



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**INFLUÊNCIA DO DIA DE APLICAÇÃO DO PLASMA
RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE
TENDINITE EM EQUINOS**

FERNANDA ASSIS FONSECA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2012**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INFLUÊNCIA DO DIA DE APLICAÇÃO DO PLASMA
RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE
TENDINITE EM EQUINOS**

FERNANDA ASSIS FONSECA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2012**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INFLUÊNCIA DO DIA DE APLICAÇÃO DO PLASMA
RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE
TENDINITE EM EQUINOS**

FERNANDA ASSIS FONSECA

**ORIENTADOR: ROBERTA FERRO DE GODOY
CO-ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA**

PUBLICAÇÃO: 068/2012

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2012**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FONSECA, F.A. **influência do dia de aplicação do plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 63p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Fonseca, Fernanda Assis

influência do dia de aplicação do plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos. / Fernanda Assis Fonseca orientação de Roberta Ferro de Godoy. Brasília, 2012. p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. Equino. 2. Tendinite. 3. Tendão flexor digital superficial. 4. Plasma rico em plaquetas. 5. Fatores de crescimento. 6. Ultrassonografia I. Godoy, R.F. II. Doutora

Agris/FAO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INFLUÊNCIA DO DIA DE APLICAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITE EM EQUINOS

FERNANDA ASSIS FONSECA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

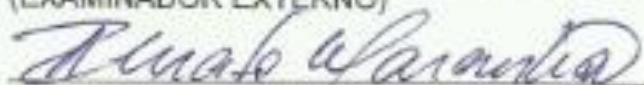
APROVADA POR:



EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA, DOUTOR (UnB)
(CO-ORIENTADOR)



RICHARD DA ROCHA FILGUEIRAS, DOUTOR
(EXAMINADOR EXTERNO)



RENATA DE PINO ALBUQUERQUE MARANHÃO, DOUTORA (UFMG)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 18 de Dezembro de 2012

**Dedico a minha família, à minha orientadora
Roberta Ferro de Godoy, ao meu co-orientador
Eduardo Maurício e àqueles que possam tirar
proveito deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a espiritualidade maior pela ajuda em compreender e lidar com as situações de dificuldades durante esses dois anos.

A minha família pelo amor, ensinamentos e formação pessoal. A base de tudo. Amo vocês!!!

Meus agradecimentos à minha orientadora, Profa. Dra. Roberta Ferro de Godoy, por me abrir as portas, possibilitando a concretização desse experimento e pela confiança e amizade, mesmo que de longe.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Eduardo Maurício Mendes de Lima por estar presente em todos os momentos nesses dois anos, a toda paciência e por ter nos ajudado apesar de todas as intercorrências.

Ao Tc. Hebert Goulart, ao Ten. Renato Fonseca e toda a equipe do RPMon/DF por abrirem suas portas para nosso experimento, nos concedendo os animais, a estrutura física e toda a ajuda necessária para que pudéssemos concluir nosso projeto da melhor maneira possível.

Às alunas do projeto de iniciação científica, Natália Franco, Jussara Barroncas e Paula, que nos acompanharam por toda a fase experimental e nunca se cansaram de caminhar os cavalos! E ao meu estagiário, Paulo Vinícius Lemes, que nunca me abandona e nos ajudou muito durante o transcorrer de todo o projeto.

Ao decanato de pesquisa e pós-graduação (DPP) pelos recursos financeiros concedidos para o auxílio de pesquisa de campo, para a aquisição de materiais de pesquisa,.

As meninas da patologia clínica e, em especial, a Fabiene por nos ajudar nas análises dos hemogramas e contagens de plaquetas.

Aos maravilhosos cavalos, que mesmo aposentados nos continuaram a servir e comporam o objeto de estudo dessa pesquisa. Eles são a razão de tudo isso, devem ser respeitados e amados!!!

À secretaria de Pós-graduação, em especial, à Kelly, por ter sido muito atenciosa e compreensiva durante todo o mestrado. Sempre disposta a tirar todas nossas dúvidas e fazer de tudo para ajudar.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	1
1.1 Introdução	1
1.2 Justificativa	2
1.3 Objetivos	2
1.4 Referencial teórico	2
1.4.1 Tendão: definição e função	2
1.4.2 Estrutura tendínea	3
1.4.3 Propriedades mecânicas	5
1.4.4 Reparação e cicatrização tendínea	7
1.4.5 Tendinite do tendão flexor digital superficial	9
1.4.5.1 Sinais clínicos	10
1.4.5.2 Diagnóstico e monitoramento	11
1.4.5.3 Tratamento clínico da tendinite	15
1.4.6 Tendinite induzida experimentalmente por colagenase	17
1.4.7 Plasma rico em plaquetas (PRP)	18
1.4.7.1 Plaquetas e os fatores de crescimento	18
1.4.7.2 Preparo do PRP	21
1.4.8 Uso do prp em tendinites	23
CAPÍTULO II	27
2.1 Material e métodos	27
2.1.1 Animais	27
2.1.2 Delineamento experimental	28
2.1.3 Indução da tendinite com colagenase	29
2.1.4 Preparo do plasma rico em plaquetas (prp)	31
2.1.5. Aplicação do plasma rico em plaquetas	32
2.1.6 Fisioterapia	33
2.1.7 Acompanhamento ultrassonográfico	33
2.1.8 Exames físicos	34
2.1.9 Análise dos dados	35
2.2 Resultados	35
2.3 Discussão	46
2.4 Conclusões	51
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	63
Solicitação de autorização Comissão Veterinária Oficial	63

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 2.1	Valores das variáveis hematológicas referentes ao número de hemácias, hematócrito, número de leucócitos, proteínas plasmáticas totais e plaquetas, obtidas dos animais do estudo.	28
TABELA 2.2	Concentração total de plaquetas no sangue total ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e no plasma rico em plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP).	36
TABELA 2.3	Valores médios e erro padrão das áreas transversais do tendão (ATT) obtidos ultrassonograficamente em milímetros quadrados (mm^2) dos animais dos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.	37
TABELA 2.4	Valores médios e erro padrão das áreas transversais da lesão (ATL) obtidos ultrassonograficamente em milímetros quadrados (mm^2) dos animais dos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49	38
TABELA 2.5	Distribuição da variação da ecogenicidade em porcentagem dos equinos avaliados nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.	40
TABELA 2.6	Valores relativos (%) das avaliações do paralelismo das fibras dos TFDS dos equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.	41
TABELA 2.7	Valores relativos (%) das avaliações da sensibilidade observadas nos locais de zero a IV em nos equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.	42
TABELA 2.8	Valores relativos (%) da variação da temperatura local no equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.	43
TABELA 2.9	Valores relativos (%) da variação do pulso digital de acordo com o escore zero a III, dos equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.	44

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1.1	Desenho esquemático da estrutura tendínea.	4
FIGURA 1.2	Representação gráfica da característica da força de distensão de um tendão. Uma resposta inicialmente complacente (fase elástica/1) antecede uma resistência, representada pela região quase linear (fase viscoelástica/2 e 3), sendo que na fase 3 danos irreversíveis podem ocorrer. A ruptura ocorre a cerca de 8% do alongamento (4).	6
FIGURA 1.3	Posicionamento longitudinal apropriado na região metacárpica palmar para maximizar a visualização do padrão das fibras colágenas. Note que as fibras dos tendões flexores estão paralelas com o topo da imagem.	13
FIGURA 1.4	Esquema das zonas ultrassonográficas para as regiões cárpica (C) e metacárpica (MC).	14
FIGURA 2.1	Vista lateral esquerda do membro torácico de um equino ilustrando os pontos de bloqueios perineurais dos nervos palmares laterais utilizados no experimento.	30
FIGURA 2.2	Vista lateral esquerda do terço médio do membro torácico esquerdo de um equino ilustrando com uma seta vermelha o local que foi realizada a tricotomia de referência.	30
FIGURA 2.3	Diferentes momentos desde o sangue total (I), sangue total após centrifugação dividido em duas frações (concentrado de hemácias mais leucócitos e plasma) (II), 50% do plasma que sofrerá a segunda centrifugação (III), plasma após a centrifugação do qual será retirado 25% para o plasma rico em plaquetas (IV) até a obtenção do plasma rico em plaquetas (V).	32
FIGURA 2.4	Demonstração da aplicação intralesional guiada por ultrassom (A) e a imagem ultrassonográfica no momento com a seta indicando a agulha hipodérmica.	32
FIGURA 2.5	Fotografias da vista lateral esquerda do terço médio da	34

mão de equino visando a mensuração dos perímetros da região metacárpica de P1 (A), P2 (B) e P3 (C).

- FIGURA 2.6** Representações gráficas das áreas transversais das lesões em milímetros entre os G7c e G7t em relação aos dias avaliados. 39
- FIGURA 2.7** Representação gráfica dos valores absolutos das variações encontradas nos perímetros da região metacárpica e metatársica em centímetros em relação aos dias de avaliação entre cada um dos grupos de equinos empregados no estudo. 45

RESUMO

Uma alternativa em crescente foco no tratamento de lesões musculoesqueléticas é o plasma rico em plaquetas (PRP), um componente autógeno de baixo custo e fácil aquisição. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do PRP no tratamento da tendinite induzida no tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS) de equinos mediante avaliação clínica e ultrassonográfica. Para isso, foram utilizados dez equinos hípidos adultos. A tendinite foi induzida em ambos os membros torácicos e no membro pélvico esquerdo mediante a administração intratendínea de 2,5 mg de colagenase, sendo esse procedimento considerado o início da fase experimental. Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo o de aplicação aos sete dias (G7) e outro grupo o de aplicação aos 14 dias (G14). Um membro recebeu injeção de solução salina 0,9%, aos sete e aos 14 dias de acordo com o grupo (G7c e G14c). O outro membro recebeu injeção de PRP contendo concentrações variando de 370.000 a 695.000 plaquetas/ μ L, aos sete e aos 14 dias de acordo com o grupo (G7t e G14t). Assim, cada animal foi seu próprio controle. No dia seguinte ao tratamento, os animais foram submetidos à atividade física controlada e progressiva até o quadragésimo nono dia. Durante esse período os equinos foram submetidos ao exame físico e ultrassonográfico a cada sete dias, durante sete semanas. Os exames ultrassonográficos foram realizados antes e após a indução da tendinite, sendo avaliada a área transversal do tendão (ATT), área transversal da lesão (ATL), a ecogenicidade da lesão, bem como o paralelismo das fibras colágenas. A avaliação clínica realizada após o tratamento revelou, em função do tempo, redução da dor à palpação e temperatura local no grupo tratado com o PRP. Na avaliação ultrassonográfica, observou-se redução ($p < 0,05$) da ATL em função do tempo apenas no grupo G7, aonde os valores médios foram menores no G7t. As principais conclusões do estudo foram que o PRP propicia menor intensidade de variáveis clínicas (dor a palpação e temperatura local), o que proporciona maior conforto e bem estar para o animal, assim como promove maior redução da área da lesão quando administrado durante a fase aguda.

Palavras-chave: Equino, tendinite, tendão flexor digital superficial, cicatrização.

ABSTRACT

An alternative in crescent focus in treatment of musculoskeletal injuries is the platelet-rich plasma (PRP), an autogenous component of low cost and easy acquisition. The aim of this study was to evaluate the effect of PRP on the treatment of induced tendinitis in the tendon of the superficial digital flexor muscle (SDFT) of equines, by clinical and ultrasonography evaluation. For this matter, ten healthy adult equines were used. The tendinitis was induced in both of the thoracic limbs and in the left pelvic limb by intratendineous administration of 2,5mg of collagenase. This procedure was considered the start of the experimental phase. The animals were divided in two groups: one group received administration on the seventh day (G7); the other received administration on the fourteenth day (G14). One limb was injected with 0,9% saline solution, on the seventh and on the fourteenth days, according to the group (G7c and G14c). The other limb was injected with PRP with concentrations varying from 370.000 to 695.000 platelets/ μ L, on days seven and fourteen, according to the group (G7t and G14t). Therefore, each animal was its own control group. The day after the treatment, the animals were submitted to controlled and progressive exercise until the 49th day. During this period, the equines were submitted to physical and ultrasonographic exams every seven days, for seven weeks. The ultrasonographic exams were performed before and after the induction of tendinitis, evaluating the cross-sectional area of the tendon (ATT), cross-sectional area of the injury (ATL), the ecogenicity of the injury, as well as the parallelism of the collagenous fibers. The clinical evaluation performed after the treatment revealed, with time, pain reduction to palpation and reduction in site temperature in the group treated with PRP. As for the ultrasonographic evaluation, a reduction of ATL ($p < 0,05$) with time was observed only in the G7 group, where the mean values were lowest in the G7t. The main conclusions of the study were that the PRP provides less intensity of clinical variables (pain to palpation and site temperature), what causes more comfort and well being to the animal, as well as provides more reduction of the injured area when administrated during the acute phase.

Key words: Equine, tendonitis, superficial digital flexor tendon, healing.

CAPITULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A tendinite dos músculos flexores nos equinos acomete uma grande porcentagem dos animais atletas, respondendo por prejuízos econômicos decorrentes de gastos com atendimento profissional especializado e tratamento, longo período de convalescença, ocorrência de recidivas e, em alguns casos, a impossibilidade do retorno à atividade física desempenhada pelo animal. O Tendão Flexor Digital Superficial (TFDS) frequentemente trabalha muito próximo ao seu limite de resistência tênsil, o que aumenta o risco de lesões. Além disso, a carga que os tendões flexores suportam faz com que sejam mais frequentemente lesionados (SMITH, 1998).

As lesões tendíneas se cicatrizam lenta e ineficientemente. Uma vez que se produz a lesão, estas estruturas nunca recuperam suas propriedades biomecânicas originais (GOODSHIP et al., 1994). Assim, há um desafio no tratamento dessa afecção, pois os tratamentos tradicionais levam meses a anos para obter a cicatrização tecidual sem uma recuperação das propriedades biomecânicas originais do tendão, predispondo a uma fragilidade e altos índices de recidivas. Devido ao longo tempo necessário para a recuperação completa do tecido tendíneo e à alta incidência de reparação desorganizada (BARREIRA, 2005), esse tipo de lesão compromete seriamente o desempenho, resultando em redução da vida útil ou, por vezes, no encerramento da carreira atlética (PALMER et al., 1994; PELOSO et al., 1994).

A ultrassonografia é o método mais empregado no auxílio à detecção e acompanhamento de lesões. Permite ainda determinar o local exato da lesão, e quantificar a extensão e a intensidade da mesma, além de possibilitar o monitoramento do processo de reparação tecidual durante o período de tratamento (MARR et al., 1993).

Alguns estudos têm mostrado a eficácia da utilização de fatores de crescimento (FC) como complemento no tratamento de lesões de tecido mole para redução do tempo de cicatrização e melhora da qualidade do tecido cicatricial (MAIA, 2008; CARMONA et al., 2009; OLEZA, 2009; MEIRELLES et al, 2010).

Atuando como uma fonte rica em fatores de crescimento, uma opção viável para o tratamento de lesões tendíneas, é o plasma rico em plaquetas (PRP) que é um componente autógeno de baixo custo e fácil obtenção (OLEZA, 2009).

1.2 JUSTIFICATIVA

O PRP têm se mostrado uma alternativa de baixo custo e segura para a utilização de fatores de crescimento liberados pelas suas próprias plaquetas em reparações tendíneas, com resultados promissores. Existem evidências científicas que validam a eficácia *in vitro* do PRP sobre o metabolismo dos tenócitos, porém há poucos estudos *in vivo* que mostrem este efeito metabólico positivo sobre os tecidos moles. Apesar de aparentemente promissora, essa terapia ainda necessita de mais estudos em equinos pra determinação de seus reais benefícios e padronização de protocolos eficazes em relação ao preparo do PRP e sua aplicação de acordo com o momento de aplicação, número de doses e ativação plaquetária ou não.

1.3 OBJETIVOS

Avaliar a influência do momento de aplicação do PRP na sua eficácia no tratamento da tendinite induzida por colagenase no TFDS de equinos mediante avaliações clínica e ultrassonográfica. Assim, o experimento comparou o tratamento da lesão aos sete e 14 dias pós-lesão avaliando a eficácia da terapia em diferentes fases do processo de cicatrização, na tentativa de otimizar o tempo e qualidade de recuperação da lesão.

1.4 REFERENCIAL TEÓRICO

1.4.1 TENDÃO: DEFINIÇÃO E FUNÇÃO

O tendão é uma faixa espessa de tecido conjuntivo fibroso que age como um intermediário na ligação do músculo ao osso (McILWRAITH, 2006). Acreditava-se que esta estrutura tinha função única de estabilizar e guiar a movimentação das

articulações. No entanto, embora esta função “posicional” seja ainda importante, certos tendões atuam como molas para armazenar energia para promover uma locomoção mais eficiente (SMITH e GOODSHIP, 2004). Um exemplo desta função seria a diferença encontrada na rigidez estrutural entre os tendões digitais flexores e extensores dos equinos, sendo os primeiros até duas vezes mais rígidos que os últimos (BATSON et al., 2003). Nos equinos, isso é particularmente importante, uma vez que as estruturas tendíneas da face palmar da região metacárpica, como o TFDS, atuam como suporte durante a hiperflexão da articulação metacarpofalangeana, armazenando e liberando energia durante o movimento.

