

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS SOUSA

**USO DE QUITOSANA, HIDROXIAPATITA E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) NA CICATRIZAÇÃO DE CARTILAGEM
TROCLEAR EM COELHOS**

Francisco Alipio de Sousa Segundo

SOUSA – PARAÍBA – BRASIL
2016

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS SOUSA

**USO DE QUITOSANA, HIDROXIAPATITA E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) NA CICATRIZAÇÃO DE CARTILAGEM
TROCLEAR EM COELHOS**

Francisco Alipio de Sousa Segundo

Orientador: Prof. Dr. Adílio Santos de Azevedo

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Sousa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel Medicina Veterinária.

SOUSA – PARAÍBA – BRASIL

Março de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca do IFPB Campus Sousa

S456u

SEGUNDO, Francisco Alipio de Sousa.

Uso de quitosana, hidroxiapatita e plasma rico em plaquetas (PRP) na cicatrização de cartilagem troclear em coelhos / Francisco Alipio de Sousa - Sousa, 2016.

37 p.

Orientador: Dr. Adílio Santos de Azevedo.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária IFPB – Sousa.
– Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba.

1 Terapia Celular. 2 Biomateriais. 3 Cartilagem Troclear
4 Coelhos. I Título.

IFPB / BC

CDU – 619:617



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS SOUSA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: USO DE QUITOSANA, HIDROXIAPATITA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS
(PRP) NA CICATRIZAÇÃO DE CARTILAGEM TROCLEAR EM COELHOS

Autor: Francisco Alípio de Sousa Segundo

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Sousa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovado pela Comissão Examinadora em: / /

Prof. DSc. Adílio Santos de Azevedo – Orientador
IFPB – Campus Sousa

Profa. DSc. Ana Lucélia de Araújo
IFPB – Campus Sousa

Profa. MSc. Lisanka Ângelo Maia
IFPB – Campus Sousa

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCISCO ALIPIO DE SOUSA SEGUNDO – nascido em Pombal, PB, em 30 de agosto de 1992, filho de Francisco Alipio de Sousa e Claubete Ferreira Lourenço de Sousa. Em março de 2011, ingressou no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, no curso de Medicina Veterinária. Durante o curso foi bolsista de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBICT), nos anos de 2012 e 2015, com conclusão da graduação em fevereiro de 2016.

"Pessoas quietas, possuem mentes barulhentas."

Stephen Hawking

Aos meus pais,

Francisco Alipio de Sousa e Claubete
Ferreira, pelo amor e esforço para que esse
dia tão importante em minha vida fosse
alcançado.

Ao meu irmão, sua esposa e seu filho,
pela amizade e os momentos de alegria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Adílio Santos de Azevedo, pela dedicação e disposição em compartilhar seus conhecimentos acadêmicos e pessoais, os quais me servem de exemplo de caráter profissional e como cidadão.

Aos membros da banca examinadora, Professora Ana Lucélia de Araújo e Professora Lisanka Ângelo Maia, pela enorme paciência e pelo fundamental apoio dado ao desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos da graduação Paulo, Aldcejam, Ricardo, Jocélio, Edla, Morgana, Luis, Aline e tantos outros os quais passei momentos memoráveis e que sem as experiências e o convívio compartilhado, não seria quem sou hoje.

A todos os professores do IFPB, Campus Sousa com quem tive aula por todos os ensinamentos.

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indiretamente tenham contribuído para o êxito deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Cartilagem.....	14
2.2 Quitosana.....	16
2.3 Hidroxiapatita.....	17
2.4 Plasma Rico em Plaquetas.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Preparo da Quitosana.....	19
3.3 Preparo da Hidroxiapatita.....	20
3.4 Preparo do Plasma Rico em Plaquetas.....	20
3.5 Procedimento Cirúrgico.....	21
3.6 Avaliação Clínico-Ortopédica.....	23
3.7 Avaliação Radiográfica.....	23
3.8 Avaliação Histopatológica.....	24
3.9 Tratamento Estatístico.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Avaliação Clínico-Ortopédica.....	25
4.2 Avaliação Radiográfica.....	27
4.3 Avaliação Histopatológica.....	29

5 CONCLUSÃO.....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. – Avaliação clínico-ortopédica de coelhos submetidos a osteotomia femoral, grupo T e grupo C.....	26
Tabela 2. – Avaliação de índice de reação de cicatrização óssea subcondral com base em radiografias de ambos os membros (grupos) dos animais.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. - Ambiente onde se localizavam as gaiolas (A). Gaiolas onde eram alocados os animais (B).....	19
Figura 2. - Realização de osteotomia femoral (A). Tampão retirado da tróclea femoral (B).....	22
Figura 3. - Colocação de hidroxiapatita no defeito ósseo (A). Adição de PRP com auxílio de seringa estéril na região do defeito ósseo (B). Colocação do implante de quitosana no defeito ósseo (C).....	23
Figura 4. – Radiografia sete dias de PO de ambos os membros. Local do defeito ósseo (setas).....	28
Figura 5. – Radiografia 45 dias de PO de ambos os membros. Local do defeito ósseo (setas).....	29
Figura 6. – Avaliação histopatológica grupo T, presença do implante de biomateriais (setas) circundado por tecido conjuntivo (círculos) Coloração com eosina e hematoxilina. Objetiva 4x.....	30
Figura 7. – Avaliação histopatológica grupo T, presença do implante de biomateriais (seta) circundado por tecido conjuntivo (círculo) Coloração com eosina e hematoxilina. Objetiva 4x.....	30

USO DE QUITOSANA, HIDROXIAPATITA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA CICATRIZAÇÃO DE CARTILAGEM TROCLEAR EM COELHOS

RESUMO – A capacidade de cicatrização e reparação da cartilagem é bastante limitada, essa particularidade faz com que lesões a esse tecido se mostrem como verdadeiros desafios para a sua resolução. A utilização de terapia celular e biomateriais são práticas promissoras para a reparação de afecções em diversos tecidos. O objetivo do presente estudo foi de avaliar a capacidade da quitosana, hidroxiapatita e plasma rico em plaquetas em promover a cicatrização de cartilagem troclear em coelhos. Foram utilizados doze coelhos, de ambos os sexos, pesando em média $1,7 \pm 0,4918$ kg, o grupo controle (C) foi constituído pelos joelhos direitos de cada animal e o grupo tratamento (T) pelos joelhos esquerdos. Os animais foram submetidos a procedimento anestésico e cirúrgico, onde foi realizado defeito na tróclea de cada membro, com o grupo C não recebendo nenhum tipo de tratamento e o grupo T recebendo implante de quitosana, hidroxiapatita e plasma rico em plaquetas (PRP). Após o procedimento cirúrgico foi realizado acompanhamento clínico-ortopédico dos animais, avaliações radiográficas e histopatológicas também foram realizadas. Dois animais do grupo T e um animal do grupo C apresentaram claudicação, que cessou quatro dias depois do procedimento cirúrgico, nenhuma alteração clínica-ortopédica foi significativa. A avaliação radiográfica revelou ausência de reação óssea em 25% dos membros no grupo C e 33% no grupo T, reação óssea moderada em 67% no grupo C e 42% no grupo T e reação óssea intensa em 8% no grupo C e 25% no grupo T. Através da avaliação histopatológica pôde-se observar que no grupo T houve uma promoção da reparação da cartilagem, isso através da proliferação tecidual mais intensa, maior quantidade de neovascularização e atividade celular mais presente. A utilização de quitosana, hidroxiapatita e plasma rico em plaquetas promoveu um estímulo à reparação da cartilagem troclear em coelhos.

