



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

**INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITE EM
EQUINOS**

MARIANA DAMAZIO RAJÃO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2012**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITE EM
EQUINOS**

MARIANA DAMAZIO RAJÃO

ORIENTADOR: ROBERTA FERRO DE GODOY

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 072/2012

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2012**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

RAJÃO, M. D. **Influência da ativação do plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 65 p. 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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rajão, Mariana Damazio

Influência da ativação do plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos / Mariana Damazio Rajão orientação de Roberta Ferro de Godoy- Brasília, 2012. 65p...

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

1. Equino. 2. Tendinite. 3. Plasma rico em plaquetas. 4. Fatores de Crescimento. 5. Ativação I. RAJÃO, M. D. II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITE EM EQUINOS

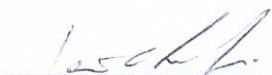
MARIANA DAMAZIO RAJÃO

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 .

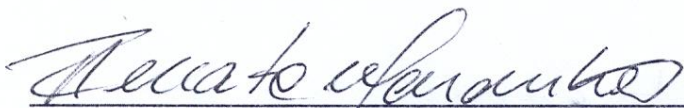
APROVADA POR:



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



JAIR DUARTE DA COSTA JUNIOR, DOUTOR(A) (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)



RENATA PINO ALBUQUERQUE MARANHÃO, DOUTOR (A) (UFMG)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 18 de Dezembro de 2012

**Dedico esta obra a minha família, em especial à
minha mãe, grande incentivadora dos meus
estudos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais pelo amor, ensinamentos, formação pessoal e principalmente pelo apoio. Amo vocês!

Aos meus avós, sempre presentes e sendo um exemplo para mim, em especial a minha avó Iza (*in memoriam*), onde você estiver amo você!

Aos meus tios, todos muitos queridos em meu coração, principalmente a você Tia Luca.

A minha orientadora, Prof. Dra. Roberta Ferro de Godoy por todas as oportunidades e principalmente pela confiança. Tenho não só como uma orientadora, mas como uma amiga.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Eduardo Maurício Mendes de Lima agradeço por toda orientação e principalmente pelo apoio e paciência. Seu envolvimento foi fundamental para a concretização desse trabalho.

Aos professores José Renato Junqueira Borges, Antônio Raphael Teixeira Neto e Ricardo Miasaka pela orientação e ensinamentos durante todo o período acadêmico.

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 e ao CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado.

À toda a equipe do Regimento de Polícia Montada do Distrito Federal (RPMon) pela amizade, respeito e confiança, e pela contribuição neste trabalho, disponibilizando equipamentos essenciais para a realização deste estudo.

À companheiríssima de equipe Fernanda Fonseca. Fê, obrigada pela sua amizade e saiba que nossa parceria fez toda a diferença.

A amiga Kariny Evangelista, a Kaká, pela amizade, pela disposição em conduzir a parte laboratorial até altas horas, muitas vezes sem horário de almoço. Lembre-se que mesmo distante, nunca me esquecerei de você. Te adoro!!!

As orientadas de PIBIC Nat, Jú e Paulinha, por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho, pela disposição da malhação com os cavalos e pelo bom humor até altas horas da noite.

A veterinária Fabiene pela ajuda com a parte laboratorial.

Aos estagiários Paulo e Lucas por toda a ajuda na parte experimental.

Ao companheiro de mestrado Ernane de Paiva, pela sua paciência e amizade.

Aos maravilhosos cavalos que participaram deste trabalho com intuito de ajudar a muitos outros. 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 e, assim, não relutar em ajudar para que mesmo na correria conseguíssemos finalizar este trabalho.

Em especial ao meu parceiro, companheiro e conselheiro Fernando Gonçalves Costa, por estar sempre presente.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1- MORFOLOGIA E BIOMECÂNICA DOS TENDÕES	3
2.2- ETIOPATOGENIA DA TENDINITE	6
2.3- DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO	9
2.4- TENDINITE INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR COLAGENASE	11
2.5- PLAQUETAS E FATORES DE CRESCIMENTO	12
2.6- PLASMA RICO EM PLAQUETAS	16
2.7- MÉTODOS DE PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	19
3- MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1- SELEÇÃO DOS ANIMAIS	23
3.2- MANEJO DOS ANIMAIS	24
3.3- EXAMES HEMATOLÓGICOS	24
3.4- INDUÇÃO DA TENDINITE	25
3.5- PROTOCOLO LABORATORIAL PARA OBTENÇÃO DO PRP ...	27
3.6- TRATAMENTO	29
3.7- FISIOTERAPIA	30
3.8- EXAMES FÍSICO E ULTRA-SONOGRÁFICO	31
3.9- ANÁLISES ESTATÍSTICA	32
4- RESULTADOS	33
4.1- AVALIAÇÃO LABORATORIAL	33
4.2- INDUÇÃO DA TENDINITE	34
4.3- PLASMA RICO EM PLAQUETAS	34
4.4- AVALIAÇÃO CLÍNICA	35
4.5- AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	38
5- DISCUSSÃO	44
5.1- AVALIAÇÃO LABORATORIAL	44
5.2- INDUÇÃO DA TENDINITE	44
5.3- PLASMA RICO EM PLAQUETA	45
5.4- AVALIAÇÃO CLÍNICA	46
5.5- AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	49
6- CONCLUSÕES	53

7- REFÊRENCIAS	54
9- ANEXO 1	64
10- ANEXO 2	65

LISTA DE ABREVIATURAS

TFDS Tendão do Músculo Flexor Digital Superficial
PRP Plasma Rico em Plaquetas
MEC Matriz extracelular
TIMPs metaloproteinases
FC Fatores de Crescimento
MHz Mega Hertz
ATT área transversal do tendão
ATL área transversal da lesão
mL mililitro
mm milímetros
mg Miligrama
mg.mL⁻¹ miligrama por mililitro
µm microlitro
ADP adenosina difosfato
ATP adenosina trifosfato
MMP metaloproteinases da matriz
TGF-β Fatores de crescimento transformantes beta
bFGF Fatores de crescimento fibroblástico básico
PDGF Fatores de crescimento derivado da plaqueta
EGF Fatores de crescimento epidérmico
VEGF Fatores de crescimento endotelial vascular
CTGF Fatores de crescimento do tecido conjuntivo
IGF-I Fatores de crescimento semelhante à insulina I
Th1 linfócitos T helper
TPC tempo de preenchimento capilar
S segundos
FC frequência cardíaca
Bpm batimentos por minuto
FR frequência respiratória
Mpm movimentos por minuto
TR temperatura retal
°C grau Celsius
Hem. eritrócitos
VG volume globular
Leuc. leucócitos
PPT proteínas totais
PLT plaquetas
cm centímetro
EDTA
GC grupo controle
GTI Plasma Rico em Plaquetas sem ativação
GTA Plasma Rico em Plaquetas com ativação por cloreto de cálcio
D0 dia 0
D2 dia 2

D7 dia 7
D14 dia 14
D21 dia 21
D28 dia 28
D35 dia 35
D42 dia 42
D48 dia 48
mm² milímetros quadrados
COL colagenase
TRAT tratamento com PRP e solução salina
EF exame físico
US ultra-sonográfica

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Valores mínimos e máximos das variáveis hematológicas: número total de eritrócitos (Hem), volume globular (VG), leucócitos (Leuc), proteínas totais (PPT.) e plaquetas (Plt) obtidas durante a fase experimental, nos equinos estudados.	32
TABELA 2	Concentração de plaquetas no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP) nos equinos avaliados.	34
TABELA 3	Distribuição da frequência da variação de sensibilidade, de acordo com as escalas zero a IV determinados por Speirs (1999), nos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).	35
TABELA 4	Distribuição da frequência da variação de calor nos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).	36
TABELA 5	Distribuição da frequência da variação do pulso digital evidente nos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).	36
TABELA 6	Valores das médias e erros padrões das áreas dos tendões e das lesões nos diferentes momentos no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).	39
TABELA 7	Distribuição (%) da característica da ecogenicidade dos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).	40
TABELA 8	Distribuição em porcentagem da característica paralelismo do dos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).	41

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Diferença de concentração de fatores de crescimento (FC) em relação aos dias, após a administração do plasma rico em plaquetas.	21
FIGURA 2	Vista lateral esquerda do membro torácico de um equino ilustrando: (a) o ponto de referência para a aplicação da colagenase tipo I (seta vermelha); e (b) posicionamento do transdutor para a aplicação guiada pelo ultrassom.	25
FIGURA 3	Diferentes momentos de preparo do PRP: sangue total (I), sangue após a primeira centrifugação (II), plasma separado após a primeira centrifugação (III), plasma após segunda centrifugação (IV) e plasma rico em plaquetas (V).	27
FIGURA 4	(a) Demonstração da aplicação intralesional guiada por ultrassom; e (b) imagem ultrassonográfica de corte transversal demonstrando a agulha (seta branca) no Tendão Flexor do Músculo Digital Superficial	28
FIGURA 5	Fotografias da vista lateral esquerda do terço médio da mão de equino visando a mensuração dos perímetros de P1 (a), P2 (b) e P3 (c).	30
FIGURA 6	Etapas do experimento: aplicação da colagenase (COL), tratamento com injeção do PRP nos grupos tratados e de solução salina no controle (TRAT), exame físico (EF) e ultrassonográfica (US).	31
FIGURA 7	Representação da média da concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) em relação ao D0, D14 e D28, Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o dia zero (D0) e dia 14 (D14).	33
FIGURA 8	Variação dos perímetros da região metacárpica em centímetros em relação aos dias de avaliação entre o grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).	37

- FIGURA 9** Imagem transversal do aparato flexor do membro torácico de animal do GC mostrando por meio da área delimitada pela linha branca a área a ser mensurada do (a) tendão do músculo flexor digital superficial e (b) da lesão, fazendo uso do programa ImageJ. 38
- FIGURA 10** Imagem longitudinal do aparato flexor do equino do membro torácico do GTA mostrando tendão do musculo flexor digital superficial com as fibras paralelas (seta branca), no D0, com perda parcial de paralelismo (seta vermelha), no D2, e perda total de paralelismo (seta amarela), no D7. 41
- FIGURA 11** Imagem transversal do aparato flexor do membro torácico do animal do GC, no D49, mostrando por meio da área delimitada pela linha branca a área do tendão do musculo flexor digital superficial (a) e seta vermelha apontando a perda de ecogenicidade no local da lesão. Imagem longitudinal do aparato flexor do equino mostrando tendão do musculo flexor digital superficial por meio da área delimitada pela linha branca (b) com as fibras com perda de paralelismo de fibras (seta amarela). 42

LISTA DE QUADROS

		Página
QUADRO 1	Fonte e função de alguns fatores de crescimento (FC) presentes nas plaquetas.	14
QUADRO 2	Parâmetros obtidos durante exame físico geral pré-experimento dos animais utilizados no projeto.	22
QUADRO 3	Intervalo de valores fisiológicos das variáveis hematológicas de equinos para hemácias (Hem), volume globular (VG), leucócitos (Leuc), proteínas totais (PPT.) e plaquetas (Plt).	64

RESUMO

Fatores de crescimento são proteínas sinalizadoras que regulam o metabolismo celular favorecendo a recuperação tecidual. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um método simples, eficiente e minimamente invasivo de se obter altas quantidades de fatores de crescimento autólogo e o seu produto final pode ou não ser ativado por agentes químicos *in vitro*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do PRP ativado e do PRP inativado, no tratamento de lesão no TFDS equino induzida por colágenase, visando a padronização de um protocolo para veterinários que trabalham com equinos. Para isso foram utilizados cinco equinos hígidos nos quais foi provocada tendinite no TFDS nos membros torácicos e em um membro pélvico, mediante administração de 2,5 mg de colágenase (2,5 mg.mL⁻¹). Quatorze dias após a indução da tendinite, os animais foram submetidos a tratamento: Um membro recebeu 2,5 mL injeção de solução salina 0,9%, sendo considerado o grupo controle (GC); o segundo membro recebeu injeção de 2,5mL PRP sem ativação (GTI); e o terceiro membro recebeu injeção de 2,5mL de PRP com ativação por cloreto de cálcio (GTA). Ocorreu revezamento randômico dos membros de cada animal (membro torácico esquerdo, torácico direito ou pélvico esquerdo) e o tratamento estipulado (GC, GTI ou GTA). No dia seguinte ao tratamento os animais foram submetidos à atividade física controlada e progressiva durante 35 dias. Foram realizados exames físicos e ultrassonográficos no dia 0 (D0), dia 2 (D2), dia 7 (D7) e semanalmente até o final do experimento (D48). Nos exames ultrassonográficos foram avaliados a área transversal do tendão (ATT), área transversal da lesão (ATL), ecogenicidade das lesões e paralelismo das fibras colágenas. O exame físico realizado pós-tratamento revelou diminuição da sensibilidade do local e do pulso digital patológico que pode ser observado em um primeiro momento no GTA e em um segundo momento no GTI. Também foi observado um aumento do calor local nos grupos tratados em relação ao controle. Na avaliação ultrassonográfica das lesões tanto no GC, quanto nos grupos tratados observou-se diminuição em relação a ATT e a ATL., e não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$), porém após o D28 pode-se verificar que a ATL era menor nos grupos tratados. Em relação à ecogenicidade e ao paralelismo de fibras os grupos tratados tiveram

melhores resultados do que o controle, sendo que o GTA teve uma melhora mais precoce em relação ao GTI. As principais conclusões do estudo foram que o uso de PRP ativado e inativado promove melhora da sensibilidade local, conferindo maior conforto para o animal durante o período de recuperação da tendinite, melhora da ecogenicidade e reorganização das fibras de colágeno, da lesão, mensurada por ultrassonografia e o protocolo de preparo do PRP inativado requer menos tempo, tornando esta técnica mais viável de ser realizada a campo.

Palavras-chave: equino, tendinite, plasma rico em plaquetas, fatores de crescimento, ativação.