No membro torácico o músculo flexor digital superficial tem origem no epicôndilo medial do úmero, e no membro pélvico na fossa supracondilar do fêmur. Distal à articulação metacarpofalangeana/metatarsofalangeana e próximo à extremidade distal da falange proximal, o TFDS divide-se em dois ramos que se inserem distalmente na face palmar/plantar da falange proximal, à inserção dos ligamentos colaterais e na eminência colateral medial e lateral na margem proximal palmar/plantar da falange média à inserção dos ligamentos colaterais da articulação interfalângiana proximal (SANDE et al., 1998).

1.4.2 ESTRUTURA TENDÍNEA

A musculatura do membro do cavalo é posicionada principalmente na região proximal, visando minimizar o peso da porção distal do membro. Isto permite ao cavalo atingir uma locomoção eficiente a altas velocidades (SMITH e GOODSHIP, 2004). Enquanto o comprimento da passada aumenta, a demanda energética é reduzida devido às características tendíneas de armazenamento e liberação de energia durante a propulsão. Ou seja, os tendões armazenam energia durante o apoio e dissipam-na ao final da passada. Isto significa que, os tendões associados a estes músculos, devem ser longos para atravessar as articulações atuantes.

Os tendões são compostos por um tecido conjuntivo denso, regular e possuem um arranjo específico, que reflete das demandas mecânicas desse tecido. Esse arranjo se dá através de unidades estruturais organizadas longitudinalmente, compostas por fibroblastos organizados inseridos em uma matriz extracelular rica

em colágeno. Acredita-se que a resistência das fibras de colágeno se dá pela forma como estão estabelecidas essas ligações cruzadas intermoleculares.

A principal característica de uma molécula de colágeno é a estrutura longa e rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas, denominadas de cadeia alfa, mostram-se enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda torcida. (MAIA, 2008). Existem diferentes tipos de colágeno que podem se organizar em diferentes arranjos estruturais. Aqueles que se organizam em fibrilas são: colágenos do tipo I e V (tendões, ossos, pele, ligamentos, córnea e órgãos internos), II e XI (cartilagem, disco intervertebral, notocorda e humor vítreo) e III (pele, vasos sanguíneos e órgãos internos) (ALBERTS et al., 2006). Em particular, as fibrilas de colágeno tipo III referem-se às fibras reticulares ou reticulina, consideradas estruturas delicadas e importantes na sustentação de componentes especializados da matriz extracelular (STEVENS e LOWE, 1995).

A partir dessa unidade, formam-se as microfibrilas, subfibrilas, fibrilas, fibras e fascículos, sucessivamente. Como mostra a figura 1.1 abaixo:

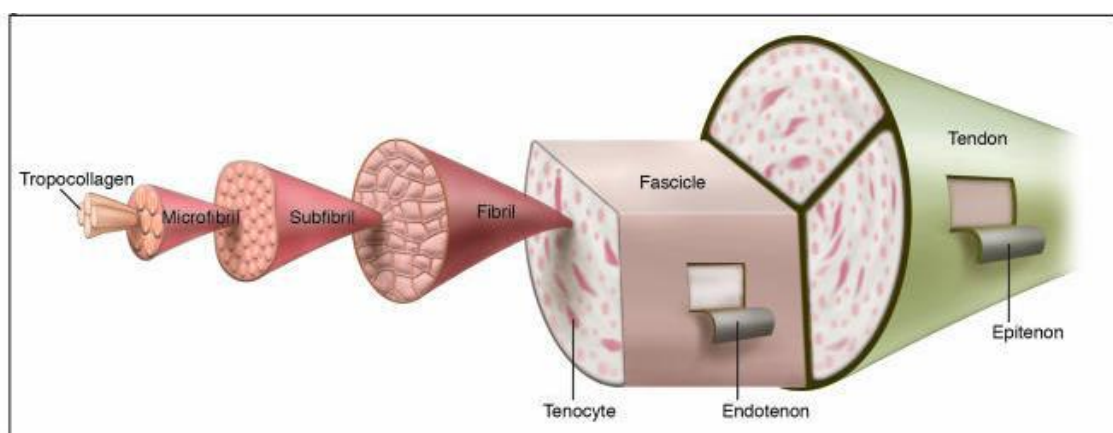


Figura 1.1. Desenho esquemático da estrutura tendínea. Fonte: Aslan et al. (2008)

As fibrilas de colágeno são unidades fundamentais de resistência à tração em um tendão, sendo estruturas cilíndricas compostas principalmente por moléculas de colágeno tipo I em um arranjo axial e lateral específico (PATTERSON-KANE et al., 1998). Para que essas fibrilas exerçam sua função de resistência, devem estar alinhadas em feixes paralelos ao longo do eixo principal de tensão. As células do

tecido conjuntivo controlam essa orientação em parte pelo depósito de colágeno de forma orientada, mas também pelo arranjo da MEC (MAIA, 2008).

Embora as células tendíneas sejam genericamente conhecidas como tenócitos, não são uma população uniforme, diferindo consideravelmente na morfologia nuclear entre si. Essas células são capazes de modular sua capacidade metabólica. As células com intensa capacidade de síntese são conhecidas como fibroblastos, enquanto que as metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A sua principal função é de síntese proteica, principalmente aquela relacionada com a renovação do colágeno tendíneo. Durante o desenvolvimento dos tecidos, os fibroblastos organizam o colágeno que secretam, arrastando-se sobre ele e puxando-o, de forma a orientar o posicionamento desse em camadas, delineando os feixes (ALBERTS et al., 2007).

O tendão é, de fato, constituído por um arranjo complexo de proteínas extracelulares na qual estão incorporadas células, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (SMITH e GOODSHIP, 2004). O endotendão é a estrutura que fica localizada entre os feixes tendíneos e que conduz essas três últimas estruturas. É constituído por um tecido frouxo trabeculado.

O endotendão é uma extensão do epitendão (ou peritendão), uma camada delicada de tecido conjuntivo frouxo que reveste intimamente a superfície do tendão. Externamente ao epitendão, o tendão é envolvido por uma bainha de tecido conjuntivo frouxo vascular do paratendão ou, onde ocorre uma mudança de direção ou atrito aumentado, por uma bainha tendínea, que pode ser comparada a uma capsula articular (McILWRAITH, 2006).

O aporte de sangue para o tecido tendíneo pode ser proveniente do músculo ou do osso ao qual o tendão está unido, do mesotendão, da faixa de bainha sinovial ou do paratendão, caso não exista uma bainha (McILWRAITH, 2006).

1.4.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Em termos mecânicos, o tendão tem como principal função a transmissão de força. Outras funções atribuídas aos tendões incluem: amplificação mecânica durante contrações musculares rápidas, armazenamento de energia elástica e

atenuação de forças durante movimentos rápidos e súbitos (EVANS e BARBENEL, 1975).

Apesar da principal função do tendão ser a de resistência tênsil, eles possuem uma baixa extensibilidade, o que o torna susceptível a rupturas. Segundo Riley (2004), forças de tensão sobre o tendão que ocasionem uma extensão acima de 4% no seu comprimento (limite fisiológico) resultarão em lesão em um ou mais feixes de fibras. A ruptura completa pode ocorrer quando a tensão resulta em 8 a 12% de extensão. Ou seja, a princípio essa estrutura se comporta de forma mais complacente, mas conforme a força de tensão aumenta, exigindo uma maior extensão, o tendão apresenta uma resposta menos flexível (Figura 1.2).

Atribui-se esta transição na resposta da elasticidade, em relação às forças de tensão exercidas sobre o tendão, ao desaparecimento da forma ondulada sobre a superfície do tendão, que ocorre aproximadamente a 3% de extensão. Dentro dessa amplitude de elasticidade, a forma em onda da fibrila reaparece com a remoção da força. Considera-se também que nessa zona ocorra o desenrolamento das hélices das fibras de colágeno (fase viscoelástica). (McILWRAITH, 2006).

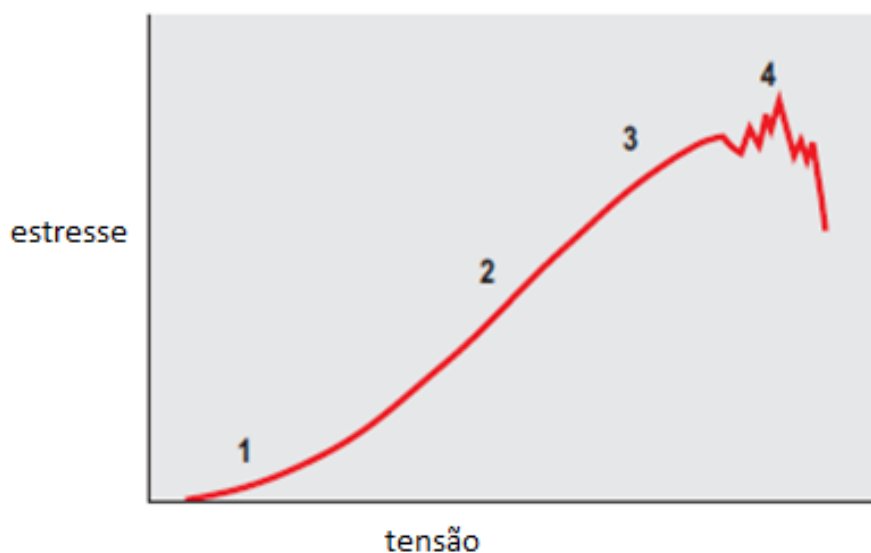


Figura 1.2. Representação gráfica da força de distensão de um tendão. Uma resposta inicialmente complacente (fase elástica/1) antecede a resistência, representada pela região quase linear (fase viscoelástica/2 e 3), sendo que na fase 3 danos irreversíveis podem ocorrer. A ruptura ocorre a cerca de 8% do alongamento (4). Fonte: Smith e Goodship (2004).

A adaptação funcional de tendões e ligamentos ainda é uma área pouco explorada. Considera-se que o animal jovem seja o único a responder aos desafios impostos pela atividade física. Uma vez atingida a maturidade esquelética, o tecido tendíneo perde sua capacidade adaptativa e o treinamento não influencia positivamente essa característica. As razões para tal ainda são desconhecidas, mas acredita-se que estejam associadas à redução de celularidade, redução do metabolismo dos tenócitos e ausência de fatores de crescimento (SILVA et al., 2008). Alguns estudos têm demonstrado que os tendões de equinos jovens têm um elevado nível de FC, especialmente TGF- β , que declina após a maturidade esquelética. Células recuperadas de TFDS adultos possuem quase 50% de redução na resposta sintética *in vitro* a FC exógenos e estímulos mecânicos em comparação com tenócitos jovens de TFDS (CANONICI, 2011). Sabe-se que a magnitude de carga funcional de um TFDS é próxima ao nível de colapso e alguns estudos sugerem que exercícios ao galope causam micro traumas na região central deste tendão. Isto sugere que essa degeneração gerada durante o exercício de rotina enfraqueça essa estrutura e seja um fator desencadeante para a tendinite do tendão flexor digital superficial (SMITH E GOODSHIP, 2004).

1.4.4 REPARAÇÃO E CICATRIZAÇÃO TENDÍNEA

Apesar dos eventos básicos serem semelhantes a outros tecidos, o tempo de cicatrização necessário aos tendões é mais prolongado. Após a ruptura de fibrilas, ocorre acúmulo de sangue, fibrina e líquidos inflamatórios na região, levando à hipóxia e presença de enzimas degradativas que potencializam a agressão local. A fibroplasia é influenciada por essa reação inflamatória. Na presença de um tecido traumatizado e isquêmico com material estranho, ocorrerá maior reação inflamatória, sendo esta um estímulo significativo para a formação de um tecido de granulação excessivo e para a deposição de colágeno (KETCHUM, 1979).

Durante a cicatrização, podem estar envolvidos fatores extrínsecos e intrínsecos ao tendão. A cicatrização extrínseca ocorre pelo desenvolvimento de fibroblastos e capilares a partir de tecidos peritendíneos, porém predispõe à

formação de aderências peritendíneas que podem afetar a função do tendão e contribuir para a claudicação crônica (SMITH E GOODSHIP, 2004). Adicionalmente, a presença de fibrose intratendínea excessiva predispõe a recidiva da tendinopatia (MAIA, 2008).

Para que a cicatrização prossiga, deve haver fibrinólise do coágulo e a produção simultânea de novas fibras colágenas. Inicialmente as fibras são pequenas em diâmetro, com ligações cruzadas pouco estáveis e organizadas aleatoriamente, predominando o colágeno tipo III, de menor resistência mecânica (SILVA et al., 2008).

De acordo com Smith (1998), o processo de cicatrização do tendão ocorre em três fases. A primeira é a inflamatória, que dura de uma a duas semanas após a lesão, e caracteriza-se pela liberação de mediadores inflamatórios, incluindo as proteases que destroem o colágeno danificado e o intacto. Nesta fase, a sinalização ocasionada por alterações teciduais ativa as células de defesa do tendão, macrófagos locais, fibroblastos e mastócitos, que liberam grande número de moléculas proinflamatórias, em particular os agentes vasodilatadores.

O fluxo sanguíneo local aumentado, bem como o estabelecimento de um gradiente quimiotático, e a ativação das células endoteliais favorecem a migração rápida de neutrófilos para o local da lesão, onde liberam grande quantidade de moléculas proinflamatórias, em particular as quimiocinas, os radicais livres e as proteases. Adicionalmente, os monócitos que infiltram o sítio da lesão diferenciam-se em macrófagos para exercer atividade fagocítica e citotóxica (MARSOLAIS e FRENETTE, 2005). Bosch et al. (2011), referiram que durante a fase inflamatória (cerca de 10 dias pós-lesão), fibras colágenas do tendão são digeridas por enzimas proteolíticas e, em seguida, removidas por fagocitose.

O grande número de moléculas liberadas nessa fase causa danos aos componentes funcionais do tendão. Como exemplos destacam-se as enzimas da família das metaloproteinases (MMPs), que são capazes de degradar diferentes tipos de colágeno e outros componentes responsáveis pela função tendínea (MAIA, 2008). Essas proteases, porém, também indispensáveis na migração de células inflamatórias e remodelação da matriz extracelular (MARSOLAIS e FRENETTE, 2005). Segundo Maia (2008), em algumas áreas específicas, a ação das proteases é

restrita pela secreção de vários inibidores, incluindo os teciduais de metaloproteinases (TIMPS), que são protease-específico.

A segunda fase do processo de cicatrização é a reparação, que pode iniciar dias após a lesão e durar vários meses. Essa fase caracteriza-se pela ocorrência da angiogênese e fibroplasia, que resultam na formação de um tecido de cicatrização com alinhamento inadequado das fibrilas de colágeno, no aumento do colágeno, em particular do tipo III (SMITH, 1998). Durante a resolução da inflamação, os macrófagos liberam uma série de FC, incluindo o transformador beta 1 (TGF- β 1), o fibroblástico básico (b-FGF) e o endotelial vascular (VEGF), que são essenciais para angiogênese e início da reparação tendínea (MARSOLAIS e FRENETTE, 2005).

Após essa fase, deve ocorrer a reorganização estrutural do tecido, ou fase de remodelação, que tem início meses após a lesão e pode durar meses ou até anos. Nessa fase deve ocorrer uma substituição do colágeno tipo III por colágeno tipo I, que possui ligações mais estáveis e confere maior resistência ao tecido. Como regra geral, o tecido de substituição não possui as mesmas propriedades do original e a tensão gerada durante o exercício na zona de transição entre o tecido cicatricial e o saudável pode ocasionar novos episódios de tendinite ou até mesmo rupturas (SILVA et al., 2008). Nessa fase a atividade física controlada otimiza a cicatrização do tendão (SMITH, 1998).

A movimentação passiva limitada auxilia na orientação longitudinal das fibrilas de colágeno e da formação de feixes durante o reparo tendíneo, porém uma movimentação tendínea mais intensa inibe o reparo inicial do tendão (RUDOLPH et al., 1980). Esse aspecto é importante, pois o elevado grau de paralelismo de fibras está relacionado à maior resistência do tendão (MAIA, 2008). Com isso, atualmente o maior interesse é de estimular a cicatrização intrínseca do tendão, minimizando as aderências e proporcionando um tecido cicatricial de melhor qualidade (DAHLGREN, 2005).

1.4.5 TENDINITE DO FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL

O TFDS é responsável não somente pelo suporte da articulação metacarpofalangeana, juntamente com o ligamento suspensor do bolete, como

também tem a função de armazenar energia para uma locomoção eficiente, devido à sua elasticidade. Segundo Canonici (2011), sua porção muscular só possui capacidade de contração de 2mm com a função principal de fixar a origem do TFDS e absorver oscilações potencialmente prejudiciais.