Palavras-Chave: Biomateriais; Osteotomia; Polímero; Reparação Tecidual; Terapia Celular.

CHITOSAN, HYDROXYAPATITE AND PLATELET-RICH PLASMA (PRP) USE ON HEALING TROCHLEAR CARTILAGE IN RABBITS

SUMMARY - The ability to heal and repair the cartilage is quite limited, this feature causes the damage to this tissue seems real challenges to solve. The use of cell therapy and biomaterials are promising practices for the repair of diseases in various tissues. The aim of this study was to evaluate the effect of chitosan, hydroxyapatite platelet-rich plasma to promote healing trochlear cartilage in rabbits. Twelve rabbits were used, of both sexes, weighing an average of 1.7 ± 0.4918 kg, control group (C) was made up of the right knees of each animal and the treatment group (T) by left knees. The animals were subjected to anesthesia and surgery, which was performed defect in the trochlea of each member with the C group not receiving any kind of treatment and the T group receiving implants of chitosan, hydroxyapatite and platelet-rich plasma (PRP). After the surgical procedure, orthopedic clinical monitoring of animals was performed, radiographic and histopathological evaluations were also performed. Two animals from group T and one from group C showed lameness, which ended four days after the surgery, no clinical-orthopedic change was significant. Radiographic evaluation revealed no bone reaction in 25% of members in group C and 33% in group T, moderate bone reaction in 67% in group C and 42% in group T and intense bone reaction by 8% in group C and 25 % in group T. By histopathological examination it was noted that in the group T was repair promotion of cartilage, this by more intense tissue proliferation, larger amount of neovascularization and more cellular activity. The use of chitosan, hydroxyapatite and platelet-rich plasma promoted a stimulus to repair the trochlear cartilage in rabbits. The use of chitosan, hydroxyapatite and platelet-rich plasma promoted a stimulus to repair the trochlear cartilage in rabbits.

Keywords: Biomaterials; Cell Therapy; Osteotomy; Polymer; Tissue Repair.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, todas as áreas médicas vêm passando por grandes avanços pautados em melhorias substanciais na cura de doenças que antes causavam aos pacientes grande desconforto, piorando dessa forma a qualidade de vida, ou mesmo levando os pacientes ao óbito (ALFORD et al., 2005).

Um dos principais responsáveis por tantos avanços é a interdisciplinaridade com outras áreas, por exemplo: as engenharias, informática, robótica, etc. Nesse contexto, a cirurgia em parceria com a engenharia de materiais formou uma área conhecida como engenharia de tecidos, o que tornou-se de fundamental importância para o tratamento de lesões orgânicas em tecidos específicos, que apresentam baixa capacidade de regeneração (OLSSON et al., 2008).

Dentre estes tecidos, podemos citar as cartilagens articulares, que mesmo com tantos avanços médicos, a lesão nessa estrutura apresenta-se como problema potencial aos cirurgiões, que devido a característica do tecido, provoca morbidade limitante nos pacientes (GOMOLL & MINAS, 2014).

A cartilagem articular possui uma capacidade de regeneração ou cicatrização bastante limitada, em lesões as quais não se tenha envolvimento do osso subcondral, o resultado será um lacuna vazia. Essa característica do tecido faz com que traumas ou doenças degenerativas nessa região sejam de difícil resolução (LIU et al., 2014).

Só nos EUA no ano de 2001, os gastos com um tipo de lesão articular conhecido como osteoartrite (AO) foi de 89 bilhões de dólares, que além dos gastos, estas lesões provocam um impacto profundo na qualidade de vida de pacientes portadores destas afecções (LEIGH et al., 2001).

Os tratamentos atuais para regeneração das cartilagens articulares podem ser conservativos ou cirúrgicos, porém não apresentam grande êxito, uma vez que o tecido lesado é substituído por tecido fibroso ou fibrocartilagem, que apresentam funções biomecânicas inferiores ao tecido cartilaginoso (GOMOLL & MINAS, 2014).

Apesar de existir várias formas terapêuticas cirúrgicas ou medicamentosas que podem ser utilizadas no tratamento das lesões em cartilagens articulares, os estudos científicos apontam que não existe nenhum modelo de tratamento ideal, que possa dessa forma curar completamente as afecções neste tecido (KREUZ et al., 2006).

Nos últimos anos, vem sendo crescente a utilização de terapias celulares e uso de biomateriais para auxiliar no processo de cura em diferentes tecidos, inclusive cartilagens articulares lesionadas. Dentre estas, o uso de quitosana, que é um biomaterial polimérico, vem merecendo destaque pelo seu poder de estimular a cicatrização e regeneração de vários tecidos orgânicos (KHOR & LIM, 2003).

A hidroxiapatita, classificada como cimento de fosfato de cálcio, é relatada como um biomaterial bastante utilizado, principalmente em lesões ósseas, devido a sua estrutura físico-química semelhante ao osso, servindo de componente para processos de osteocondução, nesse caso, promovendo arcabouço para crescimento cartilaginoso (LEGEROS, 2002).

Bem como a quitosana, o plasma rico em plaquetas (PRP) é outra alternativa no que se refere a terapias regenerativas teciduais, uma vez que além de fácil obtenção, também apresenta componentes peptídicos conhecidos como fatores indutores, que atuam no processo pró-inflamatório desencadeando a reparação em diversos tecidos (ARORA et al., 2010).

Apesar de resultados promissores quando utilizados separadamente o uso da associação de PRP, quitosana e hidroxiapatita na cicatrização de tecido ósseo ou cartilaginoso, não foi relatada em nenhuma literatura

Dessa forma, uma alternativa viável e que pode ser de excelente possibilidade para a cura de lesões em cartilagens articulares é a associação desses três componentes como PRP, quitosana e hidroxiapatita, utilizados em procedimentos cirúrgicos nas diversas afecções cartilaginosas, melhorando a qualidade de vida nos animais domésticos e humanos.