ABSTRACT

Growth factors are signaling proteins that regulate cellular metabolism favoring tissue recovery. The platelet-rich plasma (PRP) is a simple, efficient and minimally invasive method of obtaining large quantities of autologous growth factors and their final product may or may not be activated *in vitro* by chemicals. The aim of this study was to evaluate the efficacy of PRP activated and inactivated PRP in the treatment of equine SDFT injury induced by collagenase, aiming to standardize a protocol for veterinarians who work with horses. For this we used five healthy horses and was caused in SDFT tendinitis foreleg and a hind limb upon administration of 2.5 mg of collagenase (2.5 mg.mL⁻¹). Fourteen days after induction of tendinitis, the animals were treated: A member received 2.5 mL injection of saline 0.9%, being considered the control group (CG), the second member received an injection of 2.5 mL PRP without activation (GTI) and the third member received an injection of 2.5 mL of PRP activation with calcium chloride (GTA). Occurred relay random member of each animal (left forelimb, right thoracic and left pelvic) and the treatment prescribed (GC, GTI or GTA). The day after the treatment the animals were subjected to controlled and progressive physical activity for 35 days. Were conducted physical examinations and ultrasound on day 0 (D0), day 2 (2), day 7 (D7) and weekly until the end of the experiment (D48). Sonographic examinations were evaluated in a cross-sectional area of the tendon (ATT), cross-sectional area of the lesion (ATL), echogenicity of the lesions and parallelism of collagen fibers. A physical examination performed after treatment showed decreased sensitivity of the site and wrist digital pathology that can be seen at first in the GTA and in a second stage in the GTI. There was also an increase in the local heat in the treated groups compared to control. In ultrasonography evaluation of lesions both in GC, as in the treated groups was observed decrease compared to ATT and ATL., and there was no statistical difference between groups ($p < 0.05$), but after the D28 can verify that ATL was lower in the treated groups. Regarding the echogenicity and parallelism of fibers treated groups fared better than the control, and the GTA had an improvement over the earlier GTI. The main conclusions of the study were that the use of PRP activated and inactivated promotes improvement of local sensitivity, providing greater comfort

for the animal during the period of recovery from tendonitis, improves echogenicity and reorganization of collagen fibers, the lesion measured by ultrasound protocol and preparation of inactivated PRP requires less time, making this technique more likely to be carried into the field.

Key words: equine, tendonitis, platelet rich plasma, growth factors, activation.

1 INTRODUÇÃO

No contexto atual da equideocultura tem-se dado maior ênfase aos eventos esportivos nas diversas modalidades, valorizando o potencial atlético do cavalo. A rotina intensa de treinamentos e competições predispõe o equino a lesões musculoesqueléticas, dentre as quais se destacam as tendinites. O Tendão do Músculo Flexor Digital Superficial (TFDS) frequentemente é submetido a uma carga de esforço próxima ao seu limite de resistência tênsil, o que aumenta o risco de lesões, podendo culminar com o seu rompimento (SMITH, 2011).

Devido ao longo tempo necessário para a recuperação completa do tecido tendíneo lesionado e à alta incidência de reparação desorganizada (BARREIRA, 2005), esse tipo de lesão pode comprometer seriamente o desempenho atlético do equino. O resultado são prejuízos econômicos decorrentes de gastos com atendimento por profissionais especializados e tratamento, longo período de convalescença, ocorrência de recidivas e, em alguns casos, a impossibilidade do retorno à atividade física desempenhada pelo animal (PALMER et al., 1994; PELOSO et al., 1994). Sendo assim, o tratamento dessa afecção ainda representa um desafio, pois os tratamentos tradicionais levam de meses a anos para cicatrização tecidual sem uma recuperação total das propriedades biomecânicas originais do tendão, predispondo à fragilidade e à altos índices de recidivas.

Alguns estudos têm demonstrado a eficácia da utilização de fatores de crescimento (FC) como tratamento complementar de injúrias de tecido mole para redução no tempo de cicatrização e melhora da qualidade do tecido cicatricial. Fatores de crescimento são proteínas sinalizadoras que regulam o metabolismo celular favorecendo a recuperação tecidual por meio da estimulação da proliferação celular, incrementando com isso a síntese de matriz extracelular e promovendo neovascularização. Além dos seus efeitos anabólicos, os FC diminuem o catabolismo e degradação da matriz (FORTIER, 2009). O plasma rico em plaquetas (PRP) é um método simples, eficiente e minimamente invasivo de se obter altas quantidades de fatores de crescimento autólogo (ANAND et al., 2003). Esta técnica

tornou-se uma boa opção em estudo para acelerar e otimizar a reparação tecidual (MAIA et al., 2009).

O PRP é derivado do sangue total e é obtido através de uma série de centrifugações (RAMÍREZ, 2006). O seu produto final pode sofrer ativação *in vitro* ou não. O processo de ativação consiste em adicionar um agente químico que ao entrar em contato com as plaquetas contidas no PRP vão estimular a desgranulação plaquetária e a liberação de FC, desta forma, os FC ficam disponíveis para utilização assim que entrarem em contato com o tecido. Quando o PRP não é ativado *in vitro*, faz-se necessário que as plaquetas entrem em contato com fatores fisiológicos para que ocorra a sua desgranulação (FOSTER et al., 2009; MISHRA et al., 2009).

Apesar de ser bastante promissora, considerada até mesmo terapia *gold standard* para tendinites, o PRP ainda necessita de estudos pré-clínicos e clínicos adicionais em equinos para determinação de seus reais benefícios e padronização de protocolos eficazes em relação ao preparo do PRP e à sua aplicação de acordo com o tempo, repetições e sua ativação ou não. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do PRP ativado e do PRP inativado, no tratamento de lesão no TFDS equino induzida por colagenase. Os parâmetros avaliados foram clínicos e ultrassonográficos, com a principal finalidade de chegar a um protocolo prático que possa ser utilizado por veterinários que trabalham com equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MORFOLOGIA E BIOMECÂNICA DOS TENDÕES

Os tendões são estruturas cilíndricas alongadas compostas por tecido conectivo denso modelado que conectam os músculos aos ossos e possuem um arranjo específico que refletem as demandas mecânicas intensas desses tecidos (STASHAK, 2006). A unidade básica da estrutura tendinosa são as fibras de colágeno, que se agrupam de forma crescente. Primordialmente o tendão é composto por fibrilas de colágeno tipo I em percurso helicoidal, paralelamente dispostas ao longo das linhas de tensão do tendão e embebidas numa matriz extracelular (MEC) de proteoglicanos, glicoproteínas, fibras elásticas, íons e água (McILWRAITH, 2002; SHARMA e MAFFULLI, 2005).

As moléculas de colágeno estão distribuídas hierarquicamente em microfibrilas, subfibrilas e fibrilas, que são agrupadas em fascículos, envoltos por tecido conectivo frouxo, o endotendão. O epitendão envolve toda a unidade tendínea. Finalmente, o tendão, em algumas regiões, é envolvido por bainha de tecido conectivo denso, o paratendão (SMITH, 2011). Epitendão é responsável pelo suprimento sanguíneo, nervoso e linfático intrínseco do tendão (SHARMA e MAFFULLI, 2005). O arranjo organizado do tendão, bem como as ligações entre as moléculas de colágeno, fibrilas e fibras, é o que lhe confere a capacidade de suportar elevadas cargas e transmiti-las dos músculos aos ossos (SMITH, 2011).

Os tendões são compostos predominantemente de MEC, que é composta de água (65%), colágeno (30%) e glicoproteínas não coladogênicas (5%) (SMITH, 2011). A MEC dos tendões é constituída por dois grandes componentes: a substância fundamental e os componentes fibrilares. Os componentes fibrilares em questão são o colágeno e a elastina, sendo que, esta última, apesar de essencial para a funcionalidade destes tecidos, constitui apenas 1 a 2% da matéria seca da MEC (WANG, 2006; DAHLGREN, 2007). O colágeno é o principal constituinte da MEC, sendo vital para a resistência de tendão. Por essa razão, 80% da matéria seca da MEC de tendões e ligamentos consistem em colágeno. Nos tendões, cerca de 95% do colágeno é do tipo I (SMITH, 2011), com uma pequena proporção de tipo III,

IV e V. É estimado que este colágeno seja renovado a cada 6 meses. (WATKINS, 1985).

Os fibroblastos tendinosos são fusiformes e encontram-se organizados em fileiras longitudinais entre as fibras de colágeno. Os fibroblastos e os fibrócitos são as células responsáveis pela formação e manutenção da MEC, mas por se localizarem no tendão são denominados de tenoblastos e tenócitos, respectivamente (SMITH e GOODSHIP, 2004; SMITH, 2011). Estas células constituem entre 90 a 95% do total de elementos celulares dos tendões. Os restantes 5 a 10% são compostos por condrócitos na zona de conexão óssea e de inserção, células sinoviais da bainha tendinosa, e células vasculares (endotélio e musculatura lisa) (SHARMA e MAFFULLI, 2005).

As células com intensa atividade de síntese são denominadas fibroblastos, enquanto as metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos. Os fibroblastos sintetizam as fibras colágenas e as glicoproteínas e proteoglicanas da matriz extracelular. Havendo estímulo adequado, como na cicatrização, o fibrócito pode voltar a sintetizar fibras, reassumindo a estrutura de fibroblasto (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os tendões são estruturas dinâmicas que se adaptam aos estímulos mecânicos, encontrando-se em constante renovação. Em situações fisiológicas os tenócitos mantêm o equilíbrio homeostático entre a destruição e a síntese de MEC. Este equilíbrio é mantido através de dois grupos de proteínas matriciais: as metaloproteinases e os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). As metaloproteinases são enzimas proteolíticas que degradam a MEC, sendo necessárias para a manutenção e reparação tecidual, e cuja atividade é em parte controlada pelos TIMPs (DAHLGREN, 2007).

Os tendões em desenvolvimento são altamente vascularizados, possuindo amplas redes capilares necessárias ao elevado metabolismo que caracteriza esta fase dos tecidos (McILWRAITH, 2002). No entanto, os tendões maduros são muito pouco vascularizados. Em termos comparativos, a circulação sanguínea do tendão equivale apenas a um terço da circulação que ocorre nos músculos (KAJIKAWA et al., 2008). Os tendões são nutridos de dois modos: por perfusão sanguínea, a partir da sua rede vascular intrínseca e extrínseca; e por difusão de nutrientes

provenientes da sinóvia que reveste as bainhas sinoviais (SMITH, 2011). 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, 2002)

A circulação sanguínea é imprescindível para a regeneração do tecido conjuntivo (KAJIKAWA ET AL., 2008). Por isso, após a ocorrência de uma lesão o tendão sofre um processo profuso de neovascularização (McILWRAITH, 2002; DAHLGREN, 2007). No caso de ruptura do tendão, formam-se aderências altamente vascularizadas entre o paratendão e o tecido conjuntivo tendinoso adjacente, assegurando o fluxo sanguíneo ao tecido lesionado (McILWRAITH, 2002; KANE e FIRTH, 2009). O exercício pode aumentar em até 200% o aporte sanguíneo para os tendões em animais que não eram submetidos à treinamentos anteriormente (SMITH, 2011).

Os tendões possuem, geralmente, uma grande resistência à tensão e uma elasticidade diminuída (McILWRAITH, 2002). Observadas ao microscópio óptico, em seções histológicas longitudinais, as fibras colágenas apresentam estriação longitudinal de aspecto ondulado. Esta característica permite estiramento de 3% das fibras tendíneas sem causar danos estruturais (SMITH, 2011). Depois de ultrapassar o limite da sua capacidade elástica, o tendão assume propriedades viscoelásticas, sofrendo alterações estruturais irreversíveis da substância fundamental da MEC (McILWRAITH, 2002). Existe também uma diminuição do padrão ondulado das fibras de colágeno com o aumento da idade do animal, principalmente nas fibras centrais. Durante o alongamento do tendão as fibras centrais são as primeiras a sofrer extensão por receber uma carga superior à recebida pelas fibras periféricas, sendo as primeiras a sofrerem rupturas quando ocorre uma tensão exagerada do tecido (SMITH e GOODSHIP, 2004; SMITH, 2011). O desaparecimento do padrão ondulado de um modo diferenciado é um fator contributivo para a ocorrência das lesões centrais (*“core lesions”*) nos tendões equinos. Estas alterações podem explicar a elevada incidência de lesões centrais no TFDS (SMITH, 2011).

No membro torácico, o TFDS tem origem no epicôndilo medial do úmero e no membro pélvico na fossa supracondilar do fêmur. Distal à articulação 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 interfalangeana proximal (SANDE et al., 1998). Ferraro et al. (2003) em um estudo com cortes histológicos de 14 membros do TFDS e TFDP indicou que não existem diferenças morfológicas entre os componentes histológicos para o TFDS e TFDP dos membros torácicos e pélvicos de um equino adulto.

2.2 ETIOPATOGENIA DA TENDINITE

A incidência de tendinites dos flexores superficiais em cavalos atletas representa quase metade (43%) dos animais que sofrem de patologias tendíneas e ligamentosas, e esta taxa pode aumentar com a idade (GILLIS, 2004). O local mais comum de lesão é a região central do metacarpo, onde se tem menor área de secção longitudinal tendínea, havendo ainda uma maior ocorrência no TFDS (McILWRAITH, 2002; FERRARO et al., 2003).

Para a manutenção do tecido tendinoso normal são necessários o equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos, e a presença de células residentes viáveis (DAHLGREN, 2007). Existem vários fatores e mecanismos que podem perturbar essa homeostase tais como idade do animal, exercício inadequado, fadiga, má conformação, falta de preparo físico e atividade muscular incoordenada que, por sua vez, aumentam a demanda metabólica da estrutura com consequente falha produtiva de MEC e morte dos tenócitos (SMITH e GOODSHIP, 2004; RAMÍREZ, 2006; SMITH, 2011). Como resultado, forma-se um tecido enfraquecido que não responde às necessidades locomotoras do equino, contribuindo para a elevada incidência e recorrência de lesões tendinosas (RAMÍREZ, 2006).