Os danos aos tendões podem ocorrer através da tensão intrínseca e, mais raramente, por danos extrínsecos tais como a penetração e deslocamento. Ao galope, quando os membros torácicos tocam o solo, o boleto é hiperestendido e os tendões flexores submetidos a cargas de tração muito altas (GOODSHIP, 1993). Para maximizar a energia armazenada, os tendões alongam-se a um ponto próximo ao de colapso, acreditando-se que isso possa contar para uma incidência relativamente alta de lesões durante a atividade atlética (McILWRAITH, 2006). A forma mais comum procede de uma degeneração progressiva pré-existente consequentes a lesões crônicas ao TFDS que opera próximo do seu limite estrutural. É a hipótese de que a carga repetitiva pode ter um efeito direto sobre as células residentes, induzindo-as a liberar citocinas e produzindo hipertermia, as quais podem ser responsáveis pela liberação de enzimas proteolíticas responsáveis por degeneração da matriz (CANONICI, 2011). Segundo McIlwraith (2006), alguns estudos tentam fazer correlação da incidência com predisposição genética, porém nada foi comprovado cientificamente.

A tendinite do flexor digital superficial é uma causa frequente de claudicação em cavalos atletas, sendo mais comum nos membros torácicos, na região média do metacarpo e lesões bilaterais são comuns. Goodship et al. (1994) ressaltaram que quando tendões necropsiados são alongados até a ruptura, em laboratório, eles apresentam, com frequência, um padrão característico de ruptura, com as fibras centrais rompendo-se primeiro, como em lesões clínicas. As lesões tendíneas podem variar em grau, podendo evidenciar desde pequenas rupturas das fibrilas até ruptura completa do tendão.

1.4.5.1 Sinais Clínicos

Na maioria das vezes, a tendinite é acompanhada por sinais de inflamação, ou seja, claudicação, dor, calor e edema ao longo da estrutura afetada, e, na maioria

das vezes, este é o motivo do encaminhamento do equino. A claudicação pode nem sempre estar presente, e tende a estar mais relacionada com o grau de inflamação do que com o grau de dano às fibras tendíneas, variando de leve à moderada. De acordo com Gaughan (1994), a lesão pode ser evidenciada imediatamente após a lesão e se tornar mais intensa após 24 a 48 horas.

O apoio do membro pode se apresentar alterado de acordo com a estrutura afetada e a gravidade da lesão. No caso de tendinite grave do tendão flexor digital superficial, o ângulo de repouso da articulação metacarpofalangeana pode ser normal por causa da ação das outras estruturas de sustentação dessa articulação - músculo interósseo e tendão flexor digital profundo. No entanto, quando a carga aumenta sobre os membros (por exemplo, quando o membro contralateral é elevado), o membro afetado apresenta maior hiperextensão da articulação metacarpofalangeana (SMITH e GOODSHIP, 2004).

Lesões tendíneas subclínicas não são tão facilmente identificadas e requerem uma observação cuidadosa dos tendões após o exercício. Se existe ruptura significativa de fibras tendíneas, o boleto não pode ser “abaixado”. Já no estágio crônico, é manifestada por fibrose e inchaço de consistência firme (McILWRAITH, 2006).

1.4.5.2 Diagnóstico e Monitoramento

Os avanços diagnósticos, em particular com a ultrassonografia, aumentaram muito a capacidade de diagnosticar e definir a localização exata, extensão e a gravidade das lesões tendíneas. No entanto, segundo McIlwraith (2006), o exame clínico básico permanece como parte essencial no diagnóstico e no prognóstico da claudicação.

De acordo com Smith e Goodship (2004), nos casos mais sutis, a palpação cuidadosa dos tendões do membro em questão deve ser feita tanto com o animal apoiando o peso, como com o membro elevado. Atenção especial deve ser dada para a resposta dolorosa à palpação, aumento sutil e consistência da estrutura (macio após lesões recentes; firme após a cura). O animal deve estar com a musculatura relaxada de modo que a atividade muscular não enrijeça os tendões e

torne-os artificialmente firmes. A avaliação visual cuidadosa do contorno da região metacarpiana palmar pode ajudar a identificar tendinites sutis do flexor digital superficial. Como o prognóstico é mais dependente da gravidade da lesão inicial, é prudente avaliar a área lesada através de ultrassonografia e isso é melhor realizado 4-7 dias após o aparecimento da lesão, pois a maioria lesões tendem a expandir durante os primeiros dias. Dessa forma, a ultrassonografia é uma técnica de diagnóstico por imagem de grande auxílio na detecção e no acompanhamento de lesões que afetam o aparelho locomotor (VAN SCHIE et al., 2000).

Além do diagnóstico preciso e não invasivo, a ultrassonografia permite o monitoramento do processo de reparação da lesão, prognóstico e acompanhamento do retorno do animal às atividades. Os dados obtidos podem ser armazenados e classificados de acordo com a gravidade da lesão e comparados com exames anteriores e posteriores (GENOVESE, 1993).

Para o exame ultrassonográfico, o equino deve ser adequadamente contido, pois um paciente inquieto pode gerar um exame inacurado, resultando em má qualidade das imagens e erros de interpretação (RANTANEN et al., 2003). De acordo com Whitcomb (2009), o animal deve permanecer em estação com o apoio nos quatro membros. A área a ser avaliada deve ser tricotomizada e limpa, pois pêlos, descamações, crostas, sujeiras e ar causam artefatos e reduzem a qualidade da imagem. Afastadores (*Standoff pad*) são necessários para verificar estruturas mais superficiais, tais como o TFDS e os ramos do musculo interósseo. Os transdutores de frequência de 7,5 MHz são mais apropriados para avaliação de tendões e ligamentos, por proporcionar a obtenção de uma imagem com boa resolução (GENOVESE e RANTANEN, 1998).

Devem ser realizadas imagens transversais e longitudinais obtidas numa forma metódica durante todo o comprimento da região que contém o tendão lesionado como mostra a figura 1.3.

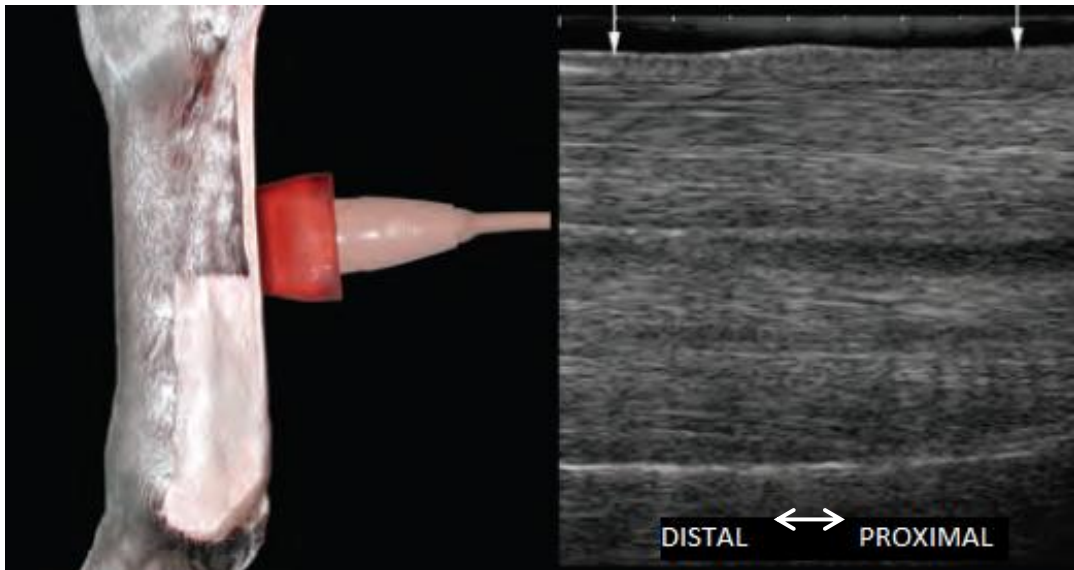


Figura 1.3. Posicionamento longitudinal apropriado na região metacárpica palmar para maximizar a visualização do padrão das fibras colágenas. Note que as fibras dos tendões flexores estão paralelas com o topo da imagem. Fonte: Whitcomb, 2009.

Para fins de ultrassonografia, a região metacárpica/metatársica é dividida em sete níveis ou zonas (Figura 1.4), cada uma com a anatomia característica. As estruturas de tecido mole localizadas na região palmar do metacarpo/metatarso podem ser avaliadas de forma satisfatória a partir do aspecto palmar/plantar do membro, exceto para os ramos do músculo interósseo que também deve ser avaliado a partir das faces medial e lateral do membro. Ambos os membros devem sempre ser examinados, pois muitos casos de lesão induzida por tensão no tendão tendem a ter componentes bilaterais, geralmente com um membro mais severamente afetado do que o outro (SMITH e GOODSHIP, 2004).

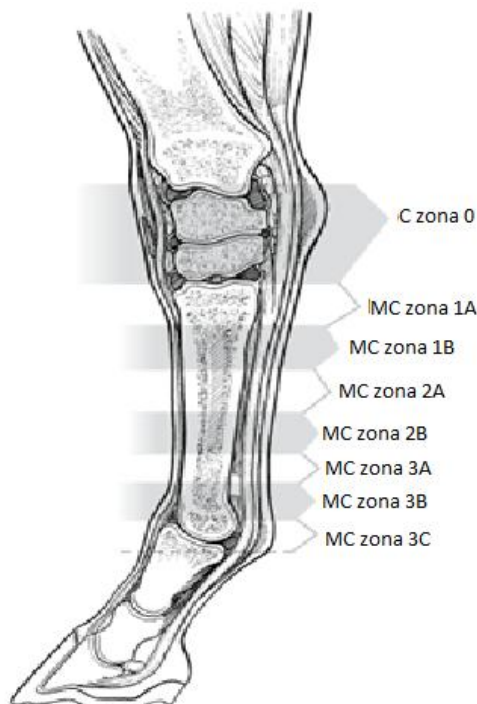


Figura 1.4. Esquema das zonas ultrassonográficas para as regiões cárpica (C) e metacárpica (MC). Fonte: Rantanen et al., 2003

O objetivo do exame ultrassonográfico é determinar a variação morfológica em relação ao normal, o que nem sempre é fácil. Deve-se observar o tamanho, a forma, a ecogenicidade, padrão de fibras, e reação inflamatória adjacente de qualquer estrutura (RANTANEN et al., 2003). Estas variáveis são utilizadas para identificar anormalidades no TFDS ou controlar o estado de reparação (MAIA, 2008).

A ecogenicidade se refere às variações de cinza na imagem, a “brancura” ou brilho de uma estrutura. Esse padrão ecogênico se difere entre as estruturas e localização. Segundo Rantanen et al (2003), lesões variam em ecogenicidade dependendo da consistência morfológica no momento do exame um sistema de pontuação pode ser utilizado para melhorar a objetividade ao avaliar a gravidade de uma lesão ou a resposta à terapia.

Alves (1998) ressaltou que, em condições fisiológicas, cada estrutura possui densidade própria. Nesse sentido, quanto mais denso for o tecido mais ecos retornarão ao transdutor e, conseqüentemente, maior será a ecogenicidade da imagem projetada no monitor (MAIA, 2008). De acordo com Genovese e Rantanen

(1998), a densidade, no caso do tendão, reflete o grau de ecodensidade das fibras colágenas, dos fluidos inflamatórios e do infiltrado celular, ou uma combinação desses componentes teciduais, em função da cronicidade do processo.

A avaliação do alinhamento do feixe de fibras em imagens longitudinais determina a natureza do arranjo de fibra do tendão ou ligamento. Normalmente, as fibras são alinhadas paralelamente, exceto em algumas áreas anatômicas. Quando ocorre uma lesão, o padrão esperado de paralelismo de fibras é interrompido. Durante a cicatrização, uma orientação aleatória de novas fibras de colágeno pode criar um tecido cicatricial que resulta em uma melhoria substancial na ecogenicidade, mas possui um pobre alinhamento paralelo das fibras. O alinhamento paralelo é mais vantajoso fisiologicamente do que uma orientação aleatória de uma cicatriz, porque o tecido cicatricial orientado aleatoriamente é susceptível a reinjúrias, especialmente durante o aumento do exercício (RANTANEN et al., 2003).

A lesão aguda do tendão se manifesta ultrassonograficamente pelo alargamento da estrutura devido a edema, hipoecogenicidade (lesão focal ou generalizadas), redução do padrão estriado, nas imagens longitudinais, referente ao paralelismo das fibras e podem ocorrer mudanças na forma e posição da margem tendínea. Tendinopatias crônicas estão associadas com alargamento e ecogenicidade variável (frequentemente heterogênea), e um reduzido padrão estriado irregular indicativo de fibrose (SMITH e GOODSHIP, 2004).

1.4.5.3 Tratamento Clínico da Tendinite

Estima-se que lesões do TFDS representam 8-30% de todas as lesões em cavalos de corridas (GENOVESE, 1993; GOODSHIP et al., 1994) e sua recorrência quando os animais retornam ao nível usual de exercício tem sido relatada como sendo tão elevada quanto 43-93% (GENOVESE et al., 1996; DYSON, 1997).

Novas opções terapêuticas, aparentemente promissoras, para o tratamento de lesões tendíneas e ligamentosas induzidas pelo exercício foram introduzidas na equinocultura nos últimos anos. Alguns destes tratamentos, em conjunto com protocolos de exercício controladas, tornaram-se especialmente populares, no

entanto, os pormenores associado com os benefícios teóricos e evidência científica de eficácia para cada, não são amplamente compreendidos entre os profissionais da área, treinadores e proprietários (DAHLGREN, 2005).

Os tratamentos tradicionais podem incluir tratamentos clínicos, bem como, intervenções cirúrgicas. Os objetivos de qualquer tratamento instituído deve ser diminuir a inflamação, impedir danos adicionais ao tendão, aumentar a resistência do tendão afetado e aumentar a vascularização na lesão, principalmente em lesões centrais. Porém, muitas vezes, o resultado do tratamento pode ser frustrante.

A terapia inicial visa diminuir a inflamação e o edema, podendo ser utilizados anti-inflamatórios e DMSO sistêmicos e tópicos, gelo, bandagens compressivas, hidroterapia. Outros tratamentos clínicos utilizados sem comprovação de eficácia incluem a administração de ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e/ou β -aminopropionitrila sistêmicos, intralesional ou na bainha tendínea.

Entrando no campo da fisioterapia tem-se difundido o tratamento com terapia de campo magnético pulsado, ultrassom terapêutico, laser de baixa intensidade e mais recentemente, terapia de ondas de choque extracorpórea (*shock wave*). Outras opções que tem tido destaque dentro das terapias regenerativas é a utilização de células-tronco e/ou fatores de crescimento (FC) (DAHLGREN, 2005). Os FC mais amplamente estudados na cicatrização tendínea incluem os fatores de crescimento derivados de plaquetas, a proteína morfogenética óssea-12, fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I), fator transformador- β (TGF- β) e fator de crescimento endotelial vascular. Os FC podem ser administrados ao tendão através de uma série de aplicações intralesionais guiadas por ultrassom ou através de terapia genética (OLEZA, 2009).

Finalmente, alguns tratamentos podem ser utilizados combinados de forma eficaz para guiar a reparação tendínea em direção a um tecido mais semelhante ao inicial. Em última instância, esses protocolos serão utilizados sinergicamente na medicina e medicina veterinária para a reabilitação de atletas com redução da incidência de novas lesões (DAHLGREN, 2005).

1.4.6 TENDINITE INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR COLAGENASE

A colagenase é uma enzima bacteriana. Essa enzima agride as moléculas de colágeno em múltiplos locais ao longo da cadeia, causando rápida solubilização do colágeno, destruição de células e matriz não-colágena, com consequente ruptura das fibras (SPURLOCK et al., 1989; FOLAND et al., 1992).

A aplicação intratendínea de colagenase gera alterações clínicas locais nas primeiras 24 a 48 horas (ALVES et al., 2002; MARXEN et al., 2004; BARREIRA, 2005). Segundo Yamada et al. (2009), são observados sinais inflamatórios, tais como aumento de temperatura, aumento de volume e sensibilidade dolorosa locais. Ultrassonograficamente, a destruição do colágeno pela colagenase é caracterizada por áreas hipocóicas ou anecóicas, e, o decréscimo da ecogenicidade depende diretamente da dose administrada (SPURLOCK et al., 1989).

A utilização de um modelo experimental em que haja padronização das lesões tendíneas, como no caso da tendinite induzida pela colagenase, permite o teste de diferentes protocolos terapêuticos, além de possibilitar o estudo do processo de formação da lesão e do processo cicatricial (MARXEN et al., 2004; CREVIER-DENOIX et al., 2005). De acordo com Williams et al. (1984), a administração de colagenase no centro do tendão resulta em rápida dissolução de fibras colágenas, necrose celular, hemorragia e inflamação, que se assemelham a muitos aspectos observados em lesões espontâneas decorrentes de trauma. Alves et al. (2002), também relataram que as reações posteriores à aplicação de colagenase, encontradas ao exame físico e ultrassonográfico, se assemelharam às lesões provocadas por excesso de exercícios.

Machado et al. (2000), Alves et al. (2002), Marxen et al. (2004) e Barreira (2005) relataram que lesões induzidas com diferentes doses de colagenase (1,25mg a 2,5mg) apresentam padronização desde o sétimo dia até o vigésimo dia após a aplicação da enzima. Para Yamada et al. (2009), o protocolo de aplicação de 2,5mg de colagenase é o mais adequado para indução de tendinite com a finalidade do estudo de tratamentos e lesões do TFDS.

1.4.7 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

As células teciduais encontram-se em um ambiente que condiciona e influencia sua evolução, no que se refere à diferenciação e sinais de regulação. Os FC fazem parte dos sinais de regulação, atuando como agentes externos (OLEZA, 2009). O plasma rico em plaquetas é uma fonte desses fatores de crescimento, atuantes na reparação tecidual, e que vem ganhando importância na medicina regenerativa.

O PRP atua na modulação e aceleração dos processos cicatriciais, sendo esses efeitos decorrentes da liberação de fatores de crescimento contidos nos grânulos plaquetários (DINATO et al., 2001). Embora o mecanismo exato da ação sinérgica não esteja completamente elucidado, a aplicação local de fatores de crescimento tem potencial terapêutico importante no tratamento de feridas crônicas (MAIA, 2008).

1.4.7.1 Plaquetas e os Fatores de Crescimento

As plaquetas são corpúsculos anucleados, medindo de 5 a 7 μ m de diâmetro, derivados de células gigantes e multinucleadas da medula óssea, os megacariócitos. (ARGÜELLES et al., 2006). Esses corpúsculos estão presentes no plasma sanguíneo e apresentam importante função no processo de coagulação do sangue. Vivem por aproximadamente dez dias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). São produzidas pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, sendo liberadas diretamente na circulação venosa, ao redor do espaço hematopoiético medular (LEONEL et al., 2008).

Sua estrutura citoplasmática possui duas formas de actina: globular e filamentosa. A actina atua como suporte estrutural para diferentes grânulos plaquetários e mitocôndrias. A resposta plaquetária se produz através de uma atividade contrátil mediada pela polimerização do complexo actina-miosina (CARMONA et al., 2011). Os microtúbulos citoplasmáticos mantêm a forma discoide e direcionam os movimentos gerados pelo complexo actina-miosina (GENTRY, 2000; HARTWING e ITALIANO, 2003).

As plaquetas de mamíferos contêm três tipos de grânulos: lisossomais, densos e alfa (α) (MANNAIONI et al., 1997; PELAGALLI et al., 2002). Os α -grânulos contêm citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, entre outras moléculas. Essas proteínas são importantes para todas as funções plaquetárias, tais como a formação e crescimento de trombos, modulação inflamatória e síntese de matriz extracelular durante a cicatrização (GENTRY, 2000).

Os α -grânulos são exemplos de organela secretora, e apresentam compartimentalização e conteúdo proteico adquiridos por dois mecanismos distintos: biossíntese a partir dos megacariócitos e endocitose/pinocitose (HARRISON e CRAMER, 1993). Esses grânulos armazenam principalmente fatores de crescimento diretamente relacionados com o processo cicatricial, entre eles: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), TGF- β 2, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-I) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (ANITUA et al., 2005; WEIBRICH et al., 2005). O quadro 1.1 mostra as principais funções de cada fator de crescimento:

Quadro 1.1. Efeitos dos fatores de crescimento plaquetários mais conhecidos.

	PDGF	TGF- β	IGF-I	VEGF	b-FGF	EGF	HGF	PDAF
Mitogênese	++	+	++		+-	++		+
Quimiotaxia	++	+	++		+	+		
Diferenciação			+			+		
Angiogênese	++		++	++	++		+	+
Síntese de MEC (colágeno, COMP)	Colag I +	COMP +	Colag +		Colag I e III +			+
Anti-inflamatório		++						

Fonte: Oleza (2009).

Normalmente, as plaquetas encontram-se no estado inativo (EVERTS et al., 2006). A sua ativação pode ser realizada por agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaqueta, serotonina e epinefrina) e

farmacológicos (ionóforo de cálcio, cloreto de cálcio e análogos de endoperóxido cíclico) (CARMONA et al., 2007). Após a estimulação agonista, através da ligação com receptores de membrana, os α -grânulos plaquetários liberam proteínas por exocitose no local de lesão para iniciar o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas (HARRISON e CRAMER, 1993).

De acordo com Oleza (2009), os fatores de crescimento são moléculas proteicas que regulam o metabolismo celular, aceleram a cicatrização tissular por meio da estimulação e proliferação celular, pelo incremento da síntese de matriz extracelular e estimulando uma neovascularização. Além dos efeitos anabólicos, esses fatores inibem as citocinas catabólicas que degradam a matriz, tais como as interleucinas e as metaloproteinases (MMP). Segundo Dahlgren et al. (2001), esses peptídeos sinalizadores regulam o metabolismo celular pela interação com um organizado complexo de receptores de superfície celular, pelas vias de sinalização intracelular e, finalmente, pelo aumento da transcrição de fatores e produção de proteínas que resultam na proliferação e diferenciação celular, como também no aumento da matriz extracelular. O receptor tecidual aos quais os FC se ligam é o receptor tirosina-quinase, e sua ativação inicia uma sinalização de informações para genes responsáveis pelo controle da divisão celular, iniciando uma cascata que induz a reparação e regeneração tecidual (SCHLIEPHAKE, 2002).

Os fatores de crescimento podem ser classificados em dois grupos: morfométricos e mitogênicos. Os morfométricos estão envolvidos no crescimento ósseo através da transformação de células-tronco mesenquimais multipotentes em células osteoprogenitoras, na presença da proteína óssea morfogênica (BMPs) (HOCK e CANALIS, 1994). Já os FC mitogênicos estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese (MAIA, 2008) . De acordo com Werner e Grose (2003), o TGF- β , EGF e o IGF agem sinergicamente melhorando o acesso das células inflamatórias à área da lesão, assim como na angiogênese, fibroplasia e regeneração da pele.

De acordo com Bennet e Schultz (1993) e Klein et al. (2002), o TGF- β tem um papel importante na cicatrização de feridas através de numerosas atividades, incluindo o recrutamento de macrófagos e fibroblastos e de estimulação da produção

de colágeno. Além disso, o TGF- β inibe as metaloproteinases de matriz e diminui a atividade das proteinases.

1.4.7.2 Preparo do PRP

Segundo Oleza (2009), o PRP está emergindo como um método econômico para obtenção e administração de fatores de crescimento autólogos. Reconhecem-se algumas vantagens: é rico em FC e contém proteínas biologicamente ativas; possibilita a ação conjunta de múltiplos FC ao mesmo tempo; incrementa a vascularização dos tecidos através da estimulação da angiogênese; proporciona um imediato agente hemostático biocompatível, efetivo e seguro que é absorvido pelo organismo iniciando uma regeneração local; estimula a quimiotaxia, diferenciação e multiplicação de várias linhagens celulares; estimula a síntese de matriz extracelular e ácido hialurônico; acelera a regeneração de tecidos moles e inicia a cascata de osteogêneses em um implante; a nível dérmico, acelera os processos de reparação de tecidos estimulando a epitelização e reduz a dor. Por ser autólogo, não há risco de transmissão de enfermidades infecciosas e sua tolerância é excelente. O tempo de preparação é breve (20-30 minutos); se concentra as plaquetas entre 2,5 e 10 vezes o nível sanguíneo basal, segundo o procedimento de obtenção empregado, e se obtém o volume necessário facilmente. Além do que, sabe-se que existe uma correlação positiva entre a concentração de plaquetas e concentração dos FC. Sendo assim, o maior fator limitante para a utilização do PRP, seria a trombocitopenia (OLEZA, 2009).

Na sua composição, o PRP também possui outros componentes além das plaquetas. Contém alguns eritrócitos e leucócitos, células mesenquimais e várias proteínas do soro em circulação (por exemplo: fibrinogênio, fibrina, fibronectina e trombospondina). Algumas dessas proteínas circulantes também estão envolvidas no processo de cicatrização, porém o maior interesse se encontra nos FC presentes nos α -grânulos (OLEZA, 2009).

Alguns autores relataram possíveis reações inflamatórias observadas após a administração de PRP, e as relacionaram à eventual presença de leucócitos e sua concentração final após a preparação (SMITH et al., 2003; WADHWA et al., 2003;

FORTIER, 2008). Durante o processo usado para fazer a centrifugação do PRP, os leucócitos também são concentrados, em relação ao sangue total, embora em menor grau do que as plaquetas (SUTTER et al, 2004). Isto pode representar uma preocupação em esforços de regeneração tecidual, pois estas células sanguíneas contêm mediadores pró-inflamatórios, tais como proteases e hidrolases (COPPINGER et al., 2004; PIETRZAK e EPPLEY, 2005). Entretanto, Schnabel et al. (2007), sugerem que os fatores de crescimento anabólicos liberados pelo PRP prevalece sobre os mediadores potencialmente catabólicos ou pró-inflamatórios liberados pelos leucócitos.

Marx (2004) afirmou que a chave do efeito regenerativo dos fatores de crescimento está associada com a utilização de “plaquetas vivas”. Sendo assim, as plaquetas devem ser manipuladas com delicadeza durante a coleta do sangue e preparo e administração do PRP.

Em relação ao protocolo de obtenção, existem vários procedimentos sendo estudados e comparados em relação aos custos e concentração de plaquetas obtidas. Em estudo *in vitro* com fragmentos do TFDS de equinos, Schnabel et al. (2007) demonstraram a eficiência do PRP utilizando concentração média de 395.000 plaquetas. μL^{-1} . Porém, segundo Barbosa et al. (2006), a concentração de plaquetas no PRP depende da contagem inicial no sangue total, ou seja, quanto maior o número inicial de plaquetas mais rico em plaquetas será o PRP.

Oleza (2009) afirmou que os fatores de crescimento atuam ligando-se a receptores presentes na superfície das membranas celulares ativando cascatas de sinalização intracelular. Uma vez que os receptores estão ocupados pelo FC, estes são internalizados pela célula de modo que o sinal de estímulo não atue permanentemente, o que poderia levar a uma proliferação celular e crescimento descontrolado (tal como no câncer). Assim, uma vez que a população de receptores celulares está saturada, adicionar mais fatores de crescimento não parece fazer muito sentido. Concentrações ótimas para o tratamento de lesões de tecidos de cavalos são desconhecidas, mas sabe-se que em tecidos normais (TFDS e músculo interósseo) a resposta aos FC é maximizada quando a concentração de plaquetas é quatro vezes maior do que o plasma normal (SCHNABEL et al., 2008).

Whitman et al (1997) introduziu o uso de gel de plaquetas autólogas em cirurgias maxilo-facial humana como um substituto para a cola de fibrina autóloga (MATRAS, 1982). Depois disso, muitos dispositivos, métodos automatizados, semi-automatizados e manual foram desenvolvidos para a concentração de plaquetas em humanos (ZIMMERMANN et al., 2001; APPEL et al., 2002; WEIBRICHB, 2003; EPPLEY et al., 2004). Segundo Carmona et al. (2011), todas as técnicas utilizadas para preparar PRP têm vantagens e desvantagens. Não foi ainda desenvolvido um método ou dispositivo ideal para concentrar as plaquetas e fatores de crescimento. Métodos manuais (tubo) são simples e baratos, mas exigem manipulação asséptica rigorosa para evitar a contaminação bacteriana (WEIBRICH et al., 2005; TAMIMI et al., 2007; ALVAREZ et al., 2010).

Na Medicina Veterinária, a técnica para a obtenção do PRP é baseada na utilizada para a espécie humana. Pode ser obtido através da coleta do sangue total em tubos ou bolsas de sangue contendo o anticoagulante citrato de sódio 3,8%, seguida de centrifugação e, ativação, ou não, do concentrado de plaquetas (CARTER et al., 2003; SUTTER et al., 2004; BARBOSA, 2006; CARMONA, 2006; SCHANABEL et al., 2007). É importante ressaltar que, segundo a literatura, são utilizadas normalmente duas centrifugações, sendo a velocidade de rotação da segunda superior à primeira (BARBOSA, 2006; CARMONA et al., 2007).

Em equinos, duas outras técnicas ainda são descritas: aferése (filtragem automatizada do sangue realizada em equipamento próprio, em ambiente fechado) e “*buffy coat*” (método semi-automatizado que utiliza bolsas de sangue submetidas à centrifugação de alta velocidade seguida) (CARTER et al., 2003; SUTTER et al., 2004). Essas duas técnicas são eficientes, porém ainda apresentam algumas restrições técnicas e econômicas para sua inclusão na rotina da medicina equina (RAMÍREZ, 2006). Por exemplo, o método de aferése só pode ser realizado em laboratórios especializados (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998; CARTER et al., 2003). Em contrapartida, o método de “*buffy coat*” é muito oneroso (SUTTER et al., 2004).

1.4.8 USO DO PRP EM TENDINITES

O PRP, inicialmente, foi utilizado no tratamento de feridas crônicas e em cirurgias maxilofaciais e oral, e mais recentemente tem sido investigado na regeneração óssea, cartilaginosa e tendínea (SCHNABEL et al., 2007). Anitua et al., 2005, documentou um efeito positivo dos FC plaquetários em tenócitos humanos. Neste estudo, os FC produziram proliferação dos tenócitos e aumento de expressão de dois peptídeos angiogênicos (VEGF e HGF).

Segundo Ramírez (2006), os FC aparentam ser promissores no tratamento de lesões de tecidos moles em doenças musculoesqueléticas por promoverem a vascularização dos tecidos afetados. O TGF- β , PDGF, VEGF e HGF produzem intensa neovascularização dos tendões. E este novo suprimento sanguíneo melhora a atividade metabólica dos tenócitos. Bem como, o IGF-I e bFGF estimulam a proliferação dos tenócitos e incremento da síntese da MEC. De acordo com Klein et al. (2002), a sua utilização, em lesões tendíneas, se baseia na atuação dos fatores de crescimento secretados pelos α -grânulos, os quais têm sido avaliados de acordo com sua capacidade de aumentar a mitogênese dos tenócitos e a síntese de matriz extracelular, incluindo o colágeno do tipo I e III.

Além do que, sabe-se da presença de algumas citocinas catabólicas durante a lesão tendínea, como o TNF- α , a IL-1 α e IL-1 β , que geram efeitos catabólicos e inflamatórios prejudiciais às células locais e MEC. Esses efeitos gerados pelo TNF- α e IL-1 α nos tecidos conjuntivos, podem ser regulados e minimizados através de alguns fatores de crescimento (RAMÍREZ, 2006). Estudos *in vitro* têm demonstrado essas propriedades benéficas do TGF- β , IGF-I, VEGF, FGF, EGF e PDGF no metabolismo tendíneo de diversas espécies (DALGHREN et al., 2001; ANITUA et al., 2004).

Dahlgren et al. (2002), descreveu efeitos positivos do IGF-I em modelo de tendinite do TFDS induzida por colagenase. O resultado desse estudo sugere benefício na utilização de fatores de crescimento como tratamento complementar em lesões de tecido conjuntivo.

Para o entendimento da atuação desses FC, deve-se conhecer a sequência de intervenção dos mesmos nos tendões. Sabe-se que o IGF-I se expressa durante toda fase inicial da inflamação, mantendo níveis superiores aos normais entre a

segunda e oitava semana e com um pico máximo ao redor da quarta semana e intervém na proliferação e migração de fibroblastos e tenócitos e, conseqüentemente, síntese de colágeno e matriz extracelular (MOLLOY et al., 2003; DAHLGREN et al., 2005).

O TGF- β_1 está presente durante toda fase inflamatória, elevando sua expressão gênica a partir da primeira semana e mantendo-se elevada durante 24 semanas (MOLLOY et al., 2003; DAHLGREN et al., 2005). O TGF- β possui vários efeitos sobre a migração e proliferação celular e possui efeito anti-inflamatório neutralizando e inibindo a atividade das metaloproteinases e expressão de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, que se encontram ausentes no tendão sadio (OLEZA, 2009).

O VEGF é produzido após a fase inflamatória, que é quando ocorre o estímulo sobre a angiogênese, possui certo efeito estimulante sobre a expressão do TGF- β , porém não possui efeito sobre o colágeno (DAHLGREN et al., 2005).

O PDGF está presente logo após a ocorrência da lesão e estimula a produção de outros fatores de crescimento, incluindo o IGF-I e TGF- β_1 . E o b-FGF é um potente estimulador da angiogênese e um regulador da migração e proliferação celular e síntese de colágeno (MOLLOY et al., 2003; DAHLGREN et al., 2005).

Em cultivos de explantes de TFDS, se tem notado que o PRP, em comparação com aspirados de medula óssea, apresentam um melhor balanço anabólico, com uma melhor relação de colágeno tipo I em relação ao colágeno tipo III e uma menor expressão de metaloproteinases, como consequência provável de um maior aporte de TGF- β e PDGF e um menor número de leucócitos no preparado (McCARREL e FORTIER, 2009).

A atuação desses fatores de crescimento a nível celular se dá através de sua ligação com receptores tirosina-kinase (TKR) contidos nas membranas celulares. Através dessa união, ativam-se proteínas mensageiras que sinalizam o núcleo celular, que por sua vez, ativa os genes responsáveis pelo controle da divisão celular, produzindo uma resposta biológica que induz a reparação e regeneração tissular. A secreção desses fatores pode atuar estimulando a própria célula secretora, células adjacentes ou ainda células de fenótipos diferentes em um lugar anatômico distinto, ressaltando que os FC não são exclusivos das plaquetas e muitos deles são sintetizados e encontrados em outros tecidos (OLEZA, 2009).

Segundo Oleza (2009), os motivos básicos que levam a utilização do PRP no tratamento de tendinites são: seus efeitos sobre a estrutura do tendão (neutralização ou atenuação dos mecanismos catabólicos da inflamação; estímulo anabólico regenerativo) e por seus efeitos sobre o controle da dor (inibição ou neutralização de citocinas próinflamatórias e substâncias que hipersensibilizam os nociceptores; estímulo sobre a síntese de ácido hialurônico; reequilíbrio homeostático).

CAPÍTULO II

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 ANIMAIS

Foram utilizados no experimento 10 equinos hígidos cedidos temporariamente pelo Regimento de Polícia Montada do Distrito Federal (RPMon-DF), sendo nove machos e uma fêmea, com idade entre seis e 28 anos.

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (ICB-UnB) por estar de acordo com os princípios éticos de pesquisa em animais, com protocolo UnBDOC nº54212/2011 (ANEXO 1).

Os animais foram submetidos a exame físico geral segundo Speirs (1999), sendo mensurados temperatura retal (TR), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), coloração de mucosas, grau de hidratação e tempo de preenchimento capilar (TPC). Da mesma forma, foram obtidos hemograma completo para a verificação do estado de hígidez dos animais para que então pudessem fazer parte do estudo, como apresentado na tabela 2.1. Adicionalmente, foi realizado exame estático e dinâmico do aparelho locomotor (McILWRAITH, 2006), bem como ultrassonográfico da região metacárpica/metatársica palmar/plantar dos membros torácicos e pélvicos. O exame ultrassonográfico foi realizado com equipamento portátil Kaixin 5000, probe linear de 7,5 MHz em planos longitudinal e transversal. Foram avaliados o paralelismo de fibras, presença de lesões, fibroses e aderências. Foram utilizados no estudo apenas animais que não apresentavam alterações clínicas gerais e associadas ao sistema musculoesquelético.

Tabela 2.1. Valores das variáveis hematológicas referentes ao número de hemácias, hematócrito, número de leucócitos, proteínas plasmáticas totais e plaquetas, obtidas dos animais do estudo.

Animal	Hem (x10⁶/μL)	VG (%)	Leuc (x10³/ μL)	PPT (g/dL)	Plt (x 10³/mL)
I	6,49	23	5,1	6,2	165
II	6,43	21	6,7	6,4	300
III	6,18	27	7,0	6,0	200
IV	5,37	33	9,2	5,8	300
V	5,15	21	6,8	6,2	195
VI	5,77	28	8,5	6,4	360
VII	6,31	28	7,0	6,0	170
VIII	6,04	19	10,9	4,8	230
IX	5,59	29	8,7	6,0	175
X	6,49	24	8,1	6,4	170

*hemácias (Hem), volume globular (VG), leucócitos (Leuc), proteínas totais (PPT) e plaquetas (Plt)

Durante o experimento, os animais permaneceram em baias individuais, recebendo alimentação a base de ração comercial e feno de “Coast cross”. Sal mineral e água foram oferecidos *ad libitum*. Os animais foram previamente vacinados e vermifugados conforme o manejo seguido pelo Regimento de Polícia Montada do Distrito Federal (RPMon-DF).

2.1.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o delineamento e execução do experimento os animais foram separados em dois grupos, sendo um grupo tratado aos sete dias (G7) e o outro aos 14 dias (G14) após a indução da lesão pela colagenase. Cada animal foi seu próprio controle. Sendo assim, um membro recebeu injeção de solução salina 0,9% e o outro membro, do mesmo animal, recebeu a aplicação do plasma rico em plaquetas (PRP) conforme o grupo em questão. Os grupos foram subdivididos e definidos como **G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP

aos 14 dias). Nos animais do G7, foram utilizados apenas os membros torácicos, enquanto que no G14, houve uma distribuição aleatória incluindo os membros torácicos e o membro pélvico esquerdo.

2.1.3 INDUÇÃO DA TENDINITE COM COLAGENASE

No dia anterior à indução da tendinite, os membros foram tricotomizados na região metacárpica/metatársica palmar/plantar. A tendinite do TFDS foi induzida mediante a administração de 2,5 mg de colagenase tipo I liofilizada (Gibco) diluídos em 1 mL de solução salina 0,9%. A enzima foi pesada em uma balança de precisão e acondicionadas em tubos estéreis para posterior diluição e esterilização através de filtro Millipore de 0,22µm no momento da aplicação intratendínea. Para a administração da colagenase, os animais foram contidos em brete e sedados com Xilazina 10% na dose de 1mg/kg por via intravenosa. Adicionalmente, foram realizados bloqueios anestésicos locais dos nervos palmares medial e lateral na região metacárpica proximal utilizando 5mL de cloridrato de lidocaína 2% (Xylestesin®) sem vasoconstritor em cada ponto de aplicação como mostra a figura 2.1. Em seguida, foi realizada antissepsia do terço médio palmar da região metacárpica/metatársica com gluconato de clorexidina degermante e solução alcoólica de gluconato de clorexidina (Riohex®) e álcool 70% (Itajá®). A administração da colagenase foi guiada com o auxílio de um transdutor linear ultrassonográfico de 7,5MHz. A colagenase foi aplicada na região palmar do TFDS, no ponto médio da extensão do TFDS, localizado entre a borda distal do osso acessório do carpo e proximal dos ossos sesamóides proximais. A colagenase foi aplicada no centro do tendão, guiada pela ultrassonografia, utilizando agulha hipodérmica 0,80x30mm. Para a orientação dos exames ultrassonográficos posteriores, foi realizada tricotomia ao redor da região no local exato de aplicação, um centímetro abaixo e um centímetro acima (Figura 2.2).



Figura 2.1 Vista lateral esquerda do membro torácico de um equino ilustrando os pontos de bloqueios perineurais dos nervos palmares laterais utilizados no experimento.



Figura 2.2. Vista lateral esquerda do terço médio do membro torácico esquerdo de um equino ilustrando com uma seta vermelha o local que foi realizada a tricotomia de referência.

O dia da indução da lesão tendínea foi considerado o dia zero do experimento (D0). Após a aplicação da colagenase, os animais receberam uma bandagem com algodão (Farol) e atadura de 15cm (Cremer), que permaneceu por 48 horas até o segundo exame ultrassonográfico realizado no D2. No período compreendido entre indução e o início do tratamento, os animais permaneceram em repouso nas baias.

Optou-se pela não utilização de anti-inflamatórios não esteroidais como analgésico devido sua possível interferência com a indução da tendinite e porque poderia ocasionar dúvidas em relação à eficácia do tratamento proposto. Há evidências de que sua utilização diminui os benefícios do PRP (FORTIER, 2009). No entanto, se caso o animal apresentasse sinais de dor pré ou pós-tratamento, essa analgesia seria realizada através de meperidina de 1 a 2mg/kg (MASSONE, 2003).

2.1.4 PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

A obtenção do PRP foi realizada conforme a técnica preconizada por Rajão et al. (2010), em que foram coletados 84 mL de sangue, através de punção da jugular, em 24 tubos a vácuo (Vacuette®) com capacidade para 3,5mL contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,2%. Os tubos foram centrifugados primeiramente a 200g por 3 minutos. A metade mais superficial do plasma foi descartada e os 50% restantes foram centrifugados a 600g por 6 minutos. Após a segunda centrifugação, os primeiros 75% do plasma foram descartados e assim se obteve a fração de PRP com os 25% restantes (Figura 2.3). O sangue total, bem como a fração de PRP, foram submetidos à contagem manual de plaquetas, de acordo com o método de Brecher. (Tabela 2.2). Todas as amostras foram utilizadas logo após a sua preparação.

O método de contagem de plaquetas consistiu em pipetar 1,0 mL da solução diluidora (líquido diluidor de Brecher) em um tubo sem EDTA. Adicionou-se 10 µL de sangue total ou PRP (dependendo se tratava da contagem prévia ou pós centrifugação). Posteriormente agitou-se o tubo por inversão durante 2 minutos e os retículos da câmara de Neubauer foram preenchidos com esta solução. Para que ocorresse a sedimentação das plaquetas, a câmara permaneceu em repouso por 20 minutos em uma placa de Petri contendo algodão umedecido em água destilada. Por fim, foi realizada contagem das plaquetas que estavam no retículo central, empregando-se microscópio óptico. Para determinação final do número de plaquetas encontradas, multiplicou-se o valor obtido por 2000.

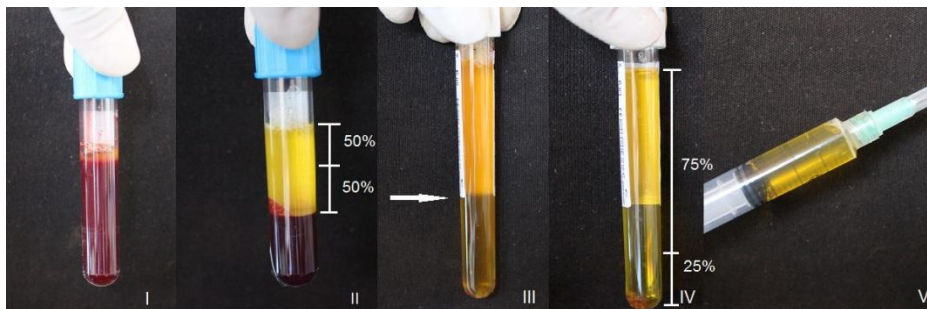


Figura 2.3. Diferentes momentos desde o sangue total (I), sangue total após centrifugação dividido em duas frações (concentrado de hemácias mais leucócitos e plasma) (II), 50% do plasma que sofrerá a segunda centrifugação (III), plasma após a centrifugação do qual será retirado 25% para o plasma rico em plaquetas (IV) até a obtenção do plasma rico em plaquetas (V).

2.1.5. APLICAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Nos D7 ou D14, dependendo do grupo ao qual o animal fazia parte, foi realizado o procedimento de aplicação intralesional de 2,5mL de PRP ou 2,5 mL solução salina 0,9%, conforme o membro em questão. Para aplicação, foi seguido o mesmo protocolo de contenção e antisepsia para a aplicação de colagenase, porém foi acrescido com a administração de Acepromazina (Acepran® 1%) intravenosa na dose de 0,1mg/kg, 15 minutos antes da administração da Xilazina 10% (Xylamax®). A aplicação foi guiada por exame ultrassonográfico no local marcado anteriormente (Figura 2.4).

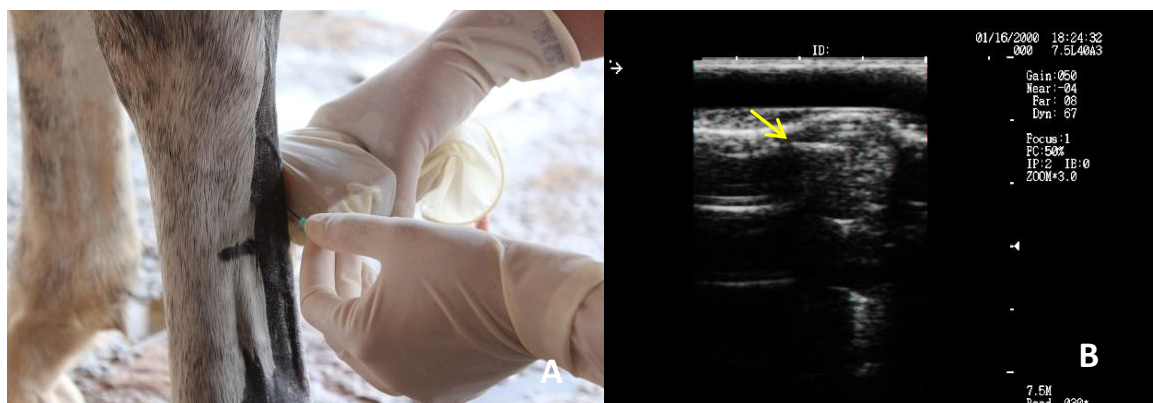


Figura 2.4. Demonstração da aplicação intralesional guiada por ultrassom (A) e a imagem ultrassonográfica no momento com a seta indicando a agulha hipodérmica.

2.1.6 FISIOTERAPIA

Seguindo o protocolo proposto por Fortier (2009), após o tratamento os animais permaneceram acomodados em baias. No dia seguinte ao tratamento (D8 ou D15), foi iniciado o exercício controlado, ou seja, caminhada em piso plano e duro sendo puxados por cabresto durante 10 minutos na primeira semana, com acréscimos de 5 minutos por semana, chegando ao máximo de 30 minutos até o final do experimento.

2.1.7 ACOMPANHAMENTO ULTRASSONOGRÁFICO

Os exames ultrassonográficos de acompanhamento da evolução da tendinite foram realizados com o equipamento portátil Kaixin 5000, probe linear de 7,5 MHz em planos longitudinal e transversal, nas três alturas marcadas anteriormente através de tricotomia. As avaliações foram realizadas nos D0, D2, D7, D14 e semanalmente até D49. As imagens obtidas foram gravadas e armazenadas para posterior comparação entre os membros nos diferentes momentos avaliados. Foram avaliados os parâmetros: área transversal do TFDS, área transversal da lesão, ecogenicidade das lesões e paralelismo das fibras. Para a mensuração das ATT e ATL foi utilizado o programa de análise de imagens Image-J. Para a obtenção dos dados referentes à ecogenicidade e paralelismo de fibras, as imagens foram analisadas e graduadas por cinco pessoas diferentes, para minimizar a subjetivação de dados. A ecogenicidade, foi graduada de 0 a IV, de acordo com Genovese et al. (1986), sendo:

0= Normal (isoecóico)

I= Redução em 25% do padrão isoecóico (predominantemente isoecóico)

II= Redução em 50%

III= Redução em 75% (predominantemente anecóico)

IV= Redução em 100% (totalmente anecóico)

O paralelismo foi graduado em uma escala de 0 a III, de acordo com Alves et al. (2001), sendo:

0= Ausência de paralelismo

I= Paralelismo discreto

II= Paralelismo parcial

III= Paralelismo total

2.1.8 EXAMES FÍSICOS

Foram realizados exames físicos no dia da administração da colagenase (D0) e nos dias D2, D7 (dia do tratamento do G7), D14 (dia do tratamento do G14) e semanalmente após o tratamento até D49, aonde se avaliou a sensibilidade dolorosa em uma escala de zero a IV, sendo 0=insensível, I= levemente sensível, II= moderadamente sensível, III= sensível e IV=dor intensa; o calor do local em uma escala de zero a III, sendo zero= temperatura corporal, I= calor leve, II= calor moderado e III= grau intenso de calor; e pulso digital em uma escala de zero a III, sendo 0= ausência de pulso digital evidente, I=pulso digital leve, II=pulso digital moderado e III= pulso digital evidente forte. Juntamente, foi realizado o exame clínico para monitoramento do estado geral de saúde dos animais (SPEIRS, 1999).

Para determinação da presença ou não de edema, foram realizadas medidas do perímetro do metacarpo/metatarso, empregando, para tanto, uma fita métrica aonde foi induzida a tendinite. Foram realizadas três medidas, uma na altura da indução da tendinite (terço médio); uma na borda distal do osso acessório do carpo ou na borda distal do osso calcâneo; e outra na borda proximal dos sesamóides proximais, conforme figura 2.5.



Figura 2.5. Fotografias da vista lateral esquerda do terço médio da mão de equino visando a mensuração dos perímetros da região metacárpica de P1 (A), P2 (B) e P3 (C).

2.1.9 ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise, os dados referentes à concentração de plaquetas, FC, FR, TR, ATT, ATL, perímetros, ecogenicidade e paralelismo de fibras foram submetidos a análise descritiva, obtendo-se a média e o erro padrão. Em seguida, os dados relativos a ATT, ATL, ecogenicidade e paralelismo de fibras foram submetidos a aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, visando a verificação da distribuição normal. Na sequência, esses dados foram submetidos ao teste ANOVA e como pós-teste Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%. Foi realizada a análise de frequência para a ecogenicidade, paralelismo de fibras, sensibilidade, calor e pulso. Auxiliando desta forma o entendimento e verificando qual a relação existente entre os diferentes dias de tratamento a partir da indução da tendinite, conforme os diferentes protocolos. Foram utilizados os programas Stat3_5 e GraphPad Prism 5.

2.2 RESULTADOS

A indução da tendinite se mostrou eficaz. Foram observadas lesões ultrassonográficas em todos os membros avaliados, bem como sinais de inflamação como dor e calor local do D2 ao D7 (dois a sete dias após a administração da collagenase). Os achados mais pertinentes à indução da lesão foram: presença de edema peritendíneo, perda do paralelismo perfeito das fibras colágenas e a visibilização inicial da lesão mediante perda de ecogenicidade. Não houve sensibilidade exacerbada em nenhum dos animais, não sendo administrada a meperidina. Nenhum animal apresentou relutância em se locomover durante o exercício gradativo e controlado, embora alguns animais ainda estivessem apresentando dor à palpação local.

A concentração de plaquetas no sangue utilizado para o preparo do PRP variou de 180 a 300 x 10³/μL e as concentrações encontradas no PRP variaram de 370 a 695 x 10³/μL (média±erro padrão= 503,45±28,939 x 10³/ μL). Sendo assim, houve uma concentração de plaquetas de 1,48 a 2,82 vezes (2,148±0,0978),

evidenciando a eficácia do protocolo utilizado para a obtenção do PRP, conforme mostra a tabela 2.2:

Tabela 2.2. Concentração total de plaquetas no sangue total ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e no plasma rico em plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP).

ANIMAL	SANGUE TOTAL ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PRP ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	CONCENTRAÇÃO (n° de vezes)
I	200	425	2,125
II	285	545	1,912
III	250	370	1,480
IV	205	450	2,195
V	185	523	2,827
VI	290	625	2,155
VII	300	695	2,316
VIII	265	550	2,075
IX	230	480	2,086
X	180	425	2,361
XI	215	450	2,093
média±erro padrão	236,818±13,113	503,45±28,939	2,148±0,0978

Durante as avaliações clínicas dos animais, tanto na fase pré-experimental como na fase experimental, não foram observadas alterações de postura, comportamento, grau de hidratação, mucosas, TPC, FC, FR e motilidade intestinal.

Os valores referentes às áreas transversais dos tendões (ATT) não apresentaram diferença estatística nem entre os tempos das avaliações, nem dentre os quatro grupos (Tabela 2.3).

Em relação a área transversal da lesão (ATL) (Tabela 2.4), o G7c apresentou uma redução da lesão, em relação aos D7 e D14, à partir do D42 ($p < 0,05$). Já o G7t apresentou essa redução da lesão a partir do D35 e de forma mais significativa

($p < 0,05$). Quando essa variável foi comparada entre os grupos G7c e G7t no mesmo tempo, houve diferença a partir do D35 (Figura 2.6). Notou-se que as áreas das lesões (ATL) do grupo tratado com PRP aos sete dias obtiveram maior redução, ao longo do estudo, bem como diminuição da área transversal da lesão de forma contínua. Por outro lado, no grupo controle, a área da lesão aumentou no D28, passando de uma média de $25,48\text{mm}^2$ para $28,98\text{mm}^2$.

Já os animais que receberam o tratamento aos 14 dias, não apresentaram diferença da ATL entre os tempos de avaliação ($p < 0,05$). Porém, o G14t apresentou maior redução da lesão, quando comparado ao G14c. Ambos os grupos tratados mantiveram padrão semelhante, com início dessa redução da ATL uma semana após a aplicação do PRP.

Tabela 2.3. Valores médios e erro padrão das áreas transversais do tendão (ATT) obtidos ultrassonograficamente em milímetros quadrados (mm^2) dos animais dos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.

Áreas transversais do tendão (ATT)	D0	D2	D7	D14	D21
G7c	117,54±4,30	119,87±6,24	126,92±4,42	125,17±2,83	117,58±4,52
G7t	117,77±3,55	139,06±11,20	132,72±4,16	122,93±3,72	128,20±7,38
G14c	127,07±6,21	118,13±12,89	145,98±9,68	134,12±6,82	135,63±6,77
G14t	131,40±7,79	136,54±9,51	141,14±7,79	132,49±4,77	137,99±8,92
Áreas transversais do tendão (ATT)	D28	D35	D42	D49	
G7c	114,36±5,56	115,32±4,14	113,07±3,45	121,82±5,70	
G7t	126,46±4,84	107,34±9,08	119,25±3,63	117,05±5,13	
G14c	132,74±6,79	119,98±3,48	136,93±7,38	120,39±4,76	
G14t	134,72±8,51	126,66±3,93	120,48±4,95	124,96±3,79	

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

TABELA 2. 4 - Valores médios e erro padrão das áreas transversais da lesão (ATL) obtidos ultrassonograficamente em milímetros quadrados (mm²) dos animais dos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.

Áreas transversais da lesão (ATL)	D2	D7	D14	D21
G7c	17,34±1,27	21,78±2,91 ^b	26,43±2,83 ^b	25,48±1,83
G7t	18,42±1,72	22,64±1,94 ^a	26,93±3,44 ^a	25,25±3,57
G14c	24,85±3,53	27,82±2,53	24,07±2,10	24,67±2,74
G14t	21,85±1,92	20,79±1,93	21,56±1,72	18,86±1,54
Áreas transversais da lesão (ATL)	D28	D35	D42	D49
G7c	28,98±3,35	25,13±3,70	12,24±1,31 ^b	10,69±1,53 ^b
G7t	24,04±3,77	10,83±1,96 ^a	6,77±1,41 ^a	3,22±1,18 ^a
G14c	18,57±2,34	20,35±2,57	20,25±3,62	20,08±2,89
G14t	15,93±1,48	14,42±1,83	15,30±3,74	16,78±3,36

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

**Entre as colunas diferentes, na mesma linha, com letras iguais representam diferença estatística de acordo com a aplicação de uma Análise de Variância simples e pós-teste de Kruskal-Wallis, ambos com nível de significância de 5%.

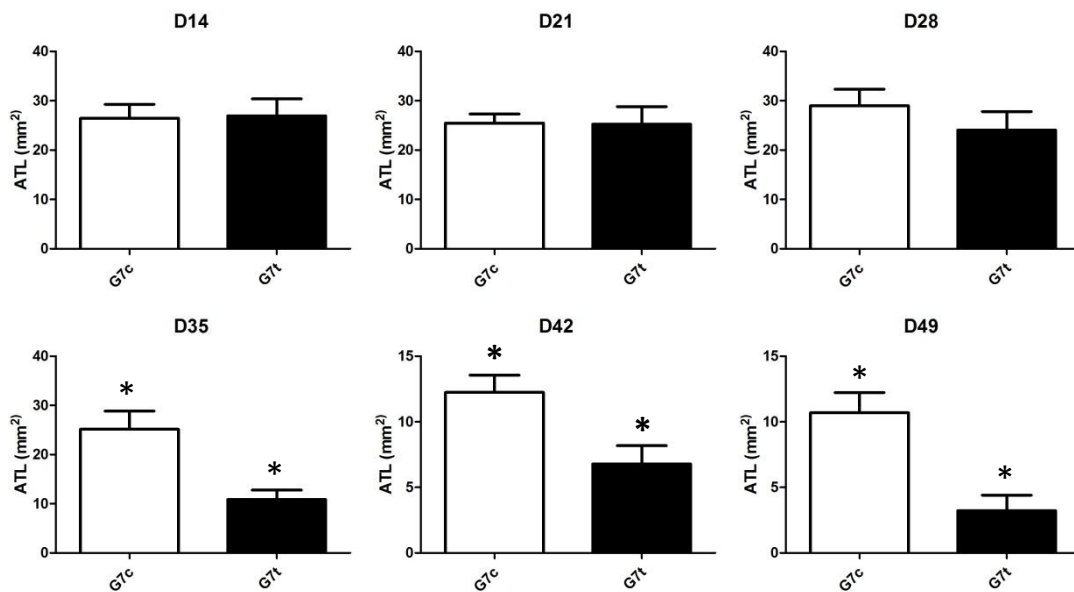


Figura 2.6. Representações gráficas das áreas transversais das lesões em milímetros entre os G7c e G7t em relação aos dias avaliados (* $p \leq 0,05$).

Os dados referentes à ecogenicidade estão apresentados na tabela 2.5. De acordo com o teste ANOVA, com pós-teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$), nenhum dos grupos apresentou diferença em relação à esta variável.

O G7t apresentou discreta melhora da ecogenicidade no membro que recebeu o PRP a partir do D35, conforme a tabela 2.5.

No confronto dos grupos G14t e G14c, a ecogenicidade do G14t foi melhor em relação ao G14c no D21. Ambos os grupos tratados (G7t e G14t), mantiveram certo padrão de redução da ecogenicidade semelhante até o D42. No último dia de acompanhamento (D49), os grupos que receberam o PRP apresentaram melhores ecogenicidade se comparados aos grupos controle.

Em todos os grupos as lesões apresentaram perdas de até 75% da ecogenicidade, variando de escore zero a três durante os diferentes momentos de avaliação pós-tratamento (tabela 2.5).

Tabela 2.5. Distribuição da variação da ecogenicidade em porcentagem dos equinos avaliados nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.

Ecogenicidade %	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	46,6	44,4	4,4	0	8,8	38,2	26,4	23,5	6,6	66,6	14,4	10
G7t	48,0	34,6	7,6	9,6	4,3	47,8	43,4	4,3	17,5	49,4	25,7	7,2
G14c	23,4	53,1	21,8	1,5	5,2	43,8	26,3	21,0	6,5	52,4	22,9	18,0
G14t	41,2	38,0	19,0	1,5	3,5	59,6	26,3	8,7	8,1	67,2	16,3	8,1
	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	2,2	57,7	21,1	14,4	3,7	64,1	18,5	11,1	14,7	53,6	18,8	3,3
G7t	11,1	55,5	23,2	10,1	18,6	60,4	15,3	5,4	25	50	21,8	3,1
G14c	5,2	5,2	15,7	14,4	6,5	67,1	15,7	10,5	14,4	53,9	26,3	5,2
G14t	9,2	64,4	17,1	9,2	19,7	55,2	22,3	2,6	15,7	56,5	23,6	3,9
	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	11,5	59,4	20,2	5,7	5,3	77,3	10,6	6,6	9,3	69,3	16	4
G7t	23,6	48,6	27,6	0	22,5	58,7	17,5	1,2	21,2	65	8,7	5
G14c	8,4	70,4	16,9	4,2	17,1	48,6	28,9	5,2	11,8	75	10,5	2,6
G14t	19,7	60,5	18,4	1,3	18,4	63,1	17,1	1,3	17,1	69,7	13,1	0

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

**0 = padrão normal do tendão (isoecóico); escala I = redução em 25% do padrão isoecóico (predominantemente isoecóico); escala II = redução em 50% do padrão isoecóico; escala III = redução em 75% do padrão isoecóico (predominantemente anecóico); e escala IV = redução em 100% do padrão isoecóico (totalmente anecóico).

Durante esse mesmo período, o paralelismo de fibras colágenas variou entre os escores zero e três, sem apresentar diferenças entre os diferentes momentos e comportou-se semelhantemente entre os grupos (tabela 2.6).

Tabela 2.6. Valores relativos (%) das avaliações do paralelismo das fibras dos TFDS dos equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.

Paralelismo %	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	27,27	0	22,72	50	23,52	11,76	64,70	0	17,85	28,57	46,42	7,14
G7t	28,57	4,76	28,57	38,09	12,5	50	37,5	0	17,85	17,85	50	14,28
G14c	20	5	45	30	27,27	22,72	31,81	18,18	31,25	31,25	31,25	6,25
G14t	15	20	20	45	15,78	42,10	42,10	0	5	50	45	0
	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	13,33	43,33	36,66	6,66	11,11	25,92	51,85	11,11	9,52	38,09	38,09	14,28
G7t	6,66	23,33	63,33	6,66	0	33,33	48,14	18,51	0	14,28	52,38	33,33
G14c	4	32	48	16	8	48	20	24	4	40	52	4
G14t	0	52	32	16	4	28	48	20	0	40	56	4
	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	0	47,82	43,47	8,69	4	48	44	4	8	32	40	20
G7t	4	16	68	12	0	20	56	24	4	28	36	32
G14c	8	28	48	16	4,16	37,5	41,66	16,66	4	36	44	16
G14t	0	24	72	4	0	44	56	0	0	44	44	12

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

**0 = ausência de paralelismo, I = paralelismo discreto; II = paralelismo parcial e III = paralelismo total

A tabela 2.7 compila os dados referentes à sensibilidade dolorosa, Já no D14, 7 dias após a aplicação do PRP, houve uma melhora clínica nos animais do G7t, pois os animais apresentavam menor sensibilidade, comparado ao G7c. Esta melhora foi ainda mais evidente nos animais do G7t no D28, chegando a 100% de escore zero no D42, ou seja, sem sensibilidade dolorosa. Enquanto isso, no G7c apenas, 40% dos animais apresentaram sensibilidade zero no D42. Podemos notar que o início do efeito analgésico ocorreu uma semana antes do início da redução significativa da área da lesão (tabela 2.4).

Nos animais que receberam tratamento no D14 (G14t e G14c), pode-se verificar que o comportamento da sensibilidade foi semelhante entre os dois grupos, no D7. No D21 e D28, o G14t apresentou uma maior sensibilidade, com apenas 20%

dos animais com sensibilidade grau zero, comparativamente aos animais do G14c, com 60% dos animais sem sensibilidade. Aparentemente, este comportamento inverteu-se a partir do D42, apresentando melhora na sensibilidade no grupo tratado em relação ao grupo controle. No D42, 100% dos animais do grupo tratado apresentaram grau de sensibilidade entre zero e I, enquanto que no grupo controle 20% dos animais ainda apresentavam um grau de sensibilidade II. Essa redução na sensibilidade se iniciou a partir do D35. Esse fato revelou uma analgesia menos eficaz se comparada com a aplicação do PRP na fase aguda (07 dias após indução),. Enquanto 100% dos animais do G7t se apresentam sem sensibilidade dolorosa cinco semanas após a aplicação do PRP, 60% dos animais do G14t apresentam escores entre I e II no mesmo período pós-tratamento (tabela 2.7).

Tabela 2.7. Valores relativos (%) das avaliações da sensibilidade observadas nos locais de zero a IV em nos equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.

Sensibilidade %	D0					D2					D7				
	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV
G7c	75	25	0	0	0	0	0	25	50	25	0	50	50	0	0
G7t	100	0	0	0	0	0	0	50	25	25	25	25	50	0	0
G14c	100	0	0	0	0	20	0	60	0	20	25	25	25	25	0
G14t	100	0	0	0	0	20	40	20	20	0	25	50	25	0	0
	D14					D21					D28				
	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV
G7c	0	20	20	60	0	50	0	50	0	0	20	40	40	0	0
G7t	0	40	40	20	0	0	50	50	0	0	40	60	0	0	0
G14c	0	75	0	25	0	40	40	20	0	0	60	0	20	20	0
G14t	20	40	40	0	0	40	20	20	20	0	20	40	20	20	0
	D35					D42					D49				
	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV
G7c	20	20	60	0	0	40	60	0	0	0	60	20	20	0	0
G7t	40	60	0	0	0	100	0	0	0	0	80	20	0	0	0
G14c	40	40	20	0	0	60	20	20	0	0	40	20	20	20	0
G14t	40	40	0	20	0	80	20	0	0	0	40	40	20	0	0

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

**Insensível (ZERO), pouco sensível (I), moderadamente sensível (II), sensível (III) e intensamente sensível (IV).

Os dados referentes à avaliação de presença de calor local estão apresentados na tabela 2.8. No G7t, podemos notar que o aumento de temperatura local acompanhou o mesmo padrão da sensibilidade. Esse fato pode ser explicado pelo efeito anti-inflamatório de alguns fatores de crescimento liberados pelas plaquetas (tabela 2.8).

Em ambos os grupos que receberam tratamento aos 14 dias (G14t e G14c), a temperatura local não manteve um padrão, aumentando no D21 nos dois grupos e voltando a diminuir no D28, apresentando uma redução maior no grupo tratado. No D35 a temperatura local voltou a aumentar no G14t, igualando-se ao controle. Nos D42 e D49, a temperatura se manteve aumentada em relação à corporal no G14t enquanto que o G14c apresentou uma diminuição do parâmetro (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. Valores relativos (%) da variação da temperatura local no equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.

CALOR%	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	100	0	0	0	0	25	75	0	0	75	25	0
G7t	100	0	0	0	0	75	25	0	50	25	25	0
G14c	100	0	0	0	0	40	40	20	0	75	25	0
G14t	100	0	0	0	0	0	100	0	0	75	25	0
	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	0	60	20	20	25	50	25	0	0	80	20	0
G7t	20	40	40	0	0	75	25	0	60	20	20	0
G14c	25	25	50	0	0	80	20	0	60	40	0	0
G14t	40	0	60	0	20	20	40	20	20	60	20	0
	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	0	80	0	20	40	60	0	0	40	60	0	0
G7t	60	20	20	0	80	20	0	0	60	40	0	0
G14c	20	20	40	20	40	40	20	0	100	0	0	0
G14t	20	20	40	20	60	40	0	0	60	40	0	0

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

* Sem calor (ZERO); calor leve (I); calor moderado (II); e calor intenso (III).

A distribuição de frequência para o parâmetro pulso digital evidente está apresentada na tabela 2.9. O pulso digital não seguiu um padrão, ou seja, se manteve estável durante todo o tempo de acompanhamento dos animais e não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 2.9. Valores relativos (%) da variação do pulso digital de acordo com o escore zero a III, dos equinos avaliados durante o experimento, nos grupos G7c, G7t, G14c e G14t, de D0 a D49.

PULSO %	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	100	0	0	0	75	25	0	0	75	0	25	0
G7t	100	0	0	0	50	50	0	0	75	25	0	0
G14c	80	0	20	0	40	60	0	0	100	0	0	0
G14t	100	0	0	0	40	60	0	0	75	0	25	0
	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	75	25	0	0	75	25	0	0	100	0	0	0
G7t	100	0	0	0	75	25	0	0	100	0	0	0
G14c	100	0	0	0	60	40	0	0	100	0	0	0
G14t	80	20	0	0	80	20	0	0	100	0	0	0
	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
G7c	100	0	0	0	100	0	0	0	80	0	20	0
G7t	100	0	0	0	100	0	0	0	80	20	0	0
G14c	60	40	0	0	60	40	0	0	60	40	0	0
G14t	80	20	0	0	100	0	0	0	80	20	0	0

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

**Pulso digital evidente: ausente (ZERO); leve (I); moderado (II); intenso (III).

Os perímetros da região metacárpica não apresentaram diferenças entre os momentos de aferição e entre os grupos (Figura 2.7). As médias e erro padrão, em centímetros, variaram de $21,55 \pm 0,350$ a $22,98 \pm 0,510$; $21,707 \pm 0,350$ a $22,540 \pm 0,430$; $22,033 \pm 0,336$ a $23,240 \pm 0,490$ e $21,420 \pm 0,431$ a $22,527 \pm 0,651$, para os grupos G7c, G7t, G14c e G14t, respectivamente.

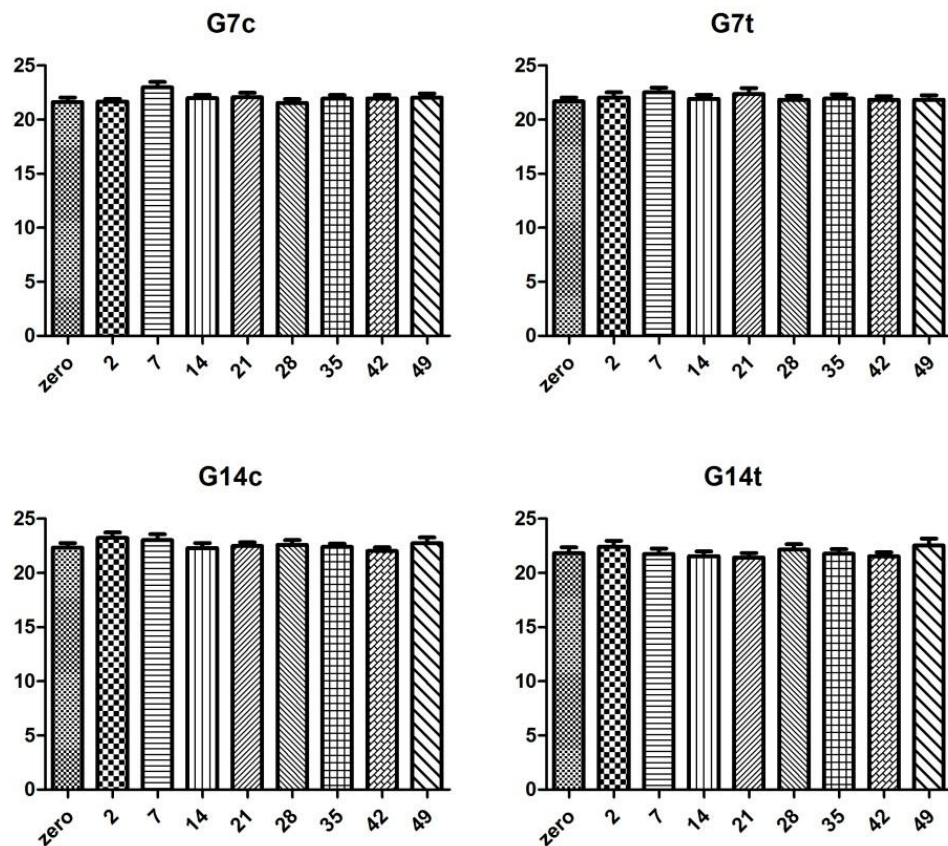


Figura 2.7. Representação gráfica dos valores absolutos das variações encontradas nos perímetros da região metacárpica e metatársica em centímetros em relação aos dias de avaliação entre cada um dos grupos de equinos empregados no estudo.

***G7c** (aplicação de solução salina aos 7 dias); **G7t** (aplicação de PRP aos 7 dias); **G14c** (aplicação de solução salina aos 14 dias); e **G14t** (aplicação de PRP aos 14 dias).

2.3 DISCUSSÃO

O modelo de indução de tendinite do TFDS pela colagenase se mostrou eficaz, assim como em diversos estudos de avaliação de reparação tecidual e comparação de diversos tratamentos (KEG et al., 1992; ALVES, 1998; REDDING et al., 1999; MARXEN et al., 2004; MAIA, 2008). Um aumento na sensibilidade dolorosa à palpação e aumento da temperatura local do tendão lesionado foi observado nas primeiras 48 horas, permanecendo até o dia do tratamento em ambos os grupos (tabelas 2.7 e 2.8, respectivamente), corroborando os achados de Marxen et al. (2004). As alterações ultrassonográficas de perda de ecogenicidade (tabela 2.5) e paralelismo de fibras (tabela 2.6) e clínicas de sensibilidade dolorosa à palpação (tabela 2.7) e aumento da temperatura local (tabela 2.8), encontradas após a indução da lesão, foram atribuídas à ação catabólica da colagenase sobre o tecido estudado, estando de acordo com Marxen et al. (2004) e Maia (2008), que também encontraram alterações nos sonogramas do TFDS após a administração da enzima e atribuíram essas alterações à sua ação sobre as fibras de colágeno.

O processamento manual do sangue total para a obtenção do PRP com o protocolo empregado para este trabalho se mostrou satisfatório. A concentração de plaquetas do sangue total utilizado encontrava-se dentro dos níveis fisiológicos preconizados para equinos, que é de 100.000 a 365.000 x 10³/ μL (tabela 2.2) (MAIA, 2008). Sendo assim, nenhum animal teve de ser retirado do experimento devido à trombocitopenia, que segundo Barbosa et al. (2006) e Oleza (2009) é um fator limitante na obtenção de concentrações plaquetárias ideais no PRP. Ainda segundo Anitua et al. (2004), a concentração de plaquetas no PRP deve ser superior à 300 x 10³/ μL, e as concentrações de plaquetas obtidas foram superiores a esse valor.

A concentração média de plaquetas no PRP, neste estudo (503,45 x 10³/ μL) se mostrou superior em comparação com valores obtidos pelo método de aférese descrito por Carter et al. (2003) (490 x 10³/ μL), porém menores que o valor obtido por Sutter et al. (2004) mediante um método semi-automatizado de *buffy coat* (1.472 x 10³/ μL).

Em relação a outros estudos que também utilizaram o método manual, a concentração de plaquetas se mostrou satisfatória e muitas vezes superior às encontradas por outros autores (MAIA, 2008; CARMONA et al., 2009; MEIRELLES et al., 2010; VENDRUSCOLO et al., 2012). Todos os preparados chegaram a valores próximos ou superiores ao valor médio encontrado por Schnabel et al. (2007), que foi de 395.000 plaquetas/ μ L. Segundo o mesmo autor, esta concentração média de plaquetas foi suficiente para demonstrar eficiência em estudo *in vitro* com fragmentos do TFDS de equinos. Este valor citado por Schnabel et al. (2007), também foi aceito como satisfatório por Schnabel et al. (2008) e Oleza (2009), já que os fatores de crescimento atuam ligando-se a receptores presentes na superfície das membranas celulares e uma vez que a população de receptores celulares está saturada, adicionar mais fatores de crescimento não parece fazer muito sentido.

Em todos os casos foi realizada aplicação única de PRP, conforme relatado em estudos realizados por Argueles et al. (2008), Maia et al. (2009) e Meirelles et al. (2010), nos quais foi utilizada somente uma aplicação intralesional de PRP, sendo esta suficiente para o processo de reparação.

Após a aplicação intralesional de PRP ou solução salina conforme o grupo, a única variável ultrassonográfica que diferiu ($p \leq 0,05$) entre os grupos foi a área transversal da lesão (ATL) (tabela 2.4 e figura 2.6), sendo menor nos grupos que receberam tratamento com o PRP. Dados semelhantes também foram verificados por Maia et al. (2009).

Segundo Reef (1998), a diminuição dessa variável ultrassonográfica é indicativa de cicatrização e remodelação. Oleza (2009) cita que os fatores de crescimento regulam o metabolismo celular e aceleram a cicatrização tissular por meio da estimulação e proliferação celular, pelo incremento da síntese de matriz extracelular e estimulando uma neovascularização. De acordo com Bennet e Schultz (1993) e Werner e Grose (2003), o TGF- β , o EGF e o IGF agem sinergicamente melhorando o acesso das células inflamatórias para a área da lesão, assim como atuam na promoção da angiogênese e fibroplasia.

A ATL diferiu com menores valores médios no grupo tratado aos sete dias. Da mesma forma, Meirelles et al. (2010), em estudo realizado em equinos

acometidos com tendinite aguda e crônica e com diferentes graus de lesão, sugeriram que o tratamento dos casos agudos se mostrou mais eficaz. Os autores atribuíram essa diferença em relação ao tempo, pelo fato de que uma cicatrização mais tardia ocorre nas lesões crônicas. Bosch et al. (2011), relataram que, durante a fase inflamatória (cerca de 10 dias pós-lesão), fibras colágenas do tendão são digeridas por enzimas proteolíticas e, em seguida, removidas por fagocitose. De acordo com Bennet e Schultz (1993) e Klein et al. (2002), o TGF- β , liberado pelos α -grânulos plaquetários, tem papel importante no recrutamento de macrófagos e fibroblastos e na estimulação da produção de colágeno. Também inibe as metaloproteinases de matriz e diminui a atividade das proteinases nessa fase inicial de cicatrização.

A diferença encontrada em relação a ATL dos grupos controles, mostrou que o grupo que recebeu solução salina aos sete dias obteve uma melhora em relação ao tempo, o que não foi encontrado no G14c. Uma possibilidade para a ocorrência desse fato foi o início da caminhada uma semana antes no grupo que recebeu tratamento aos 7 dias, estimulando a cicatrização e remodelação das fibras colágenas. De acordo com Schils e Turner (2010), pesquisas em reabilitação humana têm mostrado que mesmo na fase aguda de lesões musculoesqueléticas, uma mobilização precoce da estrutura pode ser utilizada com sucesso para produzir cicatrização de melhor qualidade para os músculos, tendões e ligamentos. Alguns fatores justificam este fato: aumento do fluxo sanguíneo e linfático para ajudar na cicatrização; produz tensão para estimular a reparação do tecido para uma cicatrização mais rápida; produz tensão para melhorar o alinhamento dos tecidos durante a cicatrização e limita a extensão da fibrose do tecido conjuntivo.

Em relação à ecogenicidade (tabela 2.5), a melhora notada através da análise de frequência no membro que recebeu o PRP aos sete dias (G7t), foi similar aos achados da ATL do mesmo grupo, iniciando essa redução quatro semanas após o tratamento (D35). As demais diferenças notadas não se mostraram pertinentes, sugerindo assim entender que essas sutis oscilações foram decorrentes de efeitos individuais. Além do que, a correlação de achados ultrassonográficos associados à variação de tonalidade da cor cinza (ecogenicidade) com alterações patológicas foi questionada por Crass et al. (1992), que encontraram imagens ultrassonográficas

que permaneceram alteradas ainda que a histopatologia demonstrasse realinhamento fibrilar adequado e completa cicatrização da lesão. Este achado foi posteriormente confirmado por Van Schie et al. (1998). Dados estes, que se assemelham aos achados por Maia (2008), em estudo avaliando a eficácia do tratamento com PRP em tendinite do TFDS em equinos. A quantificação dos níveis de tonalidade da cor cinza é insuficiente para avaliar com precisão a reparação de lesões do tendão (VAN SCHIE et al., 1999) e que não são adequados para a discriminação da fase de cicatrização da lesão pois a desintegração dos feixes do tendão é um fenômeno tridimensional (3D), que não pode ser capturado em imagens 2D (VAN SCHIE et al., 2000).

Durante o período do estudo, o paralelismo de fibras colágenas não apresentou melhora em nenhum dos grupos (tabela 2.6), possivelmente devido ao período de avaliação ultrassonográfica adotado pelo estudo, pois se sabe que esse alinhamento das fibras ocorre em uma fase mais tardia de cicatrização, com início seis semanas após a lesão e podendo se estender por até 12 meses ou mais (DAHLGREN, 2007). Carmona et al. (2009) obtiveram melhoras evidentes nesse parâmetro ao final de seu estudo, o qual teve duração de animais tratados com o PRP durante um ano.

Para Oleza (2009), a redução da dor pode ser atribuída à inibição ou neutralização das citocinas pró-inflamatórias e substâncias que hipersensibilizam os nociceptores, através, principalmente, do TGF- β ; bem como, seu estímulo sobre a síntese de ácido hialurônico e, em geral, pelo reequilíbrio homeostático, decorrente da aplicação do PRP. Isso é notado com os dados relativos à redução da sensibilidade dolorosa nos animais tratados com o PRP, os quais corroboram com diversos autores (MAIA, 2008; CARMONA et al., 2009; OLEZA, 2009).

No G7t, o fato de a temperatura local acompanhar o mesmo padrão da sensibilidade também pode ser explicado pelo efeito anti-inflamatório de alguns fatores de crescimento liberados pelas plaquetas como citado por Maia (2008), Carmona et al. (2009) e Oleza (2009). A persistência do calor local e seu aumento uma semana após a administração intratendínea de PRP ou solução salina, foram atribuídos à lesão pré-existente e aos volumes infundidos, que podem ocasionar

destruição mecânica de fibras colágenas imaturas e desenvolvimento de um novo foco de lesão, conforme mencionado por Marxen et al. (2004) e Maia (2008).

Corroborando os achados de Maia (2008), essas duas variáveis clínicas (sensibilidade dolorosa à palpação e temperatura local) foram as únicas que reduziram em relação ao tempo, bem como se mostraram menos intensas nos grupos tratados com o PRP.

O pulso digital não se mostrou um parâmetro de eleição para o monitoramento nesses casos, pois não apresentou uma correlação clínica nem com a indução da tendinite com a colagenase e nem após o tratamento. Segundo Stashak (2006), o aumento do pulso digital palmar está relacionado com enfermidades da extremidade distal do membro, sendo em sua maioria advindas dos cascos.

A intensidade do edema, aferida pela mensuração da circunferência metacarpiana, não mostrou diferenças em nenhum momento do estudo em questão e nem entre os grupos avaliados (figura 2.7). A média do perímetro metacarpiano, ao final do período experimental, resulta não somente do edema inflamatório, mas também do espessamento tendíneo decorrente da proliferação celular e produção de colágeno imaturo (MARANHÃO, 2008). De acordo com Oleza (2009), os FC mitogênicos contidos nas plaquetas estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese, podendo assim, afetar a circunferência metacarpiana. De acordo com Maia (2008), essas células do tecido conjuntivo controlam a orientação das fibrilas de colágenos, que devem estar alinhadas em feixes paralelos ao longo do eixo principal de tensão para a obtenção de um tecido cicatricial de maior resistência.

2.4 CONCLUSÕES

A administração de dose única de PRP se mostrou eficaz no tratamento de tendinite do TFDS induzida experimentalmente em equinos, sendo mais eficaz durante a fase aguda (sete dias após a lesão).

O tratamento influenciou positivamente na evolução dos parâmetros da área transversal da lesão avaliada através de ultrassonografia, sensibilidade dolorosa à palpação e temperatura local. Bem como, conforto e bem estar do animal durante o período de recuperação.

Estudos clínicos e com maior período de acompanhamento dos animais devem ser realizados para acompanhamento de retorno dos animais à atividade atlética e mensuração da taxa de recidivas da lesão.

III REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; et al. **Fundamentos da biologia celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 740p.

ALBERTS, B.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1463p.

ÁLVAREZ, M.E.; GIRALDO, C.E.; CARMONA, J.U. Contaminación bacteriana en concentrados de plaquetas de caballos. **Arch Med Vet**, v 42, 2010. P. 49-56.

ALVES, A.L.G. **Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada a atividade física na reparação tendínea de equinos após agressão pela colagenase na cicatrização tendínea equina. Avaliação ultrassonográfica e morfológica**. 1998. 92p. Tese (Doutorado em Patologia) – Curso de Pós-graduação em Patologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; BORGES, A.S.; et al. Influência do fumarato de betaaminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea eqüina. Avaliação clínica e ultra-sonográfica. **Revista Educ. Contin. CRMV-SP**, v.4(1), 2001. p.19-27.

ALVES, A.L.G., et al. Tendon splitting surgical treatment on experimental equine acute tendonitis. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, 2002. p.45-51.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; et al. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, n.1, 2004. p 5-12.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; SÁNCHEZ, M.; et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. **J Orthop Res**, v. 23, 2005. p.281-286.

APPEL, T.R.; PÖTZSCH, B.; VON MÜLLER, J.; et al. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. **Clin Oral Implant Res**, v.13, 2002. p.357-362.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.U.; PASTOR, J.; et al. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. **Res Vet Science**, v.81, 2006. p.237-245.

ARGUELLES, D.; CARMONA, J.U.; CLIMENT, F.; et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Vet. Rec.** v.162, n.7, 2008. p.208-211.

ASLAN, H.; et al. Molecular targets for tendon neoformation. **J Clin Invest**, v. 118 (2), 2008. p 439-444.

BARBOSA, A.L.T. **Desenvolvimento de um protocolo de plasma rico em plaquetas testado na reparação de falhas ósseas.** 2006. 43p. Monografia (Especialização em Medicina Veterinária) – Curso de Especialização em Clínica e Cirurgias Veterinárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BARBOSA, A.L.T.; et al. Plasma rico em plaquetas: uma fonte de múltiplos fatores de crescimento para enxertos ósseos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, sulpl.1, 2006. p.1-145.

BARREIRA, A.P.B. **Implante autólogo de células mesenquimias no tratamento de tendinites induzidas em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica.** 2005. 86p. Dissertação de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

BATSON, E.L.; PARAMOUR, R.J.; SMITH, T.J.; et al. Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions. **Equine Vet J.** v.35, 2003. p.314–318.

BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.166, n.1, 1993. p.74-81.

BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; et al. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scand J Med Sci Sports.** v.21, 2011. p.554-61.

CANONICI, F. Superficial digital flexor tendinitis in the athletic horse: how to manage it. **Proceedings of the 12th WEVA**, Hyderabad, India, 2011.

CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse.** 2006. 91p. Dissertação de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2006.

CARMONA, J.U.; et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: A preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, 2007. p.167-170.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. **Arch. Med. Vet.**, v.41, 2009. p.175-179.

CARMONA, J.U.; LOPEZ, C.; GIRALDO, C.E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. **Arch Med Vet**, v.43, 2011. p.1-10.

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

COPPINGER, J.A.; CAGNEY, G.; TOOMEY, S.; et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. **Blood**. v.103, 2004. p.2096-2104.

CREVIER-DENOIX, N.; RUEL, Y.; DARDILLAT, C.; et al. Correlations between mean echogenicity and material properties of normal and disease equine superficial digital flexor tendons: an in vitro segmental approach. **Journal of Biomechanics**, v.38, n.11, 2005. p.2212-2220.

CRASS, J.R.; et al. Magnetic resonance, ultrasound and histopathologic correlation of acute and healing equine tendon injuries. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v.33, n.4, 1992. p.206-216.

DAHLGREN, L.A.; NIXON, A.J.; BROWER-TOLAND, B.D. Effects of β -aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. **American Journal Veterinary Research**, v.62, n.10, 2001. p.1557-1562.

DAHLGREN, L.A.; VAN DER MEULEN, M.C.; BERTRAM, J.E. et al. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. **J Orthop Res**, v.20, n.5, 2002. p.910-919.

DAHLGREN, L.A.; MOHAMED, H.O.; NIXON, A.J. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **J Orthop Res**, v.23, n.1, 2005. p.84-92.

DAHLGREN, L.A. A review of treatment options for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work? In: **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Seattle, 2005.

DAHLGREN, L.A. Pathobiology of tendon and ligament injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, 2007. p.168-173.

DINATO, C.J.; et al. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO, C.J.; POLIDO, D.W. **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 315-342.

DYSON, S. Treatment of superficial digital flexor tendonitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate, **Proceedings of the 43rd AAEP**, v.43,1997. p.297–300.

EPPLEY, B.L.; WOODSELL, J.E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast Reconst Surg**, v.114, 2004. p.1502-1508.

EVANS, J.H.; BARBENEL, J.C. Structural and mechanical properties of tendon related to function. **Equine Vet J**, v.7, n.1, 1975.

EVERTS, P.A.M.; KNAPE, J.T.A.; WEIBRICH, G.; et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of ExtraCorporeal Technology**, v.38, n.2, 2006. p.174-187.

FOLAND, J.W.; TROTTER, G.W.; POWERS, B.E.; et al. Effect sodium hyalronate in collagenase induced superficial digital flexor tendonitis in horses. **American Journal Veterinary Research**, v.53, n.12, 1992. p.2371-2376.

FORTIER, L.A. Evidence of platelet rich plasma to resolve lameness. In: **AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendón and Joint Caused Lameness of Horses**, Germany, 2008.

FORTIER, L.A. Medical therapies for tendonitis. **Proceedings of the 11th WEVA**, Guarujá, 2009.

GAUGHAN, E.M. Managing tendinitis in horses. **Veterinary Medicine**, v.89, 1994. p.789-794.

GENOVESE, R.L.; et al. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract**, v.2, n.1, 1986. p.145-226.

GENOVESE, R.L. Prognosis of superficial flexor tendon and suspensory ligament injuries. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF

EQUINE PRACTITIONERS, 39, 1993, Texas. **Anais American Association of Equine Practitioners**, 1993. p.17-19.

GENOVESE, R.; REEF, V.B.; LONGO, K.L.; et al. Superficial Digital Flexor Tendonitis: Long Term sonographic and Clinical Study of rechehorses. **Proceedings of the First International Equine Symposium**, Emirados Arabes, 1996.

GENOVESE, R.L.; RANTANEN, N.W. The superficial digital flexor tendon. In: RANTANEN, N.W.; MCKINNON, A.O. **Equine diagnostic ultrasonography**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1998. p.286-398.

GENTRY PA. Platelet biology. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL J.G.; JAIN, N.C., et al. **Schulman's Veterinary Hematology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p.459-466.

GOODSHIP, A.E. The pathophysiology of flexor tendon injury in the horse. **Equine Vet Educ**, v.5, 1993. p.23-29.

GOODSHIP, A.E. et al. The pathophysiology and repair of tendon and ligament injury. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v.10, n.2, 1994. p.322- 349.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha-granules. **Blood Review**, v.7, n.1, 1993. p.52-62.

HARTWING, J.; ITALIANO, Jr. The birth of the platelet. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v.1, 2003. p. 1560-1586.

HOCK, J.M.; CANALIS, E. Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. **Endocrinology**, v.134, n.3, 1994. p.1423-1428.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In: **Histologia Básica**. 10 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 92-124.

LEONEL, R.A.B.; MATSUNO, R.M.J.; SANTOS, W.; et al. Trombocitopenia em animais domésticos. **Revista científica eletônica de medicina veterinária**, Ano VI, n.11, 2008. Disponível em: < <http://www.revista.inf.br/veterinaria11/revisao/edic-vi-n11-RL94.pdf>>. Acesso em: 18 de Novembro de 2012.

KEG, P.R.; et al. The effect of regional nerve blocks on the lameness caused bycollagenase induced tendonitis in the midmetacarpal region of the horse: a study

using gait analysis, and ultrasonography to determine tendon healing. **J. Vet. Med. Assoc.**, v.39, 1992. p.349- 364.

KETCHUM, L.D. Tendon healing. In: HUNT, T.K.; DUNPHY, J.E. **Fundamentals of Wound Management in Surgery**. New York: Appleton-Century-Crofts, 1979.

KLEIN, M.B.; YALAMANCHI, N.; PHAM, H. et al: Flexor tendón healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. **J Hand Surg Am.**, v. 27, 2002. p.615-620.

MACHADO, M.V.M.; et al. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em eqüinos: estudo histológico e ultra-sonográfico. **Arch. Vet. Sci.** v.5, 2000. p.111-115.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e histopatológica**. 2008. 78p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MAIA, L.; SOUZA, M.V.; JÚNIOR, J.I.R.; et al. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy In: Horses: Histologic evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, n.8, 2009. p.618-626.

MANNAIONI, P.F.; DI BELLO, G. M.; MASISI, E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. **Inflammation Research**, v. 46, 1997. p.4-18.

MARANHÃO, R. P. A. **Aspectos epidemiológicos de alterações do aparelho locomotor e o uso da arnica montana no tratamento da tendinite experimental em eqüinos**. 2008. 75p. Dissertação de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

MARR, C.M.; McMILLAN, I.; BOYD, J.S.; et al. Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v.25, n.1, 1993. p.23-29.

MARSOLAIS, D.; FRENETTE, J. Inflammation and tendo healing. **Médecine Sciences**, v.21, n.2, 2005. p.180-186.

MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EISCHSTAEDT, R.M.; et al. Platelet-rich plasma; Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol**, v.85, n.6, 1998. p.638-646.

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

MARXEN, S.; NETO, J.C.L.; CANOLA, J.C.; et al. Intralesional polysulphated glycosaminoglycan as treatment of equine collagenase induced tendinitis: clinical, ultrasonographic and histopathologic evaluation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, 2004. p.701-708.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 344p.

MATRAS, H. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v.40, 1982.

McCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression, **J Orthop Res**, v.27, 2009. p.1033-1042.

McILWRAITH, C.W. Doença das articulações, tendões, ligamentos e estruturas relacionadas. In: STASHAK, T.S. **Claudicação em eqüinos segundo Adams**. 5 ed. São Paulo: Roca, 2006. Cap.7, p.417-601.

MEIRELLES, M.G.; PAGANELA, J.C; DOS SANTOS, C.A.; et al. Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento de tendinite em equinos. In: **XII ENPOS**, Pelotas, 2010.

MOLLOY, Y.; WANG, Y.; MURRELL, G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. **Sports Med**, v.33, n.5, 2003. p.381-194.

OLEZA, I.A., **La Terapia de Lesiones de Tejidos Blandos Y Articulaciones Con Plasma Rico En Plaquetas En Caballos De Deporte: Evidencias Clínicas Y Bioquímicas Que Validan Su Utilización**. 2009. 243p. Dissertação de PhD (Doutorado em Medicina Veterinária). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2009.

PALMER, S.E.; GENOVESE, R.; LONGO, K.L.; et al. Practical management of superficial digital flexor tendinitis in the performance horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.10, n.2, 1994. p.452-481.

PATTERSON-KANE, J.C.; FIRTH, E.C.; PARRY, D.A.; et al. Effects on training collagen fibril populations in the suspensory ligament and deep digital flexor tendon of young Thoroughbreds. **American Journal Veterinary Research**, v.59, 1998. p.64-68.

PELAGALLI A, BELISARIO M.A., TAFURI S., et al. Adhesive properties from diferente animal species. **J Comp Path**, v.128, 2002. p127-131.

PELOSO, J.G.; MUNDY, G.D.; COHEN, N.D. Prevalence of, and factors associated with musculoskeletal racing injuries of Thoroughbreds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.204, 1994. p.620-626.

PIETRZAK, W.S. & EPPLEY, B.L. Platelet rich plasma: Biology and new technology. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.16, 2005. p.1043-1054.

RAJÃO, M. D.; FONSECA, F.A.; VILLA FILHO, P. C.; et al. **Relato de três casos de tratamento de tendinite no Tendão Flexor Digital Superficial (TFDS) Utilizando Plasma Rico em Plaquetas (PRP)**. In: Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Búzios, 2010.

RAMÍREZ, J.U.C. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse: Preliminary clinical studies and cellular and molecular evaluation of equine platelet concentrates obtained by single and double centrifugation tube methods**. 2006. 91p. Dissertação de PhD (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2006.

RANTANEN, N.W.; JORGENSEN, J.S.; GENOVESE, R.L.; Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In: ROSS, M.W. & DYSON, S.J., **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 1.ed.. Missouri: Elsevier Saunders, 2003, p. 182-205.

REDDING, W.R.; BOOTH, L.C.; POOL, R.R. The effects of polysulphated glycosaminoglican o the healing of collagenase induced tendinitis. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol**, v.12, 1999. p.48-55.

REEF, V.B. **Equine diagnostic ultrasound**. Philadelphia: W.D. Saunders, 1998.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology**. v.43, 2004. p.131–142.

RUDOLPH, R.; WOODWARD, M.; HURN, I. Ultrastructure of active versus passive contracture of wounds. *Surg Gynecol Obstet*, 1980. p.151:396.

SANDE, R.D.; RUSSELL, L.T.; JOHNSON, G.R. Diagnostic ultrasound: applications in the equine limb. In: RANTANEN, N.W.; MCKINNON, A.O. **Equine diagnostic ultrasonography**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1998. Cap.7, p.103-117.

SCHILS, S.J.; TURNER, A. Review of early mobilization of muscle, tendon, and ligament after injury in equine rehabilitation. In: **Proceedings of the annual convention of the AAEP**, vol.56, p.374-378, Baltimore, MD, USA, 2010.

SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.31, n.5, 2002. p.469-484,

SCHNABEL, L.V.; MOHAMMED, H.O.; MILLER, B.J.; et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, 2007. p.230-240.

SCHNABEL, L.V.; et al. Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explants cultures. **Equine Vet J**, v.40, n.3, 2008. p.260-265.

SILVA, L.A.F.; et al. **Aparelho locomotor equino: enfermidades e diagnóstico**. Goiânia: Kelps, 2008. 252p.

SMITH, R.K.W. Assessment and treatment of tendon injury. In BEVA REGIONAL CPD, London. **Meeting...** London: Department of farm animal and equine medicine and surgery, the Royal Veterinary College Hawkshead Lane North Mymms, 1998, p10-14.

SMITH, R.K.W.; et al. Isolation and implantation of autologous stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Vet J**; v.35; 2003. p.99-101.

SMITH, R.K.W.; GOODSHIP, A.E. Tendon and ligament physiology. In: HINCHCLIFF, K.W. et al. **Equine Sports Medicine and Surgery** [S.l.]: Saunders, 2004, p 130-151.

SPEIRS, V.C. O sistema musculoesquelético. In: SPEIRS, V.C. **Exame clínico de equinos**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. Cap. 5, p.109-182.

SPURLOCK, G.H.; SPURLOCK, S.L.; PARKER, G.A. Ultrasonographic, gross, and histologic evaluation of a tendonitis disease model in the horse. **Veterinary Radiology**, v.30, n.3, 1989. p.184-188.

STASHAK, T. S. Claudicação. In: STASHAK, T.S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. 5 ed. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 3, p. 113-184.

STEVENS, A.; LOWE, J.S.; Histologia. 1 ed. São Paulo: Manoele. 1995, 378p.

SUTTER, W.W.; KANEPS, A.J.; BERTONE, A.L. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. **American Journal Veterinary Research**, v.65, n.7, 2004. p.924-930.

TAMIMI, F.M.; et al. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, 2007. p.1084-1093.

VAN SCHIE, J.T.M.; BAKKER, E.M.; VAN WEEREN, P.R. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: A quantitative in vitro study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt and transducerdisplacement. **Vet. Radiol. Ultrasound** v.39, n.5, 1998. p.151-160.

VAN SCHIE, H.T.; BAKKER, E.M.; VAN WEEREN, P.R. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative in vitro study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt, and transducer-displacement. **Veterinary Radiology and Ultrasound** v.40, 1999. p.151–160.

VAN SCHIE, H.T.; et al. Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. **American Journal of Veterinary Research** v.61, 2000. p.210–219.

VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A.M., MORAES; L.F.; et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.2, 2012. p.106-110.

WADHWA, M.; SEGHATCHIAN, J.; LUBENKO, M.; et al. Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. **Br J Haematology**. v.93, 2003. , p.225-234.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.; HAFNER, G.; et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. **Clin Oral Implants Res**, v.14, 2003. p.357-362.

WEIBRICH, G.; et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-ingrowth-factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.29, 2005. p.118-123.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews, Houston**, v.83, n.3,2003 . p.835-870. Disponível

em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/content/full/83/3/835>> Acessado em: 18 de Novembro de 2012.

WILLIAMS, I.F.; et al. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. **Research in Veterinary Science**, v.36, n.3, 1984. p.326-338.

WHITCOMB, M.B. Ultrasonographic evaluation of the distal extremity. **J Equine Vet Science**, v.29, n.1, 2009. p.47-59.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v.55, 1997. p. 1294-1299.

YAMADA A.L.M.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A.; et al. Comparação de diferentes doses de collagenase em modelo de indução de tendinite para equinos: estudo clínico e ultra-sonográfico. **Ciência Rural**, v.39, n.4, 2009. p.1124-1130.

ZIMMERMANN, R.; JAKUBIETZ, R.; JAKUBIETZ, M.; et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. **Transfusion** v.41, 2001. p.1217-1224.

ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO CEUA/ICB-UnB.

	Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal
Brasília, 20 de abril de 2012.	
DECLARAÇÃO	Declaramos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DO DIA DE APLICAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITE EM EQUINOS.", UnBDOC n.º 54212/2011, sob responsabilidade da Profa. Roberta Ferro de Godoy foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.
	 Prof. José Raimundo Corrêa Coordenador da CEUA