O presente trabalho, teve como objetivo, avaliar a regeneração da cartilagem articular troclear de coelhos pelo uso da associação de PRP, quitosana e hidroxiapatita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cartilagem

Por mais de dois séculos os distúrbios que comprometem a integridade da cartilagem articular são conhecidos como doenças preocupantes, até os dias atuais,

mesmo com toda a evolução da cirurgia moderna, essa problemática ainda representa um desafio para a medicina (CARNEIRO et al., 2013).

A cartilagem articular é uma forma especializada de tecido conjuntivo. Reveste as epífises dos ossos longos e tem como função absorver impactos e facilitar o deslizamento ósseo articular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Várias são as afecções que causam danos a esta estrutura e os tratamentos de reparo são inúmeros, porém nenhum tipo de tratamento restaura a integridade funcional adequada da cartilagem hialina.

A cartilagem articular é um tecido com características únicas, não possui inervação, irrigação sanguínea ou linfática, a complexidade da arquitetura desse tecido, proporciona o suporte e a distribuição de cargas impostas sobre as articulações, resultando em movimento praticamente sem atrito entre as extremidades ósseas, a função e localização do tecido o deixa susceptível a traumas ou microtraumas resultantes de anos de uso (GOMOLL & MINAS, 2014).

A capacidade de regeneração ou de cicatrização é bastante limitada nesse tecido, qualquer trauma que cause uma lesão, mesmo que não comprometa toda a espessura da cartilagem articular, resultará em ausência de tecido no local, felizmente esse tipo de trauma não leva a sinais clínicos, entretanto, uma lesão de espessura completa pode causar dor ou até mesmo levar a inutilização do membro acometido (ALFORD et al., 2005).

O acometimento do osso subcondral, em casos de lesão de toda a espessura da cartilagem, leva a produção de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso, esse tecido formado não dispõem das características do tecido original, comprometendo a estrutura e a função articular (SMITH et al., 2005).

O que é observado durante a fase de reparo é a predominância de colágeno tipo I ao invés de colágeno tipo II, que é o principal constituinte da cartilagem articular (MCILWRAITH, 2014). Dessa forma, a natureza do material de reparo é muito inferior no que se diz respeito a capacidade de absorver cargas biomecânicas, o que gera uma cicatrização não funcional da cartilagem (TRIPPEL & MANKIN, 1996).

Devido ao processo de cura da cartilagem articular cursar de forma pouco eficaz com os tratamentos existentes, vem sendo crescente o uso da medicina regenerativa para auxiliar no processo de reparo deste tecido (CAVALLO et al., 2014; MALMONGE & ZAVAGLIA, 1997). Essa área atua utilizando biomateriais

compatíveis com o meio orgânico, que podem ser inertes ou ativos. Também outro adjuvante nos processos regenerativos e que vem sendo muito explorado nos últimos anos, se destaca a utilização de terapia celulares.

2.2. Quitosana

Dentre os biomateriais utilizados para reparo de ossos e cartilagens, a quitosana merece destaque pela sua ampla utilização e possibilidade de estimular o reparo tecidual (FROHBERGH et al., 2012; PUPPI et al., 2010). É classificado como um polissacarídeo polimérico, obtido da desacetilação da quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante da natureza encontrado principalmente na carapaça de crustáceos (AZEVEDO et al., 2007).

Sua fórmula química (N-acetil-D-glicosamina) é similar à matriz extracelular dos diversos tecidos orgânicos, o que caracteriza como sendo biocompatível e bioativo (UENO et al., 2001). Sua ação cicatrizante e atuante na diferenciação celular deve-se pela sua capacidade de ativar os macrófagos a sintetizarem peptídeos indutores como fator beta transformador, fator de necrose tumoral e interleucinas 6 e 8, que estimulam o processo regenerativo (GORZELANNY et al., 2010; UENO et al., 2001).

Em um estudo *in vitro* conduzido por NEVES et al. (2011), utilizando quitosana para agregação de condrócitos, foi evidenciado que além das células ficarem viáveis, também produziam matriz extracelular em contato com o biomaterial. Outro estudo realizado por HAO et al. (2010), em que foram realizados defeitos na cartilagem articular do joelho em ovinos e tendo sido utilizado hidrogel de quitosana cobrindo o defeito, foi evidenciado resposta regenerativa, com os condrócitos sintetizando matriz extracelular no local da lesão.

A quitosana possui ação em diversos tecidos ainda sendo relatados resultados promissores com sua utilização para cicatrização de feridas cutâneas, e em diversas apresentações, como em gel, fio de sutura e como membrana (DIAS, 2012; HUAIXAN, 2013; MARTINS et al., 2013).

Os biomateriais podem ser utilizados de forma isolada ou ainda podem ser empregados de forma conjunta, chamados de compósitos, a associação de

quitosana com hidroxiapatita e gelatina levou a uma aceleração do processo de cicatrização de tecido ósseo (AZEVEDO, 2013).

2.3. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um dos fosfatos de cálcio mais pesquisados e empregados para reparação de tecido ósseo nas áreas da medicina humana, medicina veterinária e odontologia, isso devido a sua composição físico-química semelhante ao osso, representada pela seguinte fórmula química, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (AZEVEDO, 2013).

A semelhança entre a hidroxiapatita e o osso vem de sua composição, que basicamente é de cálcio e fósforo, a relação desses dois elementos é o que determina a solubilidade e densidade dos materiais, onde quanto menor a relação maior será a solubilidade e menor a densidade, a relação cálcio e fósforo da hidroxiapatita é de 1,67 (LEGEROS, 2002).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que esse tipo de implante atua como resíduo para que os osteoclastos absorvam o material para ser utilizados pelos osteoblastos, que são as células responsáveis pela produção dos componentes orgânicos da matriz óssea, ou seja, função de osteocondução, dessa forma potencializa o processo de osteogênese (AZEVEDO et al., 2012).

Um estudo conduzido com implantes de hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas em defeitos em fêmur de coelhos mostrou que o poder de estímulo para neoformação de tecido da quitosana é superior a hidroxiapatita, entretanto, isso não inviabiliza a utilização desse biomaterial (AZEVEDO et al., 2012).

2.4. Plasma Rico em Plaquetas

A utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) no reparo de vários tecidos orgânicos já é prática corriqueira em vários seguimentos da odontologia, medicina e medicina veterinária. Também vem sendo alvo de estudo a utilização desta prática na regeneração da cartilagem articular de humanos e animais (WU et al., 2007; ANITUA et al., 2007).

O PRP é a extração do plasma autólogo, o qual apresenta até 5 vezes mais plaquetas em relação ao sangue circulante, e que carrega alta concentração de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento hepatócito (HGF) e fator de crescimento transformador- β (β -TGF), ambos conhecidos por estimularem a regeneração tecidual (CARNEIRO et al., 2013; MARX, 2000).