Existem também fatores intrínsecos envolvidos na fisiopatologia das lesões tendinosas, entre estes, podemos citar a hipertermia no centro da estrutura e a perfusão sanguínea insuficiente, que resultam em hipóxia tecidual e posterior liberação de radicais livres de oxigênio no tendão, durante o exercício (DAHLGREN, 2007; KANE e FIRTH, 2009; SMITH, 2011). Todos estes fatores, aliados a uma

estreita margem de segurança biomecânica dos tendões e ligamentos, conduzem, muito provavelmente, à elevada incidência de tendinites.

A lesão e degeneração tendínea podem ocorrer em diversos graus de intensidade, variando de subclínica leve à ruptura total do tendão. Esforços excessivos podem resultar em pequenos deslocamentos e ruptura nas fibras, o que resulta em hemorragia capilar dentro do tendão, exsudação e formação de hematoma intratendíneo, com conseqüente aumento de volume e inflamação. Este exsudato e a hemorragia separam e inevitavelmente enfraquecem as fibras tendíneas normais restantes, ampliando os danos ao tendão juntamente com a ação de proteases e collagenases liberadas continuamente pelos macrófagos do exsudato inflamatório (McILWRAITH, 2002).

A reparação tendinosa é um processo dinâmico onde ocorrem diferentes eventos celulares e bioquímicos. A reparação ocorre em três fases que vão se sobrepondo: inflamatória aguda, subaguda reparativa e crônica de remodelação (SMITH, 2011). Estas fases sobrepõem-se e a sua duração pode variar de acordo à localização da lesão, do tamanho da lesão e do número de fibras afetadas (LIN et al. 2004). Todas as fases são mediadas por inúmeros fatores de crescimento (FC) que atuam através de um conjunto de vias de sinalização inter-relacionadas (WROBLEWSKI, 2010; SMITH, 2011).

A fase inflamatória aguda dura de uma a duas semanas e é determinada por injúria severa, com inflamação, hemorragia tendínea, aumento do aporte sanguíneo local, edema e infiltrado leucocitário (SMITH, 2011). A inflamação inicial exacerbada resulta na libertação de enzimas proteolíticas, que removem o tecido necrótico, mas por outro lado destroem a MEC adjacente, bem como colágeno intacto, aumentando assim a extensão da lesão (KANE e FIRTH, 2009; SMITH, 2011).

Primeiramente ocorre extravasamento de sangue para a lesão devido à ruptura de vasos do endotendão e danos na MEC, formando-se assim um hematoma (SMITH e GOODSHIP, 2004; DAHLGREN, 2007). O processo hemostático inicia-se pela ativação de plaquetas, da cascata de citocinas vasodilatadoras e de mediadores pro-inflamatórios. Estes componentes iniciam a reação inflamatória através do incremento do aporte sanguíneo ao local com conseqüente formação de edema, infiltração de neutrófilos, macrófagos e monócitos,

e secreção de enzimas proteolíticas (SMITH, 2011). Os FC liberados ligam-se a componentes da MEC ainda intacta (colágeno, GAGs e proteínas adesivas) de modo a estabelecer gradientes quimiotáticos para o recrutamento celular de fibroblastos, leucócitos e células endoteliais. Nesta fase, a MEC atua como reservatório de citocinas, para que estas sejam progressivamente libertadas (LIN et al., 2004).

O aumento do grau de inflamação encontra-se proporcionalmente relacionado com o aumento da infiltração celular e, conseqüentemente, com a formação de uma maior quantidade de tecido de granulação (SMITH, 2011).

A fase subaguda reparativa tem seu pico em três semanas e é caracterizada por uma forte resposta angiogênica e acúmulo de fibroblastos no tecido danificado. Estas células são responsáveis pela síntese de tecido cicatricial que é composto por colágeno, predominantemente do tipo III, disposto de forma desorganizada. O tecido cicatricial formado inicialmente é menos resistente que o tendão, portanto fica predisposto a uma nova lesão (SMITH, 2011). Durante a resolução da inflamação, os macrófagos liberam uma série de fatores de crescimento, incluindo o transformador beta 1 (TGF- β 1), o fibroblástico básico (b-FGF) e o endotelial vascular (VEGF), que são essenciais para a angiogênese e início da reparação tendínea (MARSOLAIS e FRENETTE, 2005).

A extensão da fibroplasia está relacionada à severidade da injúria inicial e à injúrias contínuas, tal como a tensão biomecânica provocada pelo exercício. Dentro da bainha tendínea, o tendão não possui uma vasta contribuição das células externas, e, portanto, a cicatrização é lenta. Se a superfície do tendão está lesionada, geralmente este se adere à bainha, com conseqüências funcionais desastrosas (SMITH e WEBBON, 1999).

A fase crônica de remodelação inicia-se por volta da sexta semana após a lesão e perdura por seis a doze meses, ou até mesmo por mais tempo. Esta fase é caracterizada pelo aumento da resistência e da força tênsil da zona lesionada do tendão. As fibrilas débeis e finas de colágeno tipo III vão sendo substituídas gradualmente e lentamente por fibrilas de colágeno tipo I, maiores e com maior força tênsil (DAHLGREN, 2007). No entanto, apesar desta conversão, o tendão danificado não recupera completamente as propriedades biológicas e biomecânicas de um

tendão sadio. Exercícios controlados nesta fase podem ajudar na conversão do colágeno, além de melhor alinhar as fibras de colágeno na direção da força e evitar a formação das aderências, o que pode melhorar as propriedades mecânicas do tecido cicatricial (SMITH, 2011).

Reinjúrias são comuns após a completa cicatrização, no mesmo tendão ou no tendão contralateral. O tecido cicatrizado pode se tornar forte, no entanto com pouca elasticidade, o que resulta em um aumento de força nas estruturas adjacentes, sendo comuns lesões nas fibras adjacentes à cicatriz ou no tendão do membro contralateral (SMITH, 2011).

2.3 DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO

O exame clínico é o primeiro método para o diagnóstico de tendinite. Este pode ser visual, com o animal em repouso e durante exercício, e através de palpação e manipulação. O exame visa buscar claudicação, aumentos de volume, temperatura ou sensibilidade tendo como objetivo principal a identificação do local afetado (STASHAK, 2006; JORGENSEN e GENOVESE, 2011).

A fase aguda da tendinite é caracterizada por um edema difuso sobre a região afetada, associado com aumento de temperatura e sensibilidade local à palpação (REEF, 1998; SPEIRS, 1997). O equino pode apresentar claudicação leve à intensa, podendo chegar até mesmo a não apoiar o membro, mantendo-o em posição flexionada. A fase crônica manifesta-se por um aumento de volume algumas vezes doloroso, com ou sem calor, associado à fibrose e espessamento firme do tendão afetado na face palmar ou plantar (SPEIRS, 1997; McILWRAITH, 2002; JORGENSEN e GENOVESE, 2011).

A ultrassonografia do tendão é um método de diagnóstico por imagem prático e não-invasivo que permite detectar lesões precoces e pequenas na sua estrutura, como inflamação sutil entre as fibras, alteração da forma e posicionamento, característicos do processo de tendinite (RANTANEN e McKINNON, 1998). Esta técnica permite 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 (DENOIX et al., 1991; MARR et al., 1993).

De acordo com Speirs (1997) o exame ultrassonográfico deve ser realizado com o animal devidamente contido e a pele deve ser preparada com tricotomia no aspecto palmar/ plantar do membro sobre os tendões. O uso do gel no local, bem como a utilização de espaçador (*standoff pad*) é recomendado para melhora a qualidade da imagem (SPEIRS, 1997). O exame deve ser conduzido com o cavalo simetricamente em estação, com peso igualmente distribuído entre os membros torácicos e pélvicos, a fim de evitar-se a variação em tamanho e ecogenicidade causada pelas diferenças de peso sobre o tendão (SPEIRS, 1997; REEF, 1998).

Para a avaliação ultrassonográfica recomenda-se o uso de um aparelho portátil que permita a movimentação ao redor do animal. Imagens de alta resolução são obrigatórias, visto que tendões e ligamentos são estruturas relativamente pequenas (WRIGLEY, 2006). Os transdutores com frequência de 7,5 MHz são preferidos para avaliação de tendões e ligamentos, por proporcionar a obtenção de uma imagem com boa resolução (GENOVESE e RANTANEN, 1998), obtendo uma profundidade visível de 4 a 6 cm. Um transdutor de 10 MHz seria ideal para a visualização de estruturas mais superficiais e de menor calibre, como os tendões extensores e os ligamentos colaterais, atingindo uma profundidade de 2 a 4 cm (REEF, 1998).

O exame ultrassonográfico deve começar na região proximal e estender-se distalmente, com secções horizontais e longitudinais de cada região. Recomenda-se a divisão da região em sete zonas ou níveis, tomando como base a distância entre o carpo/ tarso e a articulação metacarpofalangiana/ metatarsofalangiana. O eixo maior do feixe de ultrassom deve ser perpendicular à estrutura alvo, a fim de obter-se imagens de qualidade máxima (SPEIRS, 1997).

A avaliação ecográfica dos tendões leva em conta cinco parâmetros básicos: tamanho, forma, textura, posição e alinhamento das fibras. O conhecimento destes parâmetros num tendão saudável é essencial para uma melhor interpretação das lesões. A relação com as várias estruturas integradas, como tecido subcutâneo, vasos sanguíneos, tecidos periligamentosos e peritendinosos e o contorno ósseo, deve também ser cuidadosamente avaliada (RANTANEN e McKINNON, 1998). No

exame, o TFDS normal apresenta-se isoecóico e em corte longitudinal é composto por fibras longas e paralelas e de ecogenicidade característica (REEF, 1998).

Os parâmetros ultrassonográficos essenciais para caracterizar, avaliar e monitorizar as lesões tendinosas são: área transversal do tendão (ATT); área transversal da lesão (ATL); percentual da área lesada no interior de cada tendão; a ecogenicidade da lesão; e o nível de organização dos feixes nas imagens ecográficas longitudinais ou o padrão de alinhamento das fibras (JORGENSEN et al., 2011; RANTANEN et al., 2011).

Os sinais ecográficos de lesão aguda dos tendões podem incluir aumento do diâmetro, variação anormal do padrão ecogênico (hipoecogênico a anecogênico), redução do padrão estriado nas imagens longitudinais, e alterações na forma, margens e posição do tendão ou ligamento. As lesões crônicas estão associadas a um aumento de ecogenicidade, e também a um padrão fibrilar irregular, indicadores da presença de tecido fibroso (SMITH e GOODSHIP, 2004; GILLIS, 2007).

A visualização longitudinal pode ajudar a determinar a localização e a extensão da lesão aguda através da observação de zonas de indefinição hipo ou anecóicas, onde ocorreu a interrupção de fibras (GILLIS, 2007). Nas lesões crônicas, ou durante o processo de remodelação da lesão, não se observa um padrão hiperecogênico linear, mas sim aleatório, derivado da existência de tecido cicatricial cujas fibras de colágeno, sobretudo do tipo III, que são mais curtas e possuem um maior número de ligações cruzadas. Nesta situação, enquanto na imagem transversal é observada uma melhoria no padrão de ecogenicidade do tendão lesionado, esta nem sempre é visualizada na imagem longitudinal (RANTANEN et al., 2011).

2.4 TENDINITE INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR COLAGENASE

O extrato purificado de colagenase bacteriana possui a característica de destruir enzimaticamente as fibras colágenas e, quando aplicado pela via intratendínea, pode ser utilizado como modelo experimental que mimetiza os sinais clínicos e os efeitos de uma lesão de ocorrência natural (ALVES et al., 2002). A destruição do colágeno pela administração da colagenase é caracterizada por áreas

hipoecóicas ou anecóicas, e o decréscimo da ecogenicidade depende diretamente da dose de colagenase administrada (SPURLOCK et al., 1989). A utilização de um modelo experimental em que haja padronização das lesões tendíneas permite a aplicação 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).

A presença de alterações clínicas locais correspondentes aos sinais de processo inflamatório, tais como, aumento de temperatura, aumento de volume e sensibilidade dolorosa local são observadas após a aplicação da colagenase (ALVES et al., 2002; BARREIRA, 2005; MAIA, 2008; YAMADA, 2009). De acordo com Williams et al. (1984), a administração de colagenase no centro de tendão resulta em rápida dissolução de fibras colágenas, necrose celular, hemorragia e inflamação, que se assemelha a muitos aspectos observados em lesões espontâneas decorrentes de traumas.

A dose de colagenase utilizada experimentalmente por via intratendínea é bastante variável (ALVES et al., 2002; MARXEN et al., 2004). Yamada et al. (2009) em um estudo com 12 equinos submetidos à aplicação de 1,25 mg ou 2,5 mg de colagenase por via intratendínea demonstraram que a dose maior da enzima apresentou melhor padronização ultrassonográfica para realização de estudos experimentais de tendinite do TFDS e se assemelhou mais a casos clínicos de lesão.

2.5 PLAQUETAS E FATORES DE CRESCIMENTO

As plaquetas sanguíneas são produzidas pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, que se localizam na medula óssea, e são liberadas diretamente na circulação sanguínea, ao redor do espaço hematopoiético medular (REBAR et al., 2003). As plaquetas são anucleadas e tem formato discoide, com diâmetro de 5 a 7 μm e largura inferior a 3 μm (FELDMAN, 2000).

As plaquetas possuem uma importante função no processo de cicatrização tecidual que se inicia com a homeostase, através da cascata de coagulação (PIETRZAK e EPPLEY, 2005). Além disto, ela também exercem um papel pro-

inflamatório, de regulação (MANNAIONI et al., 1997) e regeneração, ativado por mediadores através da interação celular, com neutrófilos e células endotélias, e liberação de fatores de crescimento (FC), citocinas e outras moléculas reguladoras (ANITUA et al., 2004).

A membrana das plaquetas contém receptores de glicoproteínas que são responsáveis pela ativação e agregação plaquetária. Estas glicoproteínas são divididas em três famílias: integrinas, proteínas ricas em leucinas e selectinas. As integrinas estão envolvidas em interação celular, agindo na agregação e adesão plaquetária e as leucinas contribuem para a mudança na membrana plaquetária no momento da sua desgranulação (TABLIN, 2000; GENTRY, 2000, PELAGALLI et al., 2003).

O citoplasma das plaquetas é constituído pelas mesmas proteínas citoplasmáticas dos megacariócitos (HARTWIG e ITALIANO, 2003; TABLIN, 2000; GENTRY, 2000) e apresentam microtúbulos, microfilamentos de actina e miosina, glicogênio, e três tipos de grânulos: lisossomais, alfa (α -grânulos) e denso. Os grânulos lisossomais contêm ácido hidrolisado, guanina, fosfolípídeos e quinases, que atuam como enzimas proteolíticas e hidrolíticas (TABLIN, 2000) Os grânulos densos contêm adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina, cálcio e fósforo, que atuam na migração plaquetária, enquanto os α -grânulos possuem fatores de coagulação e de crescimento e outras proteínas, que regulam a inflamação (ZUCKER-FRANKLIN et al., 1988).

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 plaquetas, serotonina e epinefrina) e farmacológicos (ionóforo de cálcio, cloreto de cálcio e análogos de endoperóxido cíclico) (BLOCKMANS et al., 1995; CARMONA et al., 2007).

Uma vez ativadas, as plaquetas sofrem modificações morfológicas, desenvolvendo pseudópodes para realizar a agregação plaquetária e posterior desgranulação de grânulos (PIETRZAK e EPPLEY, 2005; EVERTS et al., 2006). Quando ocorre a fusão dos α -grânulos com a membrana plasmática das plaquetas, é concluída concomitantemente a ativação biológica da maioria dos FC (CARTER et al., 2003). São os α -grânulos das plaquetas que contêm os FC (RAMÍREZ, 2006;

SCHNABEL et al., 2007; KAJIKAWA et al., 2008) e a liberação das proteínas dos α -grânulos no local da lesão promovem o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas (HARRISON e CRAMER, 1993). Mais de 95% dos fatores pré-sintetizados são excretados uma hora após a ativação das plaquetas. No entanto, as plaquetas continuam a sintetizar e liberar FC durante todo o seu tempo de vida (5 a 10 dias), prolongando os efeitos biológicos do PRP (MARX, 2004; WROBLEWSKI et al., 2010; TEXTOR, 2011).

Os FC são moléculas proteicas sinalizadoras que regulam o metabolismo celular através de interação com receptores de membrana, com posterior ativação das vias de sinalização intracelular e conseqüentemente aumento da transcrição proteica que, por sua vez, resulta em uma cascata de eventos biológicos responsáveis pela reparação e regeneração tecidual (DAHLGREN, 2007). Estes aceleram a cicatrização tecidual por meio da estimulação da proliferação celular e da neovascularização e do aumento da síntese de matriz extracelular. Além disto, os FC também inibem o catabolismo que degrada a matriz extracelular, tais como as interleucinas e as metaloproteinases da matriz (MMP) (OLEZA, 2009).

Como mecanismo de ação, os FC se unem aos receptores tirosina-quinase, que estão presentes nas membranas das células do tecido. Estes receptores se estendem desde a membrana citoplasmática até o interior do citoplasma e sua união com os FC leva a ativação de proteínas mensageiras que vão até o núcleo e ativam os genes responsáveis pela divisão celular. Como conseqüência, o RNA-m é transcrito, promovendo assim uma resposta biológica que inicia a cascata bioquímica que induz a reparação e regeneração tecidual (OLEZA, 2009).

Os FC 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 morfogenética óssea (BMPs). Já os FC mitogênicos estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese (HOCK e CANALIES, 1994). Cada FC possui funções próprias. No entanto, a regulação espaço-temporal dos fenômenos celulares essenciais à manutenção e reparação tecidual é complexa e requer a atuação sinérgica de vários FC (FOSTER et al., 2009).

Quadro 1 - Fonte e função de alguns fatores de crescimento (FC) presentes nas plaquetas.

Fator de crescimento	Fonte	Função
FC transformador beta (TGF-β).	Plaquetas, matriz óssea e cartilaginosa, linfócitos T helper (Th1) ativados, célula natural killer (NK), macrófagos, monócitos e neutrófilos.	Estimula a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; regula a mitogênese endotelial, fibroblástica e osteoblástica; regula a síntese de colágeno e secreção de colagenase; regula o efeito mitogênico de outros fatores de crescimento; estimula a quimiotaxia endotelial e angiogênese; inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos. ^{1,2,3}
FC fibroblástico básico (bFGF).	Plaquetas, células mesenquimais, macrófagos, condrócitos e osteoblastos.	Promove o crescimento e diferenciação de condrócitos e osteoblastos; é mitogênico para células mesenquimais; condrócitos e osteoblastos. ^{4,5}
FC derivado da plaqueta (PDGF).	Plaquetas, osteoblastos, células endoteliais, macrófagos, monócitos e células musculares lisas.	Mitogênico para células mesenquimais e osteoblastos; estimula a quimiotaxia e mitogênese em fibroblastos, células da glia e musculares lisas; regula a síntese de colágeno e secreção de colagenase; estimula a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos. ^{1,6}
FC epidermal (EGF).	Plaquetas, macrófagos e monócitos.	Estimula a quimiotaxia endotelial e angiogênese; regula a secreção de colagenase; estimula a mitogênese epitelial e mesenquimal. ^{7,8}
FC vascular endotelial (VEGF).	Plaquetas e células endoteliais.	Aumenta a angiogênese e permeabilidade vascular; estimula a mitogênese de células endoteliais. ^{3,9,10}
FC do tecido conjuntivo (CTGF).	Endocitose por plaquetas na medula óssea.	Promove angiogênese; regeneração da cartilagem; fibrose e adesão plaquetária. ^{11,12}
FC semelhante à insulina I (IGF-I).	Plaquetas.	Sinaliza as células mesenquimais e epiteliais a migrarem, dividirem e aumentarem a síntese de colágeno e matriz. ¹³

FC: fator de crescimento. 1: PIERCE et al. (1991), 2: BAMES et al. (1999), 3: MARSOLAIS e FRENETTE (2005), 4: ROSIER et al. (1998), 5: WANG (1996), 6: FRIESEL e MACIAG (1995), 7: CANALIS et al. (1989), 8: STEENFOS (1994), 9: MARTIN et al. (1992), 10: RHEE et al. (2004), 11: HOM e MAISEL (1992), 12: KUBOTA et al. (2004), 13: SCHWARTZ-ARAD et al. (2007).
 Fonte: MAIA e SOUZA, 2009.

Os FC mais conhecidos são: FC transformador beta (TGF- β), FC fibroblástico básico (bFGF), FC derivado da plaqueta (PDGF), FC epidérmico (EGF), FC endotelial vascular (VEGF), FC do tecido conjuntivo (CTGF) e FC semelhante à insulina I (IGF-I) (OLEZA, 2009). O quadro 1 resume a caracterização dos fatores de crescimento presentes nas plaquetas.

2.6 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena de fatores de crescimento de fácil aquisição e de baixo custo. Contém uma importante variedade de FC, essenciais na reparação tecidual (GONSHOR, 2002; KEVY e JACOBSON, 2004; MAIA e SOUZA, 2009). A terapia com PRP permite que ocorra uma ação conjunta de diversos FC, promovendo, assim a angiogênese, quimiotaxia, diferenciação e multiplicação de inúmeras linhagens celulares, além de síntese da MEC e de ácido hialurônico (OLEZA, 2009). Atualmente ainda não se sabe qual a concentração ideal de PRP para o tratamento de tendinites em equinos (FORTIER, 2009), mas pesquisas clínicas e científicas sugerem que uma concentração de plaquetas três a cinco vezes superior aos valores fisiológicos seria a desejável (KEVY e JACOBSON, 2004; SUTTER, 2007; MAIA e SOUZA, 2009).

O PRP funciona através da desgranulação dos α -grânulos das plaquetas, que são os reservatório dos FC, que, por sua vez, são a base da terapia. Existe uma relação proporcional entre a concentração plaquetária e os níveis de FC. Marx (2004), Pietrzak e Eppley (2005) referem que existe, *in vitro*, uma relação dose-resposta entre a concentração plaquetária e a proliferação de fibroblastos, e a produção de colágeno tipo I. Além disto, o efeito regenerador do PRP nas lesões tendinosas depende de volume e concentração de PRP utilizado, a extensão, o tipo e fase da lesão e a condição geral do animal (PIETRZAK e EPPLEY, 2005).

Uma vez que o PRP é ativado, *in vivo*, há uma liberação inicial de fatores de crescimento pré-sintetizados, que se inicia dez minutos após a formação do coágulo. Como dito anteriormente, na primeira hora após a ativação ocorre uma liberação massiva de FC contidos nos grânulos, porém as plaquetas continuam a sintetizar os FC durante seu período de vida (SUTTER, 2007). Kajikawa et al. (2008)

demonstraram que o PRP possui um efeito de ativação bimodal sinérgico sobre os fibroblastos. Ao que parece, além do efeito quimiotático e proliferativo direto sobre os fibroblastos, os FC do PRP também estimulam estas células indiretamente, através da atração de macrófagos à lesão, oriundos da circulação sanguínea. Isto porque, uma vez presentes no local da lesão, os macrófagos são induzidos a produzir FC essenciais à ativação de fibroblastos adjacentes (KAJIKAWA et al., 2008).

Na sua composição, o PRP também possui outros componentes além das plaquetas. Contêm 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 componentes dos α -grânulos (OLEZA, 2009).

As vantagens do PRP segundo Oleza (2009) são que este 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 imediato efeito 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.

Na medicina humana, o PRP vem sendo utilizado em tratamento de hérnias, ceratite, cirurgia maxilo-facial, plástica e ortopédica e suas aplicações continuam a se expandir. Na medicina veterinária equina seu principal uso ainda consiste em tratar lesões ortopédicas (OLEZA, 2009).

O uso de PRP em tendinites resulta em diminuição de colágeno tipo III face a um aumento do tipo I numa fase precoce do processo de reparação, o que é benéfico para a reparação do tendão (SCHNABEL et al., 2007; FORTIER, 2009). Abelantt e Prades (2009) avaliaram 72 equinos de esporte com lesões no TFDS

tratados com uma ou mais aplicações de PRP obtendo melhora clínica e ultrassonográfica em 75,7 a 79,5% de animais, os quais retornaram ao trabalho e uma percentagem menor de reinjúria (20-24%) comparado com o grupo controle (43-93%). Além disto, estudos demonstram que o PRP estimula um grande número de genes que codificam moléculas matriciais (COMP) sem aumentar a expressão génica de mediadores inflamatórios, como as metaloproteinases (MMPs), contribuindo assim para a produção de um tecido reparado com composição e estrutura mais semelhante à do tecido normal (SCHNABEL et al. , 2007).

Maia et al. (2009) realizaram um estudo em seis cavalos para avaliar histologicamente os efeitos do PRP no tratamento de tendinite do TFDS, induzida por colagenase. A análise histológica do grupo de tendões tratados com PRP evidenciou o alongamento e aumento da densidade dos fibroblastos, a presença de neovascularização, de infiltrados de linfócitos e plasmócitos e um nível variável de organização tecidual. Comparando com o grupo controle, a zona lesionada dos tendões tratados com PRP demonstrou maior organização da MEC em relação à disposição das fibras de colágeno e dos fibroblastos, e redução no número e tamanho do núcleo destas células durante a fase de remodelação, sugerindo uma maior maturidade do tecido cicatricial. Estes autores também verificaram diminuição na formação de aderências na superfície dos tendões no grupo tratado com PRP comparativamente aos tendões do grupo controle, reforçando a ideia de que o tratamento com PRP promove uma reparação tendinosa mais organizada e uniforme.

Bosch et al. (2009) usaram um método de análise computadorizada de imagens de ultrassonografia de lesões de TDFS após tratamento com PRP. Este método permitiu detectar diferenças significativas entre os grupos (tratados com PRP e controle) nas diferentes fases de reparação. Na fase final, nos animais tratados, 80% das imagens mostravam correto alinhamento das fibras comparando com 60% do grupo placebo.

Rajão et al. (2010) avaliou cinco equinos, três equinos da raça Puro Sangue Árabe, e dois da raça Mangalarga Machador, e diagnosticou através de exames clínicos e ultrassonográficos lesão no TFDS. Quatro dos animais apresentaram lesões focais e um lesão difusa. Foi realizada aplicação intralesional de PRP guiado

por ultrassonografia e os animais foram submetidos à atividade física controlada e progressiva a partir do segundo dia de aplicação do PRP. O acompanhamento com exames ultrassonográficos ocorreu semanalmente no primeiro mês e mensalmente a partir do segundo. Como resultado, notou-se preenchimento da lesão mais precocemente e melhor alinhamento de fibras em relação a animais tratados com terapias convencionais.

2.7 MÉTODOS DE PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Ramírez (2006) descreve três métodos: o método de aférese (automático); o método do *buffy-coat* (semi-automático); e o método dos tubos (manual). As características mais importantes para a avaliação do método de preparação são a eficiência da concentração de plaquetas, a reprodutibilidade e a esterilidade do produto final. Muitos autores também defendem que deve ser avaliada a concentração de leucócitos e o nível de ativação plaquetária do PRP (RAMÍREZ, 2006; FORTIER, 2009; McLELLAN e PLEVIN, 2011; TEXTOR et al., 2011). As principais diferenças operacionais entre sistemas são o volume de sangue requerido e a manipulação técnica da amostra durante o processo de centrifugação e/ou separação sanguínea (FOSTER et al., 2009; McLELLAN e PLEVIN, 2011).

Em termos de resultados, a diferença fundamental baseia-se no rendimento da concentração plaquetária e de FC. No entanto, não existem evidências científicas para considerar a superioridade de um sistema sobre outro, em parte devido à falta de informação sobre a concentração ideal de plaquetas e FC, e porque tecidos diferentes possuem diferentes requisitos biológicos para a sua reparação (FOSTER, 2009; McLELLAN & PLEVIN, 2011).

Whitman et al (1997) introduziu o uso de gel de plaquetas autólogas em cirurgias maxilo-facial humana como 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., 2003, APPEL et al., 2002, WEIBRICH, 2003, EPPLEY et al., 2004). Segundo Carmona (2007), 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). Além disto, 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 extração venosa, preparação e administração do PRP (MARX, 2004).

Os métodos de centrifugação manual e automatizado são os mais utilizados em medicina veterinária para produzir PRP. O volume de PRP obtido através destas técnicas está em torno de 10% de volume do sangue total extraído e, para serem obtidos valores mais elevados de plaquetas no concentrado, o sangue é retirado de veias periféricas (PIETRZAK e EPPLEY, 2005), principalmente da veia jugular. O PRP só pode ser produzido a partir de sangue anticoagulado (FOSTER et al., 2009) e dentro os diversos tipos de anticoagulantes o citrato de sódio é o que melhor preserva a integridade da membrana das plaquetas, sendo o mais utilizado para realização da técnica (MARX, 2004; TRINDADE-SUEDAM et al., 2007).

Segundo Nagata et al. (2010) os protocolos com dupla centrifugação obtêm maiores concentrações plaquetárias do que com uma única centrifugação. Além disto, a centrifugação simples é menos utilizada porque induz a maior ativação das plaquetas equinas durante o processamento do PRP, o que significa maior quantidade de FC descartada no sobrenadante (RAMÍREZ, 2006; McLELLAN e PLEVIN, 2011). Utilizando o protocolo para obtenção do PRP com dupla centrifugação, ocorre que na primeira centrifugação são separadas as células vermelhas (7 µm de diâmetro) e brancas (7-15 µm de diâmetro) das plaquetas (2 µm de diâmetro), devido à diferença de densidade. Na segunda centrifugação ocorre a concentração das plaquetas, produzindo o PRP e o plasma pobre em plaquetas (PPP), que é descartado (FOSTER et al. 2009).

A força e a duração da centrifugação devem ser tomadas em consideração para assegurar a reprodutibilidade do método, porque podem levar a diferenças na concentração de plaquetas (WROBLEWSKI et al., 2010). Vendruscolo, et al. (2012)

compararam diferentes protocolos de centrifugação para obtenção de PRP, e observaram que com forças de centrifugação altas não se obtém altas concentrações plaquetárias, Isto porque o emprego de forças excessivas faz com que as plaquetas sejam ativadas ou lesadas durante a centrifugação levando a formação de *pellets* no fundo do tubo.

A maximização da concentração de plaquetas, pretendida pelos métodos de obtenção de PRP, leva também a um aumento da concentração de leucócitos (SUTTER, 2007), que está altamente correlacionada com um aumento de mediadores inflamatórios como as MMPs. A concentração de leucócitos deve ser a mínima possível de forma a maximizar a síntese da matriz e minimizar a inflamação após a administração (FORTIER, 2009).

Durante o preparo do PRP, é importante o estudo prévio do agente ativador. Segundo Sanchez et al. (2003), a trombina bovina pode ocasionar o desenvolvimento de anticorpos contra os fatores de coagulação V, XI e a trombina, podendo desencadear coagulopatias fatais. De acordo com estes autores, os métodos seguros para o preparo do PRP incluem a utilização de trombina recombinante humana, trombina autóloga ou extra-purificada. Estudo realizado em coelhos por Silva (2007), com o propósito de se avaliar a ação do PRP em falhas ósseas realizadas no crânio de coelhos, demonstrou que a trombolastina utilizada para a formação do gel de plaquetas incitou uma reação semelhante a do tipo corpo-estranho que atuou negativamente na fase inicial de reparação. Alguns trabalhos têm utilizado o cloreto de cálcio como ativador das plaquetas e não foi observado qualquer tipo de reação local (CARMONA et al., 2007; MAIA, 2008).

De acordo com Oleza (2009), a administração de PRP ativado com cloreto de cálcio ou congelado (plaquetas liofilizadas), proporciona máxima concentração inicial de FC, que diminuirá ao longo dos próximos 3 a 4 dias. No entanto, quando administrado PRP fresco, estima-se que a liberação de FC é realizada progressivamente ao longo das 92 horas seguintes à aplicação (Figura 1) (McCARREL e FORTIER, 2009; FORTIER, 2009).

A ativação do PRP também ocorre pela sua exposição ao colágeno que, por sua vez, se encontra no tecido tendinoso (WROBLEWSKI et al., 2010). Assim, devido à presença do colágeno *in situ*, ocorre ativação plaquetária logo após a

administração de PRP na zona da lesão tendinosa (TEXTOR et al., 2011). Textor et al. (2011) revelaram no seu estudo que a liberação de PDGF-BB e TGF- β 1 é dependente da concentração de colágeno presente no tecido lesionado. Por estes motivos, o colágeno tipo I tem sido avaliado como uma boa alternativa à utilização de trombina ou cálcio. A ativação *in vivo* das plaquetas através do colágeno tipo I tem a vantagem de induzir a formação lenta do coágulo, assegurando uma liberação também lenta dos FC na área de interesse, podendo ser considerado um ativador superior aos restantes, do ponto de vista terapêutico (FOSTER et al., 2009; MISHRA et al., 2009).

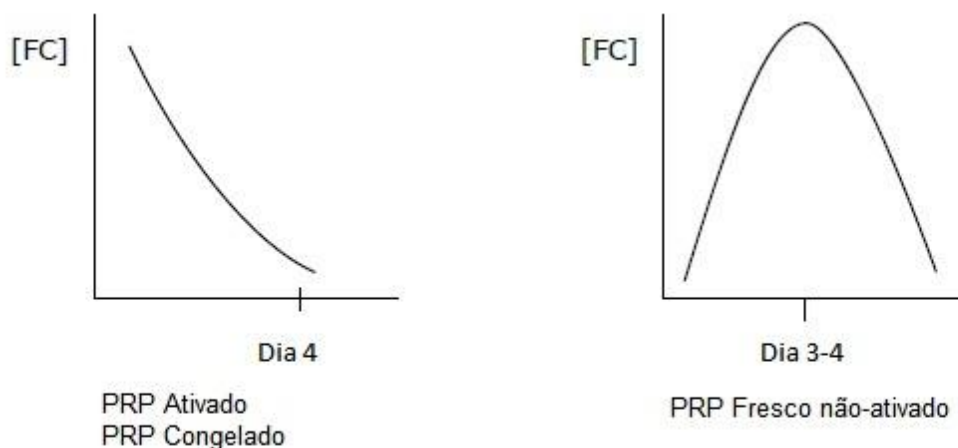


Figura 1. Diferença de concentração de fatores de crescimento (FC) em relação aos dias, após a administração do plasma rico em plaquetas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados cinco equinos hípidos, sem raça definida, quatro machos castrados e uma fêmea, com idade entre seis e vinte anos de idade, provenientes do Regimento de Polícia Montada do Distrito Federal. O experimento foi submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), sob processo UnBDOC nº 54225/2011, por estar de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Anexo 1).

Os animais pré-selecionados foram submetidos a exame físico geral segundo Speirs (1997), onde foram avaliados coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar (TPC), grau de hidratação, frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos intestinais, temperatura retal (TR) (Quadro 2) e comportamento, em que, apenas animais de fácil manejo foram incluídos no estudo.

Quadro 2 - Parâmetros obtidos durante exame físico geral pré-experimento dos animais utilizados no projeto.

Animal	FC (bpm)	FR (mpm)	TR (°C)	Mucosas	TPC (s)	Grau de hidratação
I	36	11	37,6	róseas	2"	Hidratado
II	48	21	37,1	rósea pálida	2"	Hidratado
III	26	9	37,4	rósea pálida	2"	Hidratado
IV	50	9	37,5	rósea	2"	Hidratado
V	36	10	37,4	róseas	2"	Hidratado

Adicionalmente, foi realizado exame estático e dinâmico do aparelho locomotor, como descrito por Stashak (2006), sendo descartados animais com desvio grave dos membros ou que apresentassem claudicação. Foram realizados exames ultrassonográficos da região metacárpica/ metatársica dos membros

torácicos e pélvicos. Apenas aqueles animais que não apresentaram lesões do aparelho locomotor foram incluídos no estudo.

Todas as avaliações ultrassonográficas realizadas no experimento ocorreram com os animais em estação e ambos os membros torácicos apoiados, para que não houvesse erro de interpretação. O equipamento utilizado era portátil, da marca Kaixin 5000, com transdutor linear de 7,5 MHz. As imagens foram realizadas em planos transversal e longitudinal, como auxílio de *stand off* e arquivadas para posterior leitura e comparação em diferentes momentos.

3.2 MANEJO DOS ANIMAIS

Os equinos selecionados foram mantidos em baias individuais, recebendo feno de *Coast Cross* e ração comercial. Receberam sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram vacinados e vermífugados de acordo com o manejo seguido pelo Regimento de Polícia Montada do Distrito Federal.

3.3 EXAMES HEMATOLÓGICOS

Os exames hematológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica da FAV/UnB. As coletas de sangue foram realizadas antes do procedimento de indução da tendinite (D0), no dia da realização do tratamento com PRP (D14) e quatorze dias após (D28).

As amostras destinadas aos exames hematológicos foram coletadas por punção da jugular externa, em tubos coletores a vácuo de 13x75 mm com anticoagulante EDTA (Vacuette®) e utilizadas agulhas descartáveis 25x0,8 mm (Terumo®). Após a coleta, as amostras foram refrigeradas até o momento do processamento.

Os hemogramas foram realizados em contador automático de células (ABX Micros ABC Vet – Horiba ABX Diagnostics – Montpellier, França). Foram determinados o número total de eritrócitos (Hem), os valores de volume globular

(VG), contagem do número total de leucócitos (Leuc), contagem das proteínas totais (PPT) e contagem de plaquetas (PLT).

Para a realização da contagem diferencial de leucócitos, foram confeccionados os esfregaços sanguíneos corados de acordo com a técnica descrita por Romanowsky (Olicheski, 2003), para posterior diferenciação celular manual em microscópio óptico (Olimpus C011).

3.4 INDUÇÃO DA TENDINITE

A lesão tendínea foi induzida em três membros de cada animal, torácico direito, torácico esquerdo e pélvico esquerdo, sendo assim, um dos membros do animal foi utilizado como o seu próprio controle. Todas as lesões foram induzidas no terço médio do Tendão do Músculo Flexor Digital Superficial (TFDS). No dia anterior à indução da tendinite, os membros torácicos e pélvico esquerdo foram tricotomizados na região metacárpica palmar. Realizou-se mensuração da região metacárpica palmar da borda distal do osso acessório do carpo até a borda proximal dos sesamóides proximais, para então utilizar-se a parte média como ponto de referência. Este ponto foi marcado com uma linha de tricotomia na lateral (Figura 2), que indicava o local onde seria realizada a indução da tendinite. Da mesma forma, ocorreu a mensuração da região metatársica plantar, que se estendeu da borda distal do osso calcâneo até a borda proximal dos ossos sesamóides proximais, tomando o ponto médio como referência.

A indução da lesão foi realizada mediante a administração intratendínea de 2,5 mg de colagenase tipo I por membro (Gibco™, part. P1503). Para isto, 2,5 mg da enzima foram pesados em balança de precisão Marte® AY220 e transferida para um tubo estéril Vacuette® onde foi acrescido 1 mL de solução salina 0,9% (Isofarma®). Posteriormente, a solução foi homogeneizada e aspirada em uma seringa de 20 mL, a qual foi acoplado a filtro Millipore de 0,22µm (MILLEX®GP) para esterilização do conteúdo. Esta solução foi transferida para uma seringa (Terumo®) de três mL e acondicionada em gelo até o momento da sua aplicação, que foi realizado no mesmo dia.



Figura 2. Vista lateral esquerda do membro torácico de um equino ilustrando: (a) o ponto de referência para a aplicação da colagenase tipo I (seta vermelha); e (b) posicionamento do transdutor para a aplicação guiada pelo ultrassom.

Para a administração da colagenase, os animais foram contidos em brete de contenção próprio para equinos e sedados com Xilazina (Xylamax®) a 10% na dose de 1mg/kg, por via intravenosa. Realizou-se antissepsia da região metacárpica/metatársica palmar com clorexidine degermante (Riohex® 2%), clorexidine alcoólico (Riohex® 0,5%) e álcool (Wirath®) e logo após procedeu-se o bloqueio dos nervos palmares medial e lateral na região metacárpica proximal utilizando 3mL de cloridrato de lidocaína 2% (Xylestesin®) sem vasoconstritor em cada ramo do nervo.

O transdutor foi posicionado no plano transversal no terço médio do membro torácico ou pélvico, no ponto pré-determinado, localizou-se o TFDS e realizou-se a infiltração da colagenase utilizando-se agulha hipodérmica descartável 30x08 mm (Terumo®). Para manter o ambiente asséptico, o transdutor foi protegido com uma luva estéril (Figura 2).

Após o procedimento, a região foi protegida, por 48 horas, com algodão e atadura de 15cm. No período compreendido entre a indução da tendinite e o início do tratamento estipulado, os animais permaneceram em repouso na baia. Durante as semanas que se seguiram, a tricotomia lateral era reforçada para indicar o ponto de referência para acompanhamento da lesão.

Mesmo sabendo da importância da analgesia, optou-se pela não utilização de anti-inflamatórios, como analgésicos, devido a sua possível interferência com a indução da tendinite, bem como interferência no tratamento proposto. Caso algum animal apresentasse sinais clínicos de dor provocado pela indução da tendinite, era prevista a utilização do analgésico opióide, meperidina (Dolatina® 50 mg/2ml), na dose de 2 mg/kg, via intramuscular a cada 6 horas, enquanto o animal apresentasse sinais de dor.

3.5 PROTOCOLO LABORATORIAL PARA OBTENÇÃO DO PRP

Para a coleta do sangue com a finalidade de obter o PRP, realizou-se antissepsia prévia do suco jugular com clorexidine degermante (Riohex® 2%) e álcool (Wirath®). Foram coletados 84mL de sangue de cada animal através de punção da jugular externa. Para tal, foram utilizados 24 tubos a vácuo com capacidade de 3,5mL contendo, como anticoagulante, citrato de sódio a 3,2% (Vacuette®). O sangue total coletado foi submetido à contagem manual de plaquetas, de acordo com o método de Brecher e Cronkite (1950).

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 1 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, onde foram contados cinco campos dos quadrados menores de forma homogênia,

empregando-se microscópio óptico. Para determinação final do número de plaquetas encontradas multiplicou-se o valor obtido por 2500, para desta maneira se obter a concentração em μL .

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 200G por 3 minutos. De cada tubo centrifugado, descartou-se os primeiros 50% do plasma sobrenadante e o restante do plasma foi reservado em tubo estéril sem anticoagulante. O plasma reservado foi submetido à uma nova centrifugação de 600 G por 6 minutos e, os primeiros 75% do plasma foram descartados (plasma pobre em plaquetas) para assim se obter a fração do plasma rico em plaquetas (PRP), de acordo com a técnica descrita por Rajão et al. (2010). As fases da obtenção do PRP estão ilustradas na figura 3.

A avaliação da concentração de plaquetas no PRP foi realizada pelo mesmo método utilizado previamente, logo após a segunda centrifugação.

Para a ativação do plasma, 2,5 mL da fração do PRP e 125 μL de uma solução 12,5 mM de cloreto de cálcio dihidratado foram misturados em um tubo estéril e sem anticoagulante. Posteriormente, o PRP foi incubado em estufa a uma temperatura de 20 a 22°C por duas horas, com a finalidade de estimular a degranulação plaquetária. Adicionalmente, para liberação do coágulo de fibrina formado, foi realizada nova centrifugação a 100 G por oito minutos, com a finalidade de facilitar a aplicação intratendínea do PRP.

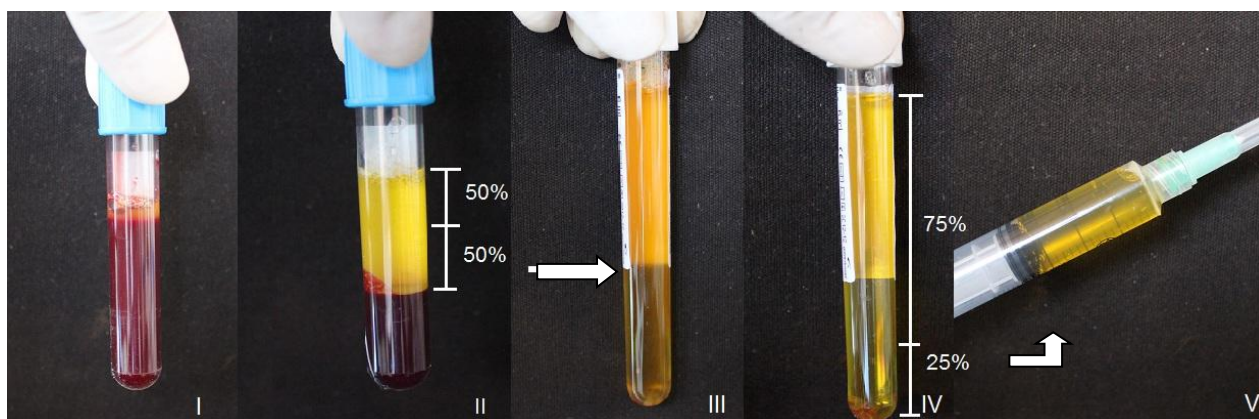


Figura 3 . Diferentes momentos de preparo do PRP: sangue total (I), sangue após a primeira centrifugação (II), plasma separado após a primeira centrifugação (III), plasma após segunda centrifugação (IV) e plasma rico em plaquetas (V).

As amostras prontas para aplicação foram acondicionadas em gelo, sendo utilizadas em até duas horas após o preparo.

3.6 TRATAMENTO

Os três membros nos quais a tendinite foi induzida foram tratados quatorze dias pós-indução da lesão. Um membro recebeu 2,5 mL injeção de solução salina 0,9%, sendo considerado o grupo controle (GC); o segundo membro recebeu injeção de 2,5mL PRP sem ativação (GTI); e o terceiro membro recebeu injeção de 2,5mL de PRP com ativação por cloreto de cálcio (GTA). Ocorreu revezamento randômico dos membros de cada animal (membro torácico esquerdo, torácico direito ou pélvico esquerdo) e o tratamento estipulado (GC, GTI ou GTA), para reduzir a influência do membro utilizado nos resultados, tendo como base a distribuição desigual de peso entre os membros torácicos e pélvicos.

Para as injeções dos tratamentos, os animais foram novamente contidos, sedados, submetidos à tricotomia e antissepsia dos membros e bloqueio dos nervos digitais palmares assim como descrito para a injeção da colagenase. A aplicação intralesional do PRP ou solução salina foi guiada por imagens ultrassonográficas (Figura 4). Para a aplicação foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis (Terumo®) 30x08 mm e seringas de 3 mL.

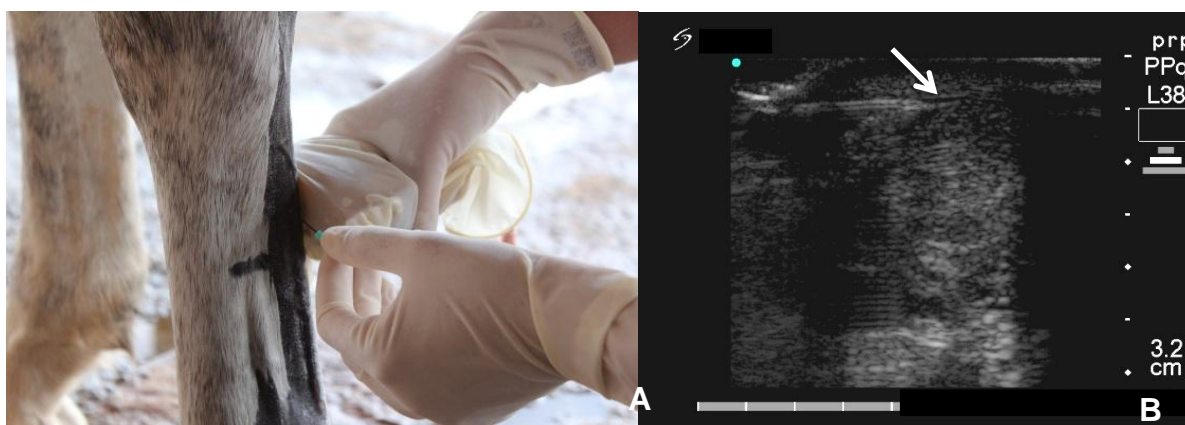


Figura 4 . (a) Demonstração da aplicação intralesional guiada por ultrassom; (b) imagem ultrassonográfica de corte transversal demonstrando a agulha (seta branca) no Tendão Flexor do Músculo Digital Superficial.

3.7 FISIOTERAPIA

A fisioterapia dos animais teve início no dia seguinte ao tratamento. Consistiu em caminhada em piso plano e duro com os animais puxados por cabresto, conforme o recomendado por Fortier (2009). O tempo de atividade física teve início com 10 minutos na primeira semana, com acréscimos de 5 minutos por semana, chegando ao máximo de 30 minutos o qual foi mantido até a 49º dia.

3.8 EXAMES FÍSICO E ULTRASSONOGRÁFICO

Os exames físicos e ultrassonográficos foram realizados no dia da administração da colagenase (D0- dia zero) e nos dias D2, D7, D14 (dia do tratamento) e semanalmente até D49.

O exame físico do aparelho locomotor dos animais seguiu o preconizado por Speirs (1997). Foram realizados testes por meio de palpação e inspeção da região metacárpica palmar dos membros torácico e pélvico esquerdo. A sensibilidade foi classificada em insensível (ZERO), pouco sensível (I), moderadamente sensível (II), sensível (III) e intensamente sensível (IV). O aumento de temperatura local foi avaliado e classificado como sem calor (ZERO), calor leve (I), calor moderado (II) e calor intenso (III). Da mesma forma, o pulso digital foi classificado em ausente (ZERO), leve (I), moderado (II) e intenso (III).

Para determinação da presença de edema foram realizadas, com auxílio de uma fita métrica, medidas do perímetro na região onde a tendinite foi induzida (ponto 1 = P1), e nos extremos proximal (ponto 2 = P2) e distal (ponto 3 = P3) do metacarpo/ metatarso (Figura 5).



Figura 5. Fotografias da vista lateral esquerda do terço médio da mão de equino visando a mensuração dos perímetros de P1 (a), P2 (b) e P3 (c).

As imagens ultrassonográficas foram capturadas como descrito anteriormente e avaliadas a área transversal do tendão (ATT), área transversal da lesão (ATL), ecogenicidade das lesões e paralelismo das fibras colágenas. Para a mensuração da ATT e da ATL (mm^2) foi utilizado o programa ImageJ, para as análises das imagens transversais. Para a gradação de ecogenicidade e do paralelismo todas as imagens foram avaliadas por cinco pessoas diferentes, visando assim amenizar eventuais subjetividades.

A ecogenicidade da lesão foi graduada a partir de imagens armazenadas transversalmente em escalas de 0 a IV, segundo a classificação de Genovese et al. (1986); sendo: escala 0 = padrão normal do tendão (isoeecóico); escala I = redução em 25% do padrão isoeecóico (predominantemente isoeecóico); escala II = redução em 50% do padrão isoeecóico; escala III = redução em 75% do padrão isoeecóico (predominantemente anecóico); e escala IV = redução em 100% do padrão isoeecóico (totalmente anecóico).

O paralelismo das fibras de colágeno foi avaliado à partir das imagens obtidas longitudinalmente e graduado em escala de 0 a III, conforme descrito por Alves et al. (2001), sendo 0 = ausência de paralelismo, I = paralelismo discreto; II = paralelismo parcial e III = paralelismo total.

A figura abaixo mostra a linha do tempo das diferentes etapas realizadas durante o experimento.

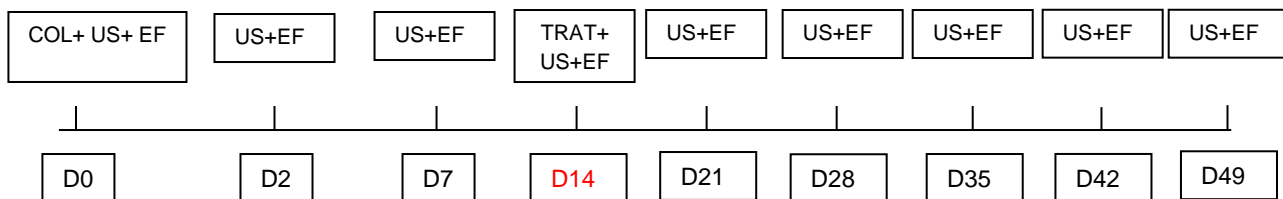


Figura 6. Etapas do experimento: aplicação da colagenase (COL), tratamento com injeção do PRP nos grupos tratados e de solução salina no controle (TRAT), exame físico (EF) e ultrassonográfica (US).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a apresentação e interpretação dos resultados foram utilizados os programas Graph Pad Prim e Stat 3. Para avaliação dos dados dos hemogramas, os valores foram tabulados e submetidos à análise estatística para a determinação da média e desvio-padrão dos hemogramas completos nos dias D0, D14 e D28. Ademais estes foram avaliados por meio da aplicação de um teste de Análise de Variância Simples, com nível de significância de 5% e como pós-teste fez-se uso do teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Os parâmetros ATT e ATL foram submetidos à análise descritiva, obtendo-se a média e o erro padrão. Os dados relativos à ATT e ATL foram submetidos à aplicação do teste Kolmogorov-Sminorv visando a verificação da distribuição normal. Em seguida, estes dados foram submetidos à aplicação da Análise de Variância Simples, com nível de significância de 5% e como pós-teste o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Visando ainda o entendimento dos dados qualitativos obtidos durante o experimento, fez-se uso de uma análise de frequência para os parâmetros sensibilidade, calor, pulso, ecogenicidade e paralelismo de fibras. Buscando assim a determinação das relações existentes entre os diferentes dias de tratamento a partir da indução da tendinite, conforme os diferentes protocolos aplicados.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Não houve diferença entre os parâmetros de número total de eritrócitos, volume globular, contagem de leucócitos e contagem de plaquetas, durante o experimento (Tabela 1). Porém, os valores para Proteínas Totais (PPT) no D14 apresentaram-se superiores que D0 ($p < 0,05$) (Figura 7).

Tabela 1. Valores mínimos e máximos das variáveis hematológicas: número total de eritrócitos (Hem), volume globular (VG), leucócitos (Leuc), proteínas totais (PPT.) e plaquetas (Plt) obtidas durante a fase experimental, nos equinos estudados.

Animal	Hem. ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	VG (%)	Leuc ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PPT. (g/dL)	PLT. ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
	Mín-Máx ($\bar{X} \pm s$)	Mín-Máx ($\bar{X} \pm s$)	Mín-Máx ($\bar{X} \pm s$)	Mín-Máx ($\bar{X} \pm s$)	Mín-Máx ($\bar{X} \pm s$)
I	6,18 – 6,81 (6,60 \pm 0,210)	26 – 33 (30,333 \pm 2,186)	7,5 – 9,2 (8,1 \pm 0,551)	5,8 – 7,5 (6,06 \pm 0,262)	215 – 300 (265 \pm 25,628)
II	5,15 – 6,63 (5,393 \pm 0,139)	26 – 27 (26,333 \pm 0,333)	7,3 – 7,7 (7,333 \pm 0,12)	6,02 – 6,6 (6,267 \pm 0,17)	210 – 250 (226,667 \pm 12,019)
III	6,31 – 6,61 (6,50 \pm 0,0954)	28 – 33 (29,333 \pm 1,856)	7,0 – 7,7 (7,4 \pm 0,268)	6,0 – 6,4 (6,267 \pm 0,133)	155 – 185 (170 \pm 8,660)
IV	5,25 – 6,04 (5,707 \pm 0,236)	19 – 29 (24,667 \pm 2,963)	9,3 – 15,1 (11,767 \pm 1,729)	4,8 – 6,4 (5,733 \pm 0,481)	220 – 250 (233,333 \pm 8,819)
V	5,04 – 5,34 (5,323 \pm 0,159)	24 – 28 (25,667 \pm 1,202)	4,1 – 8,5 (6,9 \pm 1,405)	6,2 – 7,0 (6,533 \pm 0,240)	170 – 255 (218,333 \pm 25,221)

Mín: mínimo; Máx: máximo; s: desvio padrão.

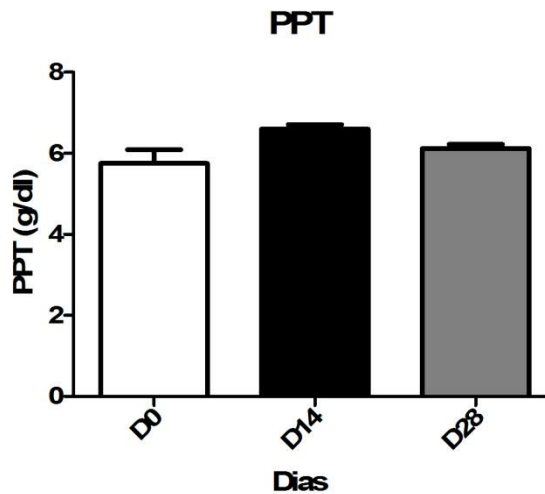


Figura 7. Representação da média da concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) em relação ao D0, D14 e D28, Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o dia zero (D0) e dia 14 (D14).

4.2 INDUÇÃO DA TENDINITE

A indução da tendinite com 2,5 mg de colagenase tipo I por tendão mostrou-se eficaz, pois foram observadas lesões ultrassonográficas em todos os membros avaliados, bem como sinais clínicos de aumento da sensibilidade, calor e aumento de volume no local (Tabelas 3, 4 e 5). Durante o exame clínico geral realizado nas diferentes fases do experimento não foram evidenciadas alterações de postura, comportamento, grau de hidratação, mucosas, motilidade intestinal e consistência das fezes. Não foi notado grau de sensibilidade exacerbada ou dor severa em nenhum dos membros nos dias posteriores à indução, não necessitando a administração de meperidina.

4.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Conforme exposto na tabela 2, a concentração de plaquetas do sangue total dos animais do experimento variou de 180.000 a 300.000 plaquetas. μL^{-1} . Já no

plasma rico em plaquetas (PRP), a concentração foi de 425.000 a 654.000 plaquetas. μL^{-1} . Isto representou uma concentração de plaquetas no PRP que variou de 2,45 a 3,45 vezes em relação à concentração no sangue total.

Tabela 2. Concentração de plaquetas no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP) nos equinos avaliados.

Animal	Plaquetas no Sangue Total	Plaquetas PRP	Concentração
	($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	(n° de vezes)
I	180	425	2,45
II	230	480	2,5
III	253	545	2,92
IV	265	550	2,85
V	290	625	3,35
V	300	654	3,45
$\bar{X} \pm s$	$253 \pm 45,936$	$546,5 \pm 35,08$	$2,92 \pm 0,17$

\bar{X} : média; s: desvio padrão.

4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Para o entendimento dos parâmetros clínicos de sensibilidade, calor e pulso foi realizada uma distribuição de frequência, sem intervalo de classe, como análise descritiva. Em relação à sensibilidade, os animais foram classificados como insensível (ZERO), pouco sensível (I), moderadamente sensível (II), sensível (III) e intensamente sensível (IV). Na primeira avaliação (D0), todos os equinos no início de experimento foram classificados como insensíveis em relação à região média do TFDS. Após a indução da tendinite, todos os equinos apresentaram sensibilidade de II a IV no local da lesão. No D2 e D14 houve ocorrência bastante heterogênea de sensibilidade nos três grupos, mas não pode ser observada diferença entre os grupos. No D21, foi observada diminuição da sensibilidade nos três grupos, aumentando-se o percentual de animais insensíveis para 40% nos grupos GC e GTI e 60% no GTA (Tabela 3).

No D28, o grupo GTA apresentou 100% dos seus animais insensíveis ou pouco sensíveis, chegando a 100% dos animais insensíveis no D35, enquanto o GC e GTI ainda apresentaram 40% dos seus animais com classificação sensível ou moderadamente sensível. No D42, o GTI demonstrou 80% de animais insensíveis, enquanto o GC ainda apresentou animais (20%) com classificação moderadamente sensível (Tabela 5).

Tabela 3. Distribuição da frequência da variação de sensibilidade, de acordo com as escalas zero a IV determinados por Speirs (1997), nos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).

Sensibilidade %	D0					D2					D7				
	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV
GC	100	0	0	0	0	20	0	60	0	20	25	25	25	25	0
GTI	100	0	0	0	0	20	40	20	20	0	25	50	25	0	0
GTA	100	0	0	0	0	40	0	20	20	20	25	25	50	0	0
	D14					D21					D28				
	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV
GC	0	75	0	25		40	40	20	0	0	60	0	20	20	0
GTI	20	40	40	0	0	40	20	20	20	0	20	40	20	20	0
GTA	20	40	0	40	0	60	20	20	0	0	80	20	0	0	0
	D35					D42					D49				
	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV	Zero	I	II	III	IV
GC	40	40	20	0	0	60	20	20	0	0	40	20	20	20	0
GTI	40	40	0	20	0	80	20	0	0	0	40	40	20	0	0
GTA	100	0	0	0	0	60	40	0	0	0	40	60	0	0	0

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

Houve aumento de temperatura local nos três grupos após a indução da tendinite, sendo que no D7 100% dos equinos do experimento apresentavam calor leve a moderado (Tabela 4). Após o tratamento (D21), foi observada diminuição do calor local para ausente (40%) a leve (40%) no grupo GTA, sendo mais evidente neste grupo em relação aos outros grupos (Tabela 4). No dia 28, o GC apresentou 60% dos animais do grupo com ausência de calor, sendo que 80% dos animais dos grupos tratados apresentavam calor leve a moderado. No decorrer do período de

avaliação dos animais, notou-se diminuição do calor, sendo esta mais discreta no GTI (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição da frequência da variação de calor nos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).

Calor %	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	100	0	0	0	0	40	40	20	0	75	25	0
GTI	100	0	0	0	0	0	100	0	0	75	25	0
GTA	100	0	0	0	0	20	80	0	0	75	25	0
	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	25	25	50	0	0	80	20	0	60	40	0	0
GTI	40	0	60	0	20	20	40	20	20	60	20	0
GTA	40	0	60	0	40	40	20	0	20	40	40	40
	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	20	20	40	20	40	40	20	0	100	0	0	0
GTI	20	20	40	20	60	40	0	0	60	40	0	0
GTA	20	20	60	0	40	40	20	0	80	0	20	0

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

Tabela 5. Distribuição da frequência da variação do pulso digital evidente nos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).

Pulso %	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	80	0	20	0	40	60	0	0	100	0	0	0
GTI	100	0	0	0	40	60	0	0	75	0	25	0
GTA	80	20	0	0	60	20	20	0	75	25	0	0
	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	100	0	0	0	60	40	0	0	100	0	0	0
GTI	80	20	0	0	80	20	0	0	100	0	0	0
GTA	60	20	20	0	100	0	0	0	100	0	0	0
	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	60	40	0	0	60	40	0	0	60	40	0	0
GTI	80	20	0	0	100	0	0	0	80	20	0	0
GTA	100	0	0	0	80	20	0	0	80	20	0	0

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

Após a indução da tendinite, ocorreu aumento do pulso digital variando de leve a moderado em todos os grupos (Tabela 5). Após o tratamento (D21), foi observado 100% dos animais do GTA e 80% dos animais do GTI com pulso ausente, enquanto no GC apenas 60% dos animais não apresentavam pulso digital. Nas últimas avaliações (D35, D42 e D49), ocorreu maior diminuição do pulso digital nos grupos tratados com PRP em relação ao GC, que manteve a mesma porcentagem de 40% dos animais com leve pulso digital (Tabela 5).

Os perímetros da região metacárpica/ metatársica não apresentaram diferenças entre os momentos de aferição, embora tenha havido discreto aumento de volume após a indução da tendinite. Também não foram detectadas diferenças entre os grupos avaliados. As médias e erro padrão, em centímetros, foram de $22,03 \pm 0,34$ a $23,24 \pm 0,49$ para o GC; $22,1 \pm 0,60$ a $22,54 \pm 0,77$ para o GTA e $21,42 \pm 0,43$ a $22,52 \pm 0,65$ para o GTI (Figura 8).

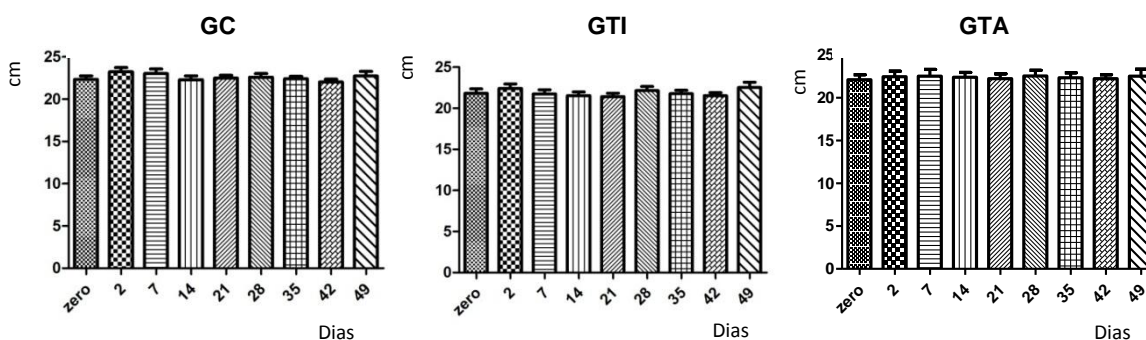


Figura 8. Variação dos perímetros da região metacárpica em centímetros em relação aos dias de avaliação entre o grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).

4.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Para cada imagem armazenada foram medidas as áreas do TFDS e da lesão (Figura 9). No D0, o valor médio da área do TFDS do GC foi de $127,07 \pm 6,21$ mm², do GTA foi de $125,06 \pm 9,03$ mm² e do GTI foi de $131,40 \pm 7,79$ mm². No D49, o

valor médio da área do tendão do GC foi de $120,39 \pm 4,76 \text{ mm}^2$, do GTA foi de $116,26 \pm 3,64 \text{ mm}^2$ e do GTI foi de $124,96 \pm 3,79 \text{ mm}^2$. Todos os grupos apresentaram aumento da área após a indução da lesão e posteriormente diminuição. Não foi verificada diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 6).

No D2 o valor médio da área da lesão do GC foi de $24,85 \pm 3,53 \text{ mm}^2$, do GTA foi de $21,20 \pm 1,31 \text{ mm}^2$ e do GTI foi de $21,85 \pm 1,92 \text{ mm}^2$. No D49, o valor médio da área da lesão do GC foi de $20,08 \pm 2,89 \text{ mm}^2$, do GTA foi de $17,18 \pm 3,69 \text{ mm}^2$ e do GTI foi de $16,78 \pm 3,36 \text{ mm}^2$. Todos os grupos apresentaram diminuição da área da lesão com o passar do tempo, porém em nenhum momento houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 6).

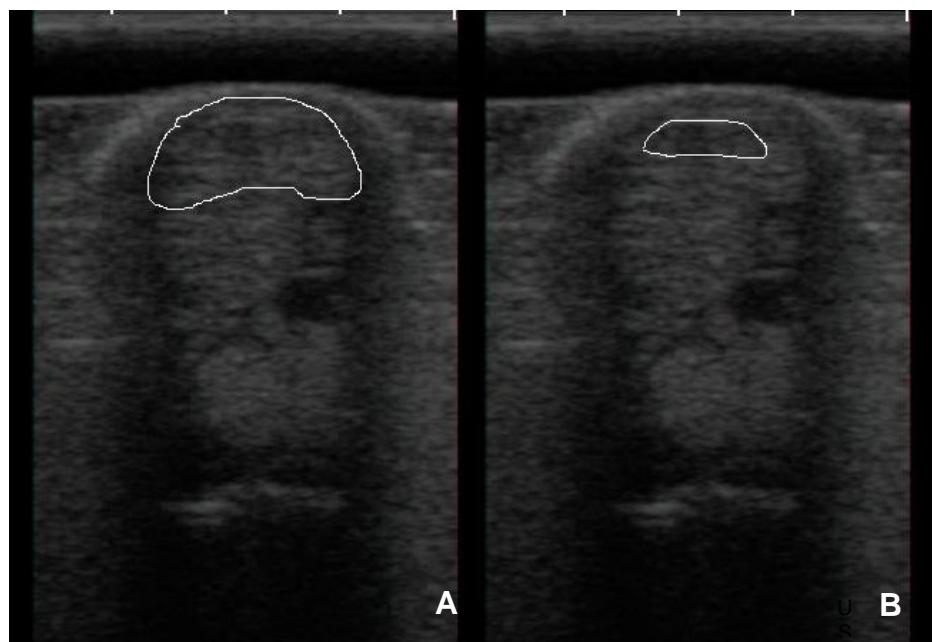


Figura 9. Imagem transversal do aparato flexor do membro torácico de animal do GC mostrando por meio da área delimitada pela linha branca a área a ser mensurada do (a) tendão do músculo flexor digital superficial e (b) da lesão, fazendo uso do programa ImageJ.

Tabela 6. Valores das médias e erros padrões das áreas dos tendões e das lesões nos diferentes momentos no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).

	D0	D2	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49
ATT- GC	127,07±6,21	118,13±12,89	145,98±9,68	134,12±6,82	135,63±6,77	132,74±6,79	119,98±3,48	136,93±7,38	120,39±4,76
AL- GC		24,85±3,53	27,82±2,53	24,07±2,10	24,67±2,74	18,57±2,34	20,35±2,57	20,25±3,62	20,08±2,89
ATT- GTA	125,06±9,03	127,01±8,51	125,35±5,97	127,33±6,66	123,91±4,34	127,21±6,46	115,80±3,91	190,38±70,3	116,26±3,64
AL- GTA		21,20±1,31	23,61±1,87	21,39±1,75	21,82±2,01	16,61±1,45	19,69±1,62	13,77±1,13	17,18±3,69
ATT- GTI	131,40±7,79	136,54±9,51	141,14±7,79	132,49±4,77	137,99±8,92	134,72±8,51	126,66±3,93	120,48±4,95	124,96±3,79
AL- GTI		21,85±1,92	20,79±1,93	21,56±1,72	18,86±1,54	15,93±1,48	14,42±1,83	15,30±3,74	16,78±3,36

Nos dias seguintes à indução da lesão, a ecogenicidade em 90% das lesões variaram nos escores I a III (Tabela 7). Ao longo do tempo, ocorreu melhora da ecogenicidade nos grupos tratados a partir do D28. No D42, 65,78% dos animais do GC tiveram ecogenicidade da lesão classificada com escore 0 ou I, enquanto o GTI teve 81,66% e o GTA 82,66% dos animais com esta classificação. No último dia de análise (D 49), o grupo controle tinha 11,84% das lesões com escore I, o GTI 17,10% e o GTA 20,28%, enquanto o grupo GC foi o único grupo a ainda apresentar lesões com escore III nesta fase do experimento (Tabela 7, Figura 11).

Tabela 7. Distribuição (%) da característica da ecogenicidade dos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).

Ecogeni- cidade %	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	23,43	53,12	21,87	1,56	5,26	43,85	26,31	21,05	6,55	52,45	22,95	18,1
GTI	41,26	38,09	19,04	1,58	3,50	59,64	26,31	8,77	8,19	67,21	16,39	8,19
GTA	47,45	35,59	15,25	1,69	10,34	53,45	20,68	13,79	3,28	68,85	22,95	4,91
	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	5,26	64,47	15,78	14,5	6,57	67,10	15,78	10,52	14,47	53,94	26,31	5,26
GTI	9,21	64,47	17,10	9,21	19,73	55,26	22,36	2,63	15,78	56,57	23,68	3,94
GTA	8	58,67	29,33	29,3	13,15	71,05	15,78	0	7,89	64,47	25	2,63
	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	8,45	70,42	16,90	4,22	17,10	48,68	28,94	5,26	11,84	75	10,52	2,63
GTI	19,73	60,52	18,42	1,31	18,42	63,15	17,10	1,31	17,10	69,73	13,15	0
GTA	11,84	73,68	14,47	0	17,33	65,33	14,66	2,67	23,19	63,77	13,04	0

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

A ultrassonografia transversal acusou perda de parcial a total de paralelismo de fibras na maior parte dos animais, após a indução da tendinite, em todos os grupos. Destes, 49% do GC, 58% do GTA e 42% do GTI foram classificados com escore de zero e I (Figura 10). Nos últimos dias da avaliação (D35, D42 e D49), o GTA foi o que apresentou melhor percentual de tendões com organização de fibras (Tabela 8). Em todos os grupos, ocorreu organização no paralelismo das fibras, que variou de discreto a total, porém apenas o GC apresentou até o último momento ausência de paralelismo em 4% das lesões.

Tabela 8. Distribuição em porcentagem da característica paralelismo do dos equinos avaliados durante o experimento, no grupo controle (GC), grupo tratado com PRP inativado (GTI) e grupo tratado com PRP ativado (GTA).

Paralelismo%	D0				D2				D7			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	20	5	45	30	27,27	22,72	31,81	18,18	31,25	31,25	31,25	6,25
GTI	15	20	20	45	15,78	42,10	42,10	0	5	50	45	0
GTA	14,28	14,28	23,80	47,61	13,63	27,272	45,454	13,636	0	35	55	10

Paralelismo%	D14				D21				D28			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	4	32	48	16	8	48	20	24	4	40	52	4
GTI	0	52	32	16	4	28	48	20	0	40	56	4
GTA	4	24	60	12	0	20	48	32	8	20	64	8

Paralelismo%	D35				D42				D49			
	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III	Zero	I	II	III
GC	8	28	48	16	4,16	37,5	41,66	16,66	4	36	44	16
GTI	0	24	72	4	0	44	56	0	0	44	44	12
GTA	0	32	64	4	4	24	48	24	0	39	39	21

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

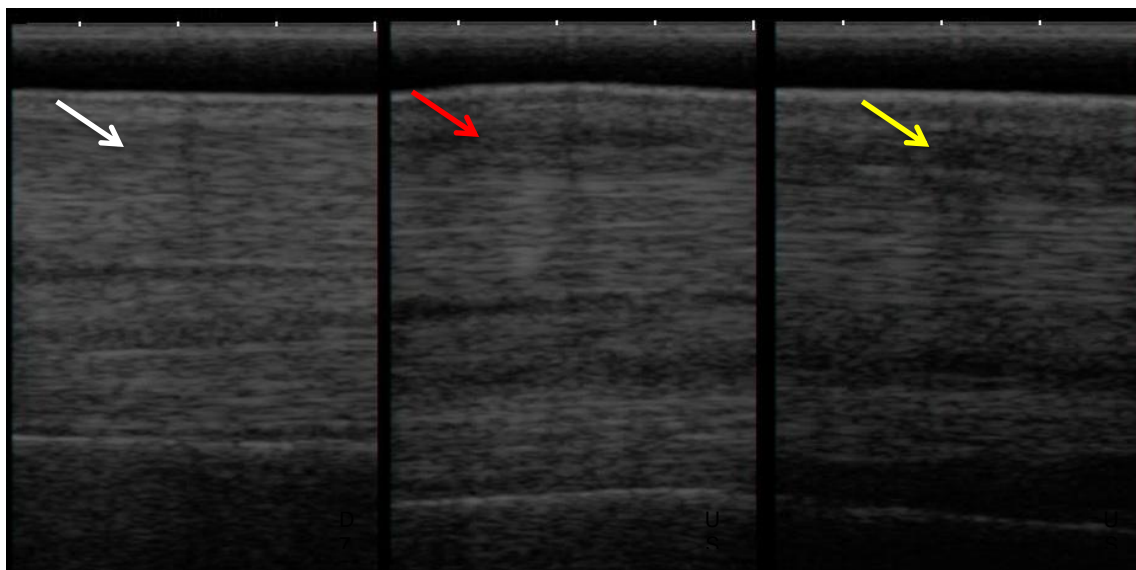


Figura 10. Imagem longitudinal do aparato flexor do equino do membro torácico do GTA mostrando tendão do musculo flexor digital superficial com as fibras paralelas (seta branca), no D0, com perda parcial de paralelismo (seta vermelha), no D2, e perda total de paralelismo (seta amarela), no D7.

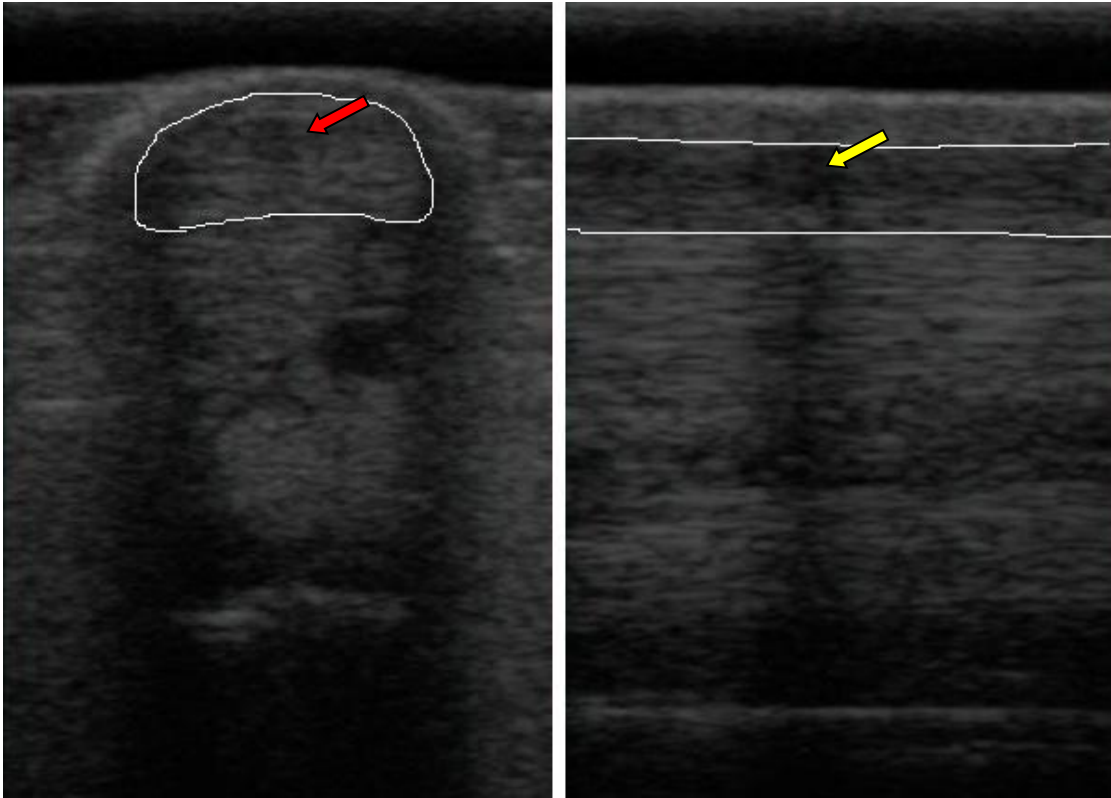


Figura 11. Imagem transversal do aparato flexor do membro torácico do animal do GC, no D49, mostrando por meio da área delimitada pela linha branca a área do tendão do musculo flexor digital superficial (a) e seta vermelha apontando a perda de ecogenicidade no local da lesão. Imagem longitudinal do aparato flexor do equino mostrando tendão do musculo flexor digital superficial por meio da área delimitada pela linha branca (b) com as fibras com perda de paralelismo de fibras (seta amarela).

5 DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Os valores médios das variáveis hematológicas (número total de eritrócitos, volume globular, contagem de leucócitos e contagem de plaquetas) avaliadas durante a fase experimental apresentaram-se dentro da faixa de normalidade segundo parâmetros de Hinchcliff et al., 2004 (Anexo 2). O parâmetro de Proteínas Totais (PPT) apresentou variação ($P < 0,05$) entre o período D0 e D14. Isto pode ter sido atribuído à melhora da alimentação dos animais que passaram a ingerir maior quantidade de proteínas devido ao aumento de oferta de concentrado na dieta e ao curto período de adaptação antes de iniciado a fase experimental.

5.2 INDUÇÃO DA TENDINITE

Para o estudo de tendinite induzida no TFDS por meio da utilização de colagenase, a dose de 2,5 mg de colagenase tipo I como descrito por Yamada et al. (2009) foi empregado com sucesso. O protocolo utilizado levou ao estabelecimento de características condizentes com casos clínicos de tendinite, tais como aumento de sensibilidade, volume e temperatura local e perda de ecogenicidade e paralelismo de fibras no exame ultrassonográfico. A face palmar/plantar do TFDS, no ponto de aplicação de colagenase apresentou edema em todos os membros, embora este aumento não tenha sido estatisticamente significativo. Segundo Goodship et al. (1994) este aumento de volume na fase inicial deve-se à presença de líquido inflamatório e na fase final, ao tecido cicatricial neoformado.

As enzimas bacterianas da colagenase agridem as moléculas de colágeno em múltiplos locais ao longo da cadeia, causando rápida solubilização do colágeno, destruição de células e matriz não-colágena, com conseqüente ruptura das fibras (SPURLOCK et al., 1989; FOLAND et al., 1992). No exame ultrassonográfico, este processo determinou o estabelecimento de áreas anecóicas e perda de paralelismo de fibras, que se assemelharam às lesões provocadas por excesso de exercício (ALVES et

al., 2002). A dosagem utilizada no experimento foi suficiente para promover a digestão das fibras de colágeno tendíneo e perivascular, sugerindo assim, que houve a intensa liberação de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, o estabelecimento do quadro clínico característico de tendinite.

5.3 PLASMA RICO EM PLAQUETA

A técnica utilizada (método dos tubos) como descrito por Ramírez (2006) foi de fácil execução e pouco dispendiosa. Porém, o processamento e manipulação das amostras tiveram que ser realizados de forma cuidadosa para evitar contaminações e erros de preparação, que corrobora com achados de estudo de Mclellan e Plevin, 2011. Para isto, foram adotados critérios estritamente assépticos, como descrito por Ramírez (2006). Também foram utilizados sistematicamente os mesmos parâmetros de centrifugação, para que fosse diminuído o grau de variação na concentração de plaquetas obtidas (McLELLAN e PLEVIN, 2011).

A ativação do PRP com cloreto de cálcio foi realizada com sucesso, corroborando com achados de Carmona et al. (2007) e Maia et al. (2009). Porém, a necessidade de utilização de um segundo aparelho específico (estufa) e o tempo necessário para que ocorresse todo o processo de ativação fez com que a preparação do PRP ativado fosse mais trabalhosa, menos prática e mais onerosa do que a do PRP inativado. A utilização do PRP inativado resultou na ausência de uma fase no protocolo de produção de PRP. Assim, diminuiu-se o tempo de preparo e, por conseguinte, o tempo entre a coleta e a utilização do material. De acordo com Gregorio (2012) quanto maior o tempo para utilização, maior a degradação dos componentes presentes no PRP (GREGORIO, 2012). Sendo assim, em termos de aproveitamento de técnica, o PRP inativado se mostrou mais viável para a utilização prática.

O protocolo adotado com dupla centrifugação se mostrou eficiente em concentrar as plaquetas, com média de concentração de plaquetas no PRP de $2,92 \pm 0,17$ vezes, em relação ao sangue total. Esta média foi superior a estudos que utilizaram o método dos tubos (RAMIREZ, 2006; MAIA, 2008; VENDRUSCOLO et al., 2012; GREGORIO, 2012). A média de plaquetas obtidas no PRP (546.500 plaquetas. $\mu\text{L} \pm 35,08$) também foi superior

a citações em equinos (CARMONA et al., 2007; SCHNABEL et al., 2007; ARGUELES et al., 2008; MAIA, 2008; VENDRUSCOLO, et al., 2012). De outra forma, verifica-se que todos os PRP produzidos neste experimento tiveram o valor mínimo superior o 300.000 plaquetas. μL^{-1} , como o preconizado por Anitua et al. (2004). Assim, podemos concluir que a técnica utilizada para concentração de plaquetas foi eficaz em concentrar o número de plaquetas necessárias para que o PRP tivesse ação positiