia veterinárias, podemos esperar que o uso do PRP se torne ainda mais refinado e amplamente adotado como uma ferramenta eficaz no tratamento da OA e de outras patologias em cavalos.

5- BIBLIOGRAFIA:

1. Abu-Seida, A. M. (2015). Regenerative Therapy for Equine Osteoarthritis: A Concise review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(9), 500–508. <https://doi.org/10.3923/ajava.2015.500.508>
2. Andersen, C., Griffin, J. F., Jacobsen, S., Østergaard, S., Walters, M., Mori, Y., & Lindegaard, C. (2022). Validation of ultrasonography for measurement of cartilage thickness in the equine carpus. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 63(4), 478–489. <https://doi.org/10.1111/vru.13085>
3. Baccarin, R. Y. A., Seidel, S. R. T., Michelacci, Y. M., Tokawa, P. K. A., & Oliveira, T. M. (2022). Osteoarthritis: a common disease that should be avoided in the athletic horse's life. *Animal Frontiers*, 12(3), 25–36. <https://doi.org/10.1093/af/vfac026>
4. Bacevich, B., Smith, R., Reihl, A., Mazzocca, A., & Hutchinson, I. (2024). Advances with Platelet-Rich Plasma for Bone Healing. *Biologics*, Volume 18, 29–59. <https://doi.org/10.2147/btt.s290341>
5. Baima, J., & Isaac, Z. (2007). Clean versus sterile technique for common joint injections: a review from the physiatry perspective. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 1(2). <https://doi.org/10.1007/s12178-007-9011-2>
6. Baker, M. E., Lee, S., Clinton, M., Hackl, M., Castanheira, C., Peffers, M. J., & Taylor, S. E. (2022). Investigation of MicroRNA biomarkers in equine distal interphalangeal joint osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15526. <https://doi.org/10.3390/ijms232415526>
7. Bertone, A. L., Ishihara, A., Zekas, L. J., Wellman, M. L., Lewis, K. B., Schwarze, R. A., Barnaba, A. R., Schmall, M. L., Kanter, P. M., & Genovese, R. L. (2014). Evaluation of a single intra-articular injection of autologous protein solution for treatment of osteoarthritis in horses.

American Journal of Veterinary Research, 75(2), 141–151.
<https://doi.org/10.2460/ajvr.75.2.141>

8. Bertoni, L., Jacquet-Guibon, S., Branly, T., Legendre, F., Desancé, M., Mespoulhes, C., Melin, M., Hartmann, D. J., Schmutz, A., Denoix, J., Galéra, P., Demoor, M., & Audigié, F. (2020). An experimentally induced osteoarthritis model in horses performed on both metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints: Technical, clinical, imaging, biochemical, macroscopic and microscopic characterization. *PLoS One*, 15(6), e0235251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235251>
9. Bogers, S. H. (2018). Cell-Based therapies for joint disease in veterinary Medicine: what we have learned and what we need to know. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00070>
10. Bolz, N., Sánchez-Andrade, J. S., Torgerson, P. R., & Bischofberger, A. S. (2023). Diagnostic performance of multi-detector computed tomography arthrography and 3-Tesla magnetic resonance imaging to diagnose experimentally created articular cartilage lesions in equine cadaver stifles. *Animals*, 13(14), 2304. <https://doi.org/10.3390/ani13142304>
11. Brossi, P. M., Moreira, J. J., Machado, T. S., & Baccarin, R. Y. (2015). Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0403-z>
12. Cao, Y., Zhu, X., Zhou, R., He, Y., Wu, Z., & Chen, Y. (2021). A narrative review of the research progress and clinical application of platelet-rich plasma. *Annals of Palliative Medicine*, 10(4), 4823–4829. <https://doi.org/10.21037/apm-20-2223>
13. Carmona, J., López, C., & Giraldo, C. (2011). Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino.

Archivos De Medicina Veterinaria, 43(1), 1–10. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2011000100002>

14. Carmona, Jorge & Prades Robles, Marta. (2009). Pathophysiology of osteoarthritis. *Comp Equine.*, 28–40.
15. Carmona J.U. (2006). *Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse* [Thesis]. University of Barcelona.
16. Carter, C. A., Jolly, D. G., Worden, C. E., Hendren, D. G., & Kane, C. J. (2003). Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and Molecular Pathology*, 74(3), 244–255. [https://doi.org/10.1016/s0014-4800\(03\)00017-0](https://doi.org/10.1016/s0014-4800(03)00017-0)
17. Cavallo, C., Roffi, A., Grigolo, B., Mariani, E., Pratelli, L., Merli, G., Kon, E., Marcacci, M., & Filardo, G. (2016). Platelet-Rich plasma: The choice of activation method affects the release of bioactive molecules. *BioMed Research International*, 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/6591717>
18. Chapman, H., Richardson, D. W., & Ortved, K. F. (2019). Arthrodesis of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints to treat osteoarthritis in 17 horses. *Veterinary Surgery*, 48(5), 850–857. <https://doi.org/10.1111/vsu.13236>
19. Clegg, P., & Booth, T. M. (2000). Drugs used to treat osteoarthritis in the horse. *In Practice*, 22(10), 594–603. <https://doi.org/10.1136/inpract.22.10.594>
20. Cole, B. J., Seroyer, S. T., Filardo, G., Bajaj, S., & Fortier, L. A. (2010). Platelet-Rich plasma: Where are we now and where are we going? *Sports Health*, 2(3), 203–210. <https://doi.org/10.1177/1941738110366385>
21. Danila, M. I. (2014). Biology of normal joint and evaluation of the joint including clinical, imaging, and pathologic evaluation. In *Elsevier eBooks* (pp. 1912–1919). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386456-7.04301-x>

22. De Souza, M. V. (2016a). Osteoarthritis in horses - Part 1: relationship between clinical and radiographic examination for the diagnosis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150024>
23. De Souza, M. V. (2016b). Osteoarthritis in horses - Part 2: a review of the intra-articular use of corticosteroids as a method of treatment. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150025>
24. Dhillon, R. S., Schwarz, E. M., & Maloney, M. D. (2012). Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Research & Therapy*, 14(4), 219. <https://doi.org/10.1186/ar3914>
25. Dhurat, R., & Sukesh, M. S. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 7(4), 189. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734>
26. Flood, J., & Stewart, A. J. (2022). Non-Steroidal Anti-Inflammatory drugs and associated toxicities in horses. *Animals*, 12(21), 2939. <https://doi.org/10.3390/ani12212939>
27. Fox, A. M., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
28. Frisbie, D. D. (2012). Synovial Joint Biology and Pathobiology. In *Elsevier eBooks* (pp. 1096–1114). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0867-7.00078-8>
29. Fukuda, K., Kuroda, T., Tamura, N., Mita, H., & Kasashima, Y. (2020). Optimal activation methods for maximizing the concentrations of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 in equine platelet-rich plasma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 82(10), 1472–1479. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0167>
30. Garbin, L. C., López, C., & Carmona, J. (2021). A critical overview of the use of Platelet-Rich plasma in equine medicine over the last decade. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.641818>

31. Ghoshal, K., & Bhattacharyya, M. (2014). Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *the Scientific World Journal/TheScientificWorldjournal*, 2014, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/781857>
32. Goldring, M. B., & Goldring, S. R. (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1), 230–237. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x>
33. Goodrich, L. R., & Nixon, A. J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *Veterinary Journal/ the Veterinary Journal*, 171(1), 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.07.008>
34. Guermazi, A., Koppel, A. J., Murakami, A. M., Diaz, L. E., Crema, M. D., & Roemer, F. W. (2020). Possible complications from intra-articular corticosteroid injections in the hip and knee. An illustrative report. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28, S498. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.02.780>
35. Hauschild, G., Geburek, F., Gosheger, G., Eveslage, M., Serrano, D., Streitbürger, A., Johannlückens, S., Menzel, D., & Mischke, R. (2016). Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *BMC Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0920-4>
36. Honkanen, M. K. M., Mohammadi, A., Moller, N. C. T., Ebrahimi, M., Xu, W., Plomp, S., Pouran, B., Lehto, V., Brommer, H., Van Weeren, P. R., Korhonen, R. K., Töyräs, J., & Mäkelä, J. (2022). Dual-contrast micro-CT enables cartilage lesion detection and tissue condition evaluation ex vivo. *Equine Veterinary Journal*, 55(2), 315–324. <https://doi.org/10.1111/evj.13573>
37. Ionita, J., Kissich, C., Gottschalk, J., Einspanier, A., Köller, G., Winter, K., & Brehm, W. (2014). Comparison of cellular and growth factor concentrations in equine Autologous Conditioned

- Plasma® (ACP) and manually prepared Platelet Rich Plasma (mPRP). *Pferdeheilkunde*, 30(2), 195–201. <https://doi.org/10.21836/pem20140208>
38. Jacobs, C. C., Schnabel, L. V., McIlwraith, C. W., & Blikslager, A. T. (2022). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal*, 54(4), 636–648. <https://doi.org/10.1111/evj.13561>
39. Jones, P. C., Delco, M., Beard, W. L., Lillich, J. D., & Desormaux, A. (2009). A limited surgical approach for pastern arthrodesis in horses with severe osteoarthritis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 22(04), 303–308. <https://doi.org/10.3415/vcot-08-03-0027>
40. Joscilin Mathew, Parvathy Sankar, Matthew Varacallo. (2021). *Physiology, blood plasma*. StatPearls.
41. Kunze, K. N., Hannon, C. P., Fialkoff, J. D., Frank, R. M., & Cole, B. J. (2019). Platelet-rich plasma for muscle injuries: A systematic review of the basic science literature. *World Journal of Orthopedics*, 10(7), 278–291. <https://doi.org/10.5312/wjo.v10.i7.278>
42. Labens, R., Schramme, M., & Barr, A. R. (2012). Orthopaedics 1. Diagnosis of lameness/diseases of joints and bones. In *Elsevier eBooks* (pp. 309–328). <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-2801-4.00015-8>
43. L.C. Holanda, S.G. Vaz, T.L.A.C. Almeida, S.K.M. Melo, L.B.Lira, F.L. Santos, E.W. Rêgo, M.N. Teixeira. (2013). *Variáveis hematológicas de equinos (Equus caballus, Linnaeus, 1958) da raça Mangalarga Marchador*.
44. Li, Q., Amano, K., Link, T. M., & Benjamin, C. (2016). Advanced imaging in osteoarthritis. *Sports Health*, 8(5), 418–428. <https://doi.org/10.1177/1941738116663922>
45. Lichtarska, A. M., & Sokol, M. M. (2021). The mechanism of action of platelet-rich plasma – composition analysis and safety assessment. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 34(4), 212–217. <https://doi.org/10.2478/cipms-2021-0038>

46. McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., & Kawcak, C. E. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & Joint Research*, 1(11), 297–309. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.111.2000132>
47. McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., Kawcak, C. E., Goodrich, L. R., & Van Weeren, P. R. (2016). Equine Joint Disease: Present and future directions in research. In *Elsevier eBooks* (pp. 376–398). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-5969-9.00027-9>
48. McKnight, A. L. (2012). Introduction to equine MRI. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(10), 655–661. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.08.209>
49. Menarim, B. C., Gillis, K. H., Oliver, A., Ngo, Y., Werre, S. R., Barrett, S. H., Rodgerson, D. H., & Dahlgren, L. A. (2020). Macrophage activation in the synovium of healthy and osteoarthritic equine joints. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568756>
50. Miranda, S., Costa, M., Rebouças, N., Ramos, M., Lessa, D. a. B., & De Alencar, N. X. (2019). Protocols for preparation of platelet rich plasma (PRP) in Quarter Horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39(8), 614–621. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5883>
51. Miranda, S., De Mello Costa, M. F., Senna, J. J., Frapoint, J. C., De Alencar, N. X., & Lessa, D. a. B. (2018). Effects of Breed/Species and gender on platelet concentration in autologous platelet rich plasma. *Acta Veterinaria*, 68(4), 474–483. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0038>
52. Moraes, a. P., Moreira, J. J., Brossi, P. M., Machado, T. S., Michelacci, Y. M., & Baccarin, R. Y. (2015). Short- and long-term effects of platelet-rich plasma upon healthy equine joints: clinical and laboratory aspects. *The Canadian Veterinary Journal*.
53. Neundorf, R. H., Lowerison, M. B., Cruz, A., Thomason, J. J., McEwen, B. J., & Hurtig, M. B. (2010). Determination of the prevalence and severity of metacarpophalangeal joint osteoarthritis in Thoroughbred racehorses via quantitative macroscopic evaluation. *American Journal of Veterinary Research*, 71(11), 1284–1293. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.11.1284>

54. Nocera, I., Puccinelli, C., Sgorbini, M., Bagnoli, E., & Citi, S. (2022). Ultrasonography of the Metacarpal/Tarsal-Phalangeal joints in healthy racehorses: normal appearance, Breed-Related and Age-Related features. *Animals*, *12*(19), 2657. <https://doi.org/10.3390/ani12192657>
55. Olive, J., D'Anjou, M., Alexander, K., Laverty, S., & Theoret, C. L. (2010). COMPARISON OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING, COMPUTED TOMOGRAPHY, AND RADIOGRAPHY FOR ASSESSMENT OF NONCARTILAGINOUS CHANGES IN EQUINE METACARPOPHALANGEAL OSTEOARTHRITIS. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *51*(3), 267–279. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2009.01653.x>
56. Pearson, W., Wood, K., Stanley, S. A., & MacNicol, J. L. (2018). Exploring relationships between body condition score, body fat, activity level and inflammatory biomarkers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *102*(4), 1062–1068. <https://doi.org/10.1111/jpn.12893>
57. Pereira, R. S., Zacarias, G. V. F., Cantarelli, C., Corrêa, M., Da Silva, G. B., Barbosa, A. L. T., Brass, K. E., & De La Côte, F. D. (2013). Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. *Ciência Rural*, *43*(6), 1122–1127. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782013005000052>
58. Ralphs, J. R., & Benjamin, M. (1994). The Joint Capsule: Structure, Composition, Ageing and Disease. *Journal of Anatomy*, *184*, pt 3.
59. Ribitsch, I., Oreff, G. L., & Jenner, F. (2021). Regenerative medicine for equine musculoskeletal diseases. *Animals*, *11*(1), 234. <https://doi.org/10.3390/ani11010234>
60. Rinnovati, R., Romagnoli, N., Gentilini, F., Lambertini, C., & Spadari, A. (2015). The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *58*(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0226-3>
61. Ríos, D., López, C., & Carmona, J. (2015). Evaluation of the anti-inflammatory effects of two platelet-rich gel supernatants in an in vitro system of cartilage inflammation. *Cytokine*, *76*(2), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.008>

62. Ross, M., & Dyson, S. (2011). Diagnosis and management of lameness in the horse. In *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/c2009-0-50774-x>
63. Segabinazzi, L., Podico, G., Rosser, M. F., Nanjappa, S. G., Alvarenga, M. A., & Canisso, I. F. (2021). Three manual noncommercial methods to prepare equine Platelet-Rich plasma. *Animals*, *11*(6), 1478. <https://doi.org/10.3390/ani11061478>
64. Smith, A. D., Morton, A. J., Winter, M., Colahan, P. T., Ghivizzani, S. C., Brown, M. P., Hernández, J. A., & Nickerson, D. M. (2016). MAGNETIC RESONANCE IMAGING SCORING OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF POST-TRAUMATIC OSTEOARTHRITIS IN THE EQUINE CARPUS. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *57*(5), 502–514. <https://doi.org/10.1111/vru.12369>
65. Stephenson, F. H. (2016). Centrifugation. In *Elsevier eBooks* (pp. 431–438). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802211-5.00012-6>
66. Tew, W. P., & Hotchkiss, R. N. (1981). Synovial fluid analysis and equine joint disorders. *Journal of Equine Veterinary Science*, *1*(5), 163–170. [https://doi.org/10.1016/s0737-0806\(81\)80030-5](https://doi.org/10.1016/s0737-0806(81)80030-5)
67. Textor, J. A., Norris, 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. *American Journal of Veterinary Research*, *72*(2), 271–278. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.2.271>
68. Textor, J. A., & Tablin, F. (2012). Activation of equine Platelet-Rich plasma: Comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Veterinary Surgery*, *41*(7), 784–794. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950x.2012.01016.x>
69. Textor, J. A., & Tablin, F. (2013). Intra-Articular use of a Platelet-Rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. *Veterinary Surgery*, *42*(5), 499–510. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950x.2013.12015.x>
70. Silva, V.P. (2017). Tratamentos à base de plasma rico em plaquetas em equinos. Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

71. Van Weeren, P. R., & Brama, P. a. J. (2001). Physiology and pathology of the equine joint. *Pferdeheilkunde*, 17(4), 307–318. <https://doi.org/10.21836/pem20010401>
72. Van Weeren, P. R., & De Grauw, J. C. (2010). Pain in osteoarthritis. *the Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 26(3), 619–642. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2010.07.007>
73. Van Weeren, R. (2014). Joint physiology. In *Elsevier eBooks* (pp. 213–222). <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-4771-8.00011-9>
74. Wes Sutter. (2007). *PRP: Platelet Rich Plasma*. Ohio State University.
75. Yamada, A., De Carvalho, A. M., Oliveira, P., Felisbino, S., Queiroz, D., Watanabe, M., Hussni, C., & Alves, A. L. G. (2012). 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/Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 64(2), 323–332. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352012000200011>
76. Yamada, A. L. M., De Medeiros Pinheiro, M., Marsiglia, M. F., Hagen, S. C. F., Baccharin, R. Y. A., & Silva, L. (2020). Ultrasound and clinical findings in the metacarpophalangeal joint assessment of show jumping horses in training. *Journal of Veterinary Science*, 21(3). <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e21>
77. Ziegler, A., Fogle, C., & Blikslager, A. T. (2017). Update on the use of cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 250(11), 1271–1274. <https://doi.org/10.2460/javma.250.11.1271>