Para se obter o PRP, o sangue é puncionado de uma veia calibrosa e em seguida passa por centrifugação, dependendo do protocolo que é utilizado e então de forma rápida e prática, obtém-se o produto rico em fatores indutores que atuam acelerando e favorecendo a regeneração dos tecidos e órgãos (KLEIN et al., 2011).

A utilização do PRP na medicina regenerativa representa uma terapia simplificada, de baixo custo financeiro e possibilita aplicações minimamente invasivas, por exemplo, caso seja aplicada diretamente na articulação (TSCHON et al., 2011).

Estudos in vitro indicam a possível capacidade proliferativa de condrócitos, pelo estímulo do PRP diretamente aplicado nas lesões em cartilagens articulares (CAVALLO et al., 2014). Em estudo realizado por CARNEIRO et al. (2013) em ovelhas, utilizando PRP diretamente em lesões cirúrgicas iatrogênicas na cartilagem troclear do joelho, foi observado a capacidade reparativa do tratamento com preenchimento da lesão por fibrocartilagem.

A literatura não dispõe de nenhum relato sobre o uso de plasma rico em plaquetas, quitosana e hidroxapatita de forma associada para cicatrização de tecidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 12 coelhos adultos, de ambos os sexos, raça Nova Zelândia, pesando em média $1,7 \pm 0,4918$ kg. O período de avaliação experimental foi de 4 meses. Cada animal era controle dele mesmo, onde um dos joelhos não foi tratado e

o outro foi tratado com associação de PRP, quitosana e hidroxiapatita, assim foram formados dois grupos a saber:

-Grupo C: grupo controle, que foi realizado uma lacuna óssea circular no meio da tróclea femoral direita, com 4 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade, não sendo adicionado nada à lesão;

-Grupo T: grupo tratamento, em que foi realizado a mesma lacuna óssea, porém na tróclea femoral esquerda, implantando-se na lesão o PRP associado a quitosana e hidroxiapatita;

Os animais passaram por período de adaptação de 21 dias antes do início da experimentação, e foram vermifugados com albendazol 10% na dose de 20 mg/Kg de peso vivo por via oral. Durante o período experimental, os animais foram alocados em gaiolas (Figura 1 B), dentro de ambiente protegido de sol e chuva (Figura 1 A), receberam ração balanceada comercial específica para coelhos, duas vezes ao dia e tiveram acesso a água potável à vontade.



Figura 1. - Ambiente onde se localizavam as gaiolas (A). Gaiolas onde eram alocados os animais (B).

3.2. Preparo da Quitosana

A solução polimérica foi preparada pela dissolução de 3 g de quitosana em 100 ml de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético glacial sob agitação magnética a 45° C por 2 h. Em seguida, a solução foi vertida em placas de petri e acondicionadas em ultra freezer a -70°C por 24 h. Em seguida o material foi colocado no liofilizador

por 72 h. Depois de liofilizados os arcabouços foram imersos em hidróxido de sódio a 1 M por 1 h e em seguida lavados com água destilada para retirada do excesso de hidróxido de sódio. A solução foi novamente imersa em água destilada, congelada em ultra freezer e liofilizada para obtenção dos arcabouços com pH próximo do neutro.

3.3. Preparo da Hidroxiapatita

O fosfato de cálcio foi obtido através de método de precipitação por via úmida que envolve uma reação de neutralização entre as soluções de ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de cálcio [$Ca(OH)_2$]. As quantidades das soluções foram estequiometricamente determinadas de acordo com o valor da relação atômica entre os átomos de cálcio e fósforo e adaptada pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO). Em seguida, o pó de $Ca(OH)_2$ foi adicionado a água deionizada, agitado e aquecido até atingir a temperatura de $80^\circ C$. A esta solução foi adicionada, lentamente, a solução H_3PO_4 , sob agitação constante. Após a completa mistura dos dois reagentes foi elevada a temperatura para $100^\circ C$ e mantida a agitação até atingir a viscosidade de uma pasta. A pasta cerâmica obtida foi seca a $110^\circ C$ por 24 horas e em seguida o produto foi desaglomerado, classificado em peneira 200 mesh para obtenção do pó e tratado termicamente com uma taxa de aquecimento de $20^\circ C$ por minuto e mantido a $1100^\circ C$ por 2 horas.

3.4. Preparo do Plasma Rico em Plaquetas

O protocolo de preparo do PRP foi realizado de acordo com o protocolo de WU et al. (2007). Imediatamente antes do procedimento operatório, foi coletado 3 mL de sangue puncionados da veia jugular de cada coelho, o sangue foi transferido para tubo de ensaio contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O sangue coletado foi submetido a uma primeira centrifugação durante 10 minutos com 1.800 rpm. Seguindo o protocolo, o plasma sobrenadante obtido da primeira centrifugação foi transferido para outro tubo de ensaio estéril e centrifugado por mais 10 minutos

numa rotação de 3.600 rpm. O PRP que estava localizado na porção inferior do tubo de ensaio foi puncionado com ajuda de agulha estéril e aplicado na lacuna troclear do grupo T.

3.5. Procedimento Cirúrgico

No pré-operatório cada animal foi submetido a jejum sólido por 6 horas e líquido por 2 horas. A tricotomia foi feita com aparelho de tricotomia e compreendeu ambos joelhos, com ampla margem para o campo operatório. Os animais foram tratados previamente ao procedimento operatório com antibiótico terapia profilática com ceftriaxona sódica a 20% na dose de 30 mg/Kg administrado 30 minutos antes da operação, com intuito de evitar processo infeccioso. Para o controle da dor, analgesia preemptiva, e também evitar processo inflamatório exacerbado, foi administrado pela via IM, momentos antes do procedimento cirúrgico, meloxicam na dose de 0,2 mg/kg, seguindo nos dois dias subsequentes 0,1 mg/kg. A medicação pré-anestésica foi constituída de acepromazina 1% na dose de 0,2 mg/Kg por via intramuscular (IM) e anestesia com tiletamina associada ao zolazepam a 10% na dose de 15 mg/kg (IM). Também foi realizada anestesia epidural lombo-sacra, na dose total de 0,3 ml/kg, com mistura farmacológica de lidocaína 2% associado a xilazina a 2% e morfina a 1% nas doses de 0,22 ml/kg, 1,5 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente.

A anti-sepsia das áreas operatórias foi realizada com solução alcoólica de clorexidina 0,5%. Após a delimitação da área operatória com panos de campo, no grupo C, foi realizada uma incisão cutânea parapatelar lateral do joelho direito, seguida de artrotomia com exposição da articulação. Seguindo o procedimento, foi confeccionado uma lacuna óssea circular com broca trefina medindo 4 mm de diâmetro e 3 mm de comprimento. Após a confecção do orifício e retirada de tampão (Figuras 2 A e B), foi realizada a capsulorrafia com pontos "Wolf" separados com fio náilon cirúrgico 2-0. Prosseguiu-se com redução do espaço morto do subcutâneo utilizando categute cromado 3-0 com padrão de sutura intradérmica e dermorrafia utilizando náilon cirúrgico 3-0 e padrão de sutura em "Wolf" separado.

No grupo T, foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico que o grupo C, porém o joelho operado foi o esquerdo, e a lacuna óssea confeccionada foi preenchida com PRP, quitosana e hidroxiapatita (Figuras 3 A, B e C).

Nos primeiros dez dias de pós-operatório (PO) foi feita anti-sepsia da ferida cirúrgica com solução fisiológica a 0,9% e bactrovet spray até a remoção dos pontos externos.

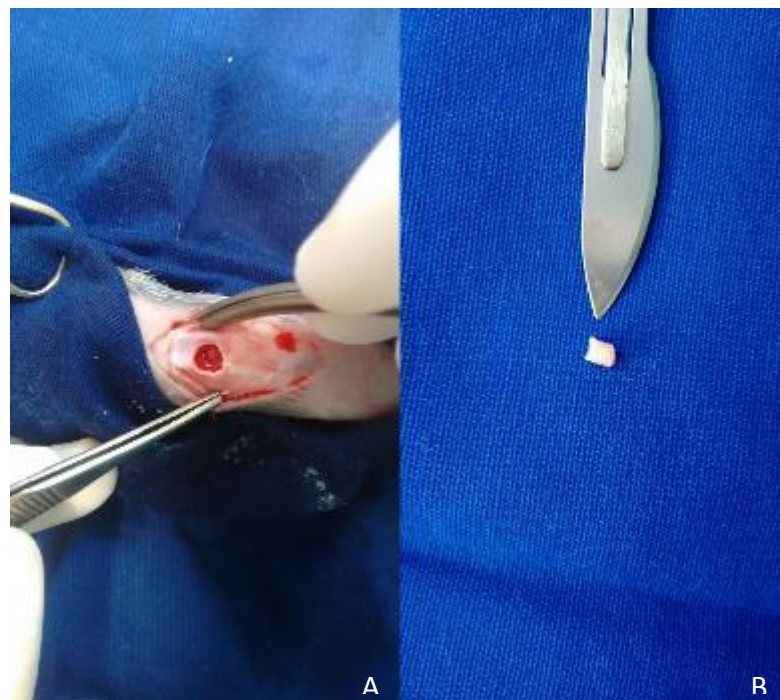


Figura 2. - Realização de osteotomia femoral (A).
Tampão retirado da tróclea femoral (B).



Figura 3. - Colocação de hidroxiapatita no defeito ósseo (A). Adição de PRP com auxílio de seringa estéril na região do defeito ósseo (B). Colocação do implante de quitosana no defeito ósseo (C).

3.6. Avaliação Clínico-Ortopédica

Os animais foram avaliados diariamente durante os primeiros 10 dias de PO até a remoção dos pontos cirúrgicos externos. Após esse período, os animais foram avaliados duas vezes por semana durante todo período experimental. A avaliação foi do processo deambulatório dos animais em piso plano áspero (presença de claudicação), inspeção e palpação dos membros em busca de presença de dor e avaliar atrofia muscular do grupo muscular quadríceps do membro operado e comparado com o membro contralateral.

3.7. Avaliação Radiográfica

Foram realizados exames radiográficos nas projeções craniocaudal (CC) e lateromedial (LM) dos joelhos operados em dois momentos, 7 dias após o procedimento cirúrgico e 45 dias após o procedimento cirúrgico. A avaliação baseou-se na presença de lesões osteoartríticas, derrame sinovial e presença de osteófito/entesiófito periarticular e foram comparados entre si, de forma a

acompanhar a evolução durante o período experimental. Com as radiografias de 45 dias após o procedimento cirúrgico, foram atribuídos índices de reação tecidual.

3.8. Avaliação Histopatológica

Após 60 dias de PO os animais foram abatidos através de dissociação do córtex cerebral por concussão e subsequente sangria. Os dois joelhos de cada animal foram avaliados comparativamente entre si e entre os grupos. Após serem removidos os dois membros posteriores, foi realizada a coleta dos joelhos e fixados em formalina tamponada a 10 % durante 10 dias. Os joelhos, após a fixação, foram descalcificados com uma solução de ácido clorídrico a 6% durante período de 5 dias. Em seguida os fragmentos foram desidratados por passagens em soluções de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e álcool absoluto). Logo após, o material foi lavado em água corrente e foram incluídos em parafina líquida e, posteriormente, cortados em fatias transversais de 5 μ m de espessura compreendendo a interface cartilagem/osso/lacuna óssea preenchida ou não pelo tratamento de acordo com o grupo experimental. Seguindo o processo, os materiais teciduais foram montados em lâminas de vidro. De cada bloco, foram obtidas quatro lâminas, sendo estas submetidas às técnicas de hematoxilina-eosina. Para a avaliação histopatológica foram relevantes achados de reparação observado o tipo de tecido existente (fibroso, fibrocartilagem e/ou cartilagem hialina), regularidade da superfície articular, celularidade existente e adesão tecidual aos biomateriais.

3.9. Tratamento Estatístico

Os dados de escores atribuídos as radiografias passaram por estatística descritiva sendo os dados expressos em percentuais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação Clínico-Ortopédica

Os resultados referentes a avaliação clínico-ortopédica realizada nos animais estão descritos na Tabela 1.

Durante a avaliação do processo deambulatório pôde-se perceber que três animais apresentaram claudicação, dois deles do membro do grupo T e um do membro do grupo C. A claudicação dos animais perdurou um período de quatro dias após o procedimento cirúrgico, sendo observado posteriormente a normalidade do processo de deambulação.

A evolução do quadro de claudicação não foi observada no presente estudo, sendo o aparecimento do sinal clínico associado a possível resposta individual dos animais, o quadro transitório não causou influência clínica negativa aos animais.

Os animais acometidos de claudicação em poucos dias voltaram ao processo de deambulação normal, fato que promoveu a manutenção da musculatura, que não sofreu nenhum efeito prejudicial durante o período experimental, além de sugerir que a cartilagem articular possuía capacidade de suportar as forças biomecânicas empregadas sobre ela.

Segundo YAMADA e colaboradores (2012) em estudo com PRP aplicado intralesional e intra-articular em articulações lesionadas de equinos, os animais que apresentaram claudicação após a realização cirúrgica do trauma, mostraram melhora clínica evidente após a segunda aplicação do PRP.

As lesões de cartilagem articular que levam ao aparecimento de sintomas geralmente são afecções progressivas, ou seja, tendem a causar uma degeneração da articulação, levando a um agravamento dos sinais clínicos e consequente perda funcional do membro (ALFORD et al., 2005), o que não foi observado no presente estudo.

A aplicação intra-articular de plasma rico em plaquetas é relatada como terapia com altas taxas de sucesso na redução de claudicação em equinos (CARMONA et al., 2009; LOPEZ-VIDRIERO et al., 2010; CARMONA et al., 2011).

A busca por reação dolorosa revelou que nenhum dos animais apresentaram esse reflexo em qualquer um dos membros. A ausência de sinal doloroso no membro provavelmente está associado a utilização de medicamento anti-

inflamatório de forma correta no pós operatório, o que evitou o desenvolvimento de doença articular, ou lesão progressiva de cartilagem.

Tabela 1. – Avaliação clínico-ortopédica de coelhos submetidos a osteotomia troclear.

Animal	Claudicação	Reação dolorosa	Atrofia muscular
1	Ausência	Ausência	Ausência
2	Ausência	Ausência	Ausência
3	Ausência	Ausência	Ausência
4	Membro tratamento	Ausência	Ausência
5	Ausência	Ausência	Ausência
6	Ausência	Ausência	Ausência
7	Ausência	Ausência	Ausência
8	Membro controle	Ausência	Ausência
9	Ausência	Ausência	Ausência
10	Ausência	Ausência	Ausência
11	Ausência	Ausência	Ausência
12	Membro tratamento	Ausência	Ausência

A osteoartrite pode ser induzida por lesão na cartilagem, essa patologia apesar de ser classificada como doença articular não inflamatória cursa com uma inflamação de pequena intensidade, durante o exame clínico de um paciente acometido com essa afecção a reação dolorosa pode ser observada durante a palpação, junto com outros sinais como limitação da amplitude na flexão e extensão do membro, crepitação e aumento de volume articular (MORISHIN FILHO & RAHAL, 2008).

Uma vez avaliados os membros dos animais, não foi observada atrofia muscular quando comparados os membros do grupo C com o grupo T. A atrofia do grupo muscular quadríceps, no caso de doença articular do membro pélvico, geralmente é observada como sinal clínico em animais acometidos, e na maioria das vezes está associada a hipertrofia compensatória em outras regiões (TODHUNTER & JOHNSTON, 2003).

4.2. Avaliação radiográfica

Os índices de reação de cicatrização óssea subcondral atribuídos as radiografias obtidas 45 dias após as cirurgias (Figura 5) são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. – Avaliação de índice de reação de cicatrização óssea subcondral com base em radiografias de ambos os membros (grupos) dos animais.

	Membro pélvico	
	Direito (Grupo C)	Esquerdo (Grupo T)
Ausência de reação óssea	3/12 (25%)	4/12 (33%)
Presença de reação óssea moderada	8/12 (67%)	5/12 (42%)
Presença de reação óssea intensa	1/12 (8%)	3/12 (25%)

O grupo T apresentou maior número de membros tanto com ausência de reação óssea subcondral (33%), quanto presença de reação óssea subcondral intensa (25%).

A presença de reação óssea subcondral moderada foi mais relatada no grupo C com 67% dos membros assim descritos.

A radiografia simples é um dos exames de imagem padrões para a identificação da presença e progressão de lesão de cartilagem articular, e pode ser utilizada para avaliar a integridade de diversas estruturas articulares, inclusive osso e cartilagem (LINK et al., 2003).

Segundo RASERA e colaboradores (2007), o exame radiográfico, possui algumas limitações, as alterações iniciais causadas pela lesão da cartilagem articular só são evidenciadas posteriormente, quando esta progride e leva ao aparecimento de lesão óssea secundária, demonstrando a relação dependente entre osso e cartilagem, o autor relata em estudo com osteoartrite experimental equina, que a radiografia só obteve êxito em demonstrar integridade de cartilagem articular após 40 dias do início do trauma.

A utilização das radiografias no presente estudo possibilitou tanto realizar uma avaliação de reação de cicatrização óssea subcondral quanto observar a integridade articular dos membros, obtendo-se resultados satisfatórios devido a relação anatômica entre cartilagem e osso (Figura 4).

Segundo ALFORD et al. (2005), além de proporcionar um arcabouço anatômico para a cartilagem, o osso subcondral ainda proporciona uma fonte de vascularização, no caso da cartilagem ausente, necessária para que a reparação tecidual ocorra.

A atribuição de índices nas radiografias pode ser considerada um exame subjetivo, para tornar o estudo mais fidedigno foi associada uma avaliação histopatológica.



Figura 4. – Radiografia sete dias de PO de ambos os membros. Local do defeito ósseo (setas).



Figura 5. – Radiografia 45 dias de PO de ambos os membros. Local do defeito ósseo (setas).

4.3. Avaliação Histopatológica

A descrição histopatológica do grupo C revelou que no local do defeito foi observada áreas multifocais de moderada proliferação de tecido conjuntivo, presença moderada de neovascularização e discreta de tecido ósseo imaturo.

No grupo T, a histologia mostrou que o local de implante apresentava áreas difusas de acentuada proliferação de tecido conjuntivo, áreas com presença do implante de quitosana agregadas com quantidade abundante de tecido conjuntivo, intensa neovascularização, maior presença de tecido ósseo imaturo, além de maior atividade celular (Figuras 6 e 7).

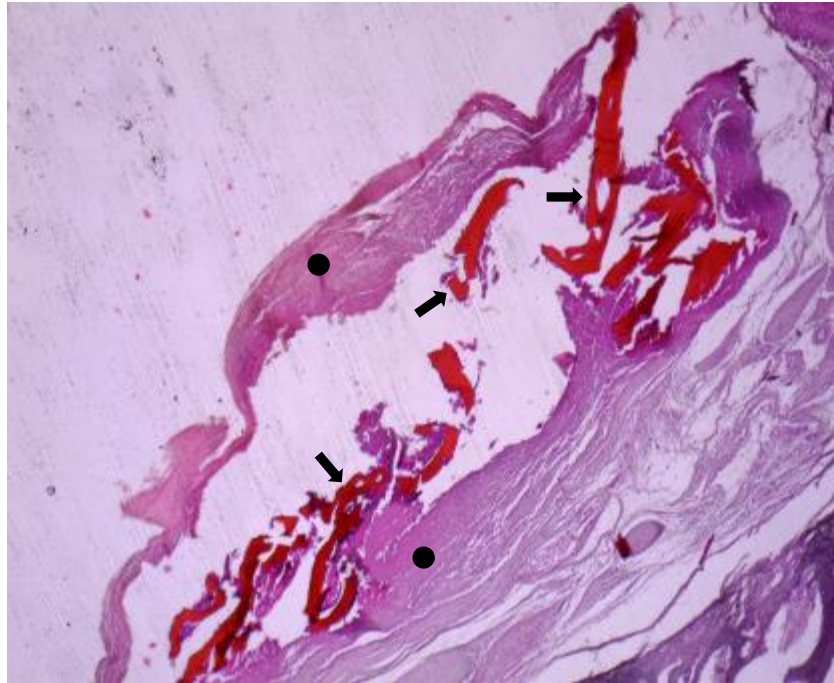


Figura 6. – Avaliação histopatológica grupo T, presença do implante de biomateriais (seta) circundado por tecido conjuntivo (círculo). Coloração com eosina e hematoxilina. Objetiva 4x.

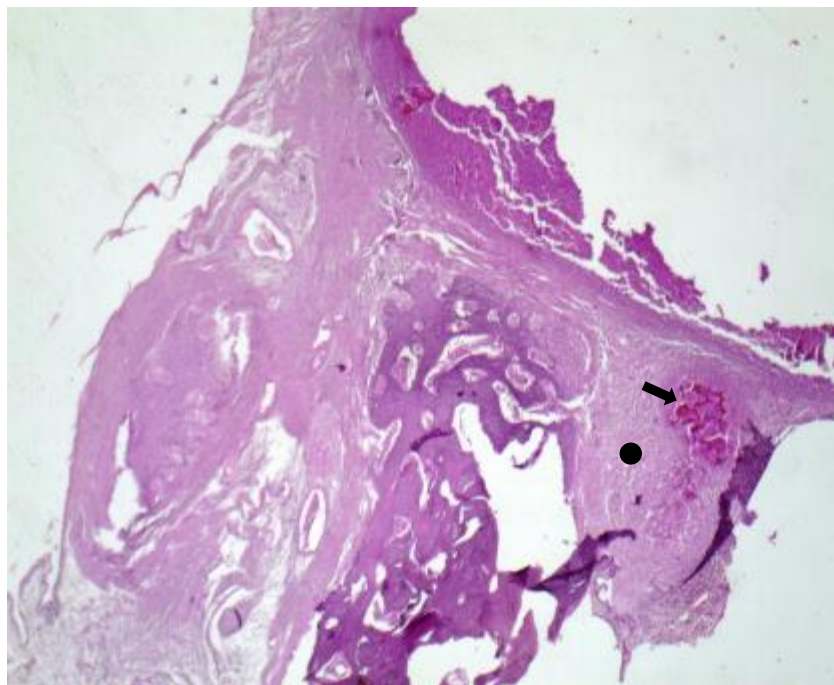


Figura 7. – Avaliação histopatológica grupo T, presença do implante de biomateriais (seta) circundado por tecido conjuntivo (círculo). Coloração com eosina e hematoxilina. Objetiva 4x.

A diferença na intensidade de proliferação de tecido ósseo observada no grupo T, pode ser associada a presença dos implantes, que promoveram potencialização da reparação de tecido conjuntivo no local do defeito.

A quitosana pode ser considerada uma grande responsável pela maior quantidade de tecido conjuntivo descritos no grupo T, o biomaterial possui estrutura semelhante a glicosaminoglicanos, os quais compõem a matriz extracelular de cartilagens e ossos, possuindo capacidade de promover uma potencialização do reparo desses tecidos (AZEVEDO et al., 2013).

A quitosana ainda dispõem da capacidade de ativação de células inflamatórias como os macrófagos, os quais são responsáveis pela liberação de interleucinas 6 e 8, além de outros fatores de crescimento que também atuam na reparação tecidual (UENO et al., 2001; GORZELANNY et al., 2010).

As funções estimulatórias da quitosana podem explicar a neovascularização mais intensa como também a maior quantidade de celularidade e de tecido conjuntivo observados no grupo T.

Segundo AZEVEDO e colaboradores (2012), a hidroxiapatita apresenta um tempo de biodegradação maior quando comparada com outros fosfatos de cálcio, conseqüentemente levando a uma menor quantidade de tecido ósseo neoformado.

O fato de que a hidroxiapatita estimula apenas a osteocondução, faz com que esse biomaterial tenha um desempenho inferior quando comparado com outros biomateriais, como por exemplo, a própria quitosana (AZEVEDO et al., 2013).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é descrita como uma terapia comprovadamente eficaz na diminuição de claudicação em equinos provavelmente, por promover um retorno funcional da superfície cartilaginosa articular (CARMONA et al., 2009; LOPEZ-VIDRIERO et al., 2010; CARMONA et al., 2011).

Em estudos na espécie ovina o PRP teve função reparativa de cartilagem articular estimulando a formação de tecido fibrocartilaginoso e promovendo uma integridade estrutural mais completa (CARNEIRO et al., 2013). Dessa forma a formação de tecido conjuntivo mais intensa no grupo T descrita no presente estudo, pode ser associada a influência da associação de PRP, quitosana e hidroxiapatita, com todos os componentes estimulando a proliferação de tecido conjuntivo.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a associação de PRP, quitosana e hidroxiapatita promoveram atividade sobre a proliferação de tecido ósseo e conjuntivo em coelhos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFORD, J. W. & COLE, B. J. Cartilage restoration, part 1: Basic Science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 33, n. 2, p. 295-306, 2005.
2. ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A. T. et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. **Rheumatology**. v. 46, p. 1769–1772, 2007.
3. ARORA, N. S.; THAMINDA, R.; REN, Y.F.; ROMANOS, G. E. Platelet-Rich Plasma in Sinus Augmentation Procedures: A systematic literature review: Part II. **Implant Dentistry**. v. 19, n. 2, 2010.
4. AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v. 23, p. 27-34, 2007.
5. AZEVEDO, A. S.; SA, M. J. C.; COSTA NETO, P. I.; FOOK, M. V. L.; PORTELA, R. A.; AZEVEDO, S. S. Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 49, p. 12-18, 2012.
6. AZEVEDO, A. S. Utilização de quitosana, gelatina, hidroxiapatita e b-trifosfato de cálcio, na regeneração óssea em coelhos. [Tese]. Universidade Federal de Campina Grande. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 99f. 2013.
7. AZEVEDO, A. S.; SA, M. J. C.; FOOK, M. V. L.; NOBREGA NETO, P. I.; SOUSA, O. B.; AZEVEDO, S. S.; Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo histológico e morfométrico. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 43, n. 7, p. 1265-1270, jul, 2013.

8. CARMONA, J. U.; LOPEZ, C.; GIRALDO, C. E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermidades crónicas del aparato musculoesquelético equino. **Arch Med Vet.** v.43, p.1-10, 2011.
9. CARMONA, J.U.; LOPEZ, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos obtenidos mediante El método del tubo como tratamiento de artropatías em caballos. **Arch. Med. Vet.**, v.41, p.175-179, 2009.
10. CARNEIRO, M. O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortop Bras.** v. 21, p. 80-86, 2013.
11. CAVALLO, C.; FILARDO, G.; MARIANE, E. et al. Comparison of Platelet-Rich Plasma Formulations for Cartilage Healing: An in Vitro Study. **Journal of bone and joint surgery.** v. 96, p. 423-429, 2014.
12. DIAS, T. A. Gel de quitosana à 2% na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. [Dissertação]. Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. 94f. 2012.
13. FROHBERGH, M. E.; KATSMAN, A.; BOTTA, G. P.; LAZAROVICI, P.; SCHAUER, C. L.; WEGST, U. G. K.; LELKES, P. I. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. **Biomaterials.** v. 33, 9167-9178, 2012.
14. GOMOLL, A. H. & MINAS, T. The quality of healing: Articular cartilage. **Wound Rep. Reg.** v. 22, n. 1, p. 30-38, 2014.
15. GORZELANNY, C.; POPPELMANN, B.; PAPPELBAUM, K.; MOERSCHBACHER, B. M.; SCHNEIDER, S. W. Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. **Biomaterials.** v. 31, p. 8556-8563, 2010.
16. HAO, T.; WEN, N.; CAO, J. K. et al. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels. **Osteoarthritis and Cartilage.** v. 18, p. 257-265, 2010.
17. HUAIXAN, L. N. Comparação entre as histerorrafias com fios de sutura dos tipos catégute e quitosana: macroscópica, histoquímica e imuno-histoquímica. [Dissertação]. Universidade de Brasília. Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal. 20f. 2013.
18. JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. Histologia básica. 10ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ, 2004.

19. KHOR, E. & LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**. v. 24, p. 2339–2349, 2003.
20. KLEIN, C. P.; WAGNER, S. C.; SILVA, J. B. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. **R. Bras. Bioci. Porto Alegre**. v. 9, n. 4, p. 509-513, 2011.
21. KREUZ, P.C.; STEINWACHS, M.R.; ERGGELET, C.; KRAUSE, S.J.; KONRAD, G.; UHL, M.; et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. **Osteoarthritis Cartilage**. 14: 1119–1125, 2006.
22. LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 395, p.81-98, 2002.
23. LEIGH, J. P.; SEAVEY, W.; LEISTIKOW, B. Estimating the costs of job related arthritis. **J. Rheumatol**. v. 28, p. 1647–1654, 2001.
24. LINK, T. M.; STEINBACH, L. S.; GHOSH, S.; RIES, M.; LU, Y.; LANE, N.; MAJUMDAR, S. Osteoarthritis: MR imaging findings in diferente stages of disease and correlation with clinical findings. **Radiology**. v. 226, p. 373-381, 2003.
25. LIU, J.; SONG, W.; YUAN, T.; XU, Z.; JIA, W. CHANGQING, Z. A comparison between Platelet-Rich Plasma (PRP) and Hyaluronate Acid on the Healing of Cartilage Defects. **Plos one**. v. 9, n. 5, may, 2014.
26. LOPEZ-VIDRIERO, E.; GOULDING, K.A.; SIMON, D.A. et al. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. **J. Arthrosc. Relat. Surg**. v.26, p.269-278, 2010.
27. MALMONGE, S. M. & ZAVAGLIA, C. A. C. Hidrogéis de PoliHEMA para Reparo de Defeitos da Cartilagem Articular. 1 - Síntese e Caracterização Mecânica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Abr/Jun, p. 22-29, 1997.
28. MARTINS, E. A. N.; INVERNIZZI, M. S.; CAMPOS, M. G. N.; TEODORO, P. A.; CONTIERI, M. B.; SILVA, L. C. L. C. Emprego de membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 43, n. 10, p. 1824-1830, out, 2013.
29. MARX, R. E. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 58, p. 300-301, 2000.

30. MCILWRAITH, W. C. Reparação de cartilagem articular. In: _____. Mecanismos das doenças em cirurgia de pequenos animais. 3ª edição. São Paulo: Roca, 2014. VitalBook file.
31. MORISHIN FILHO, M. M. & RAHAL, S. C.; O uso de antiinflamatórios inibidores Cox-2 seletivos na osteoartrite canina. **Vet. E Zootec.** v. 15, n. 3, p. 407-415, dez, 2008.
32. NEVES, S. C.; TEIXEIRA, L. S. M.; MORONI, L. et al. Chitosan/Poly (3-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. **Biomaterials.** v. 32, p. 1068-1079, 2011.
33. OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L.; TOGNOLI, G. K.; RAISER, A. G. Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2403-2412, nov, 2008.
34. PUPPI, D.; CHIELLINI, F.; PIRAS, A. M.; CHIELLINI, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science.** v. 35, p. 403–440, 2010.
35. RASERA, L.; MACORIS, D. G.; CANOLA, J. C.; AITA, A. C.; GOMES, T. L. S. Alterações radiográficas e ultra-sonográficas iniciais em osteoartrite experimental equina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 59, n. 3, p. 643-640, 2007.
36. SMITH, G.D.; KNUTSEN, G.; RICHARDSON, J.B. A clinical review of cartilage repair techniques. **J. Bone Joint Surg. Br.** v. 87, n.4, p. 445-449, 2005.
37. TODHUNTER, R. J. & JOHNSTON, S. A. Osteoartrite. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 3 ed. Filadélfia: Saunders, cap. 154, p. 2208-2246, 2003.
38. TRIPPEL, S. B.; MANKIN, H. J. Consolidação da cartilagem articular. In: _____. Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais. 2ª edição. São Paulo: Roca, 2014. p. 829-846.
39. TSCHON, M.; FINI, M.; GIARDINO, R.; FILARDO, G.; DALLARI, D.; TORRICELLI, P.; MARTINI, L.; GIAVARESI, G.; KON, E.; MALTARELLO, M. C.; NICOLINI, A.; CARPI, A. Lights and shadows concerning platelet products for musculoskeletal regeneration. **Front Biosci.** (Elite Ed). v. 1, n. 3, p. 96-107, jan, 2011.
40. UENO, H.; NAKAMURA, F.; MURAKAMI, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production

by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. **Biomaterials.** v. 22, p. 2125-2130, 2001.

41. YAMADA, A. L. M.; CARVALHO, A. M.; OLIVEIRA, P. G. G.; FELISBINO, S. L.; QUEIROZ, 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 64, n. 2, p. 323-332, 2012.

42. WU, W.; CHEN, F.; LIU, Y. et al. Autologous Injectable Tissue-Engineered Cartilage by Using Platelet-Rich Plasma: Experimental Study in a Rabbit Model. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 65, p. 1951-1957, 2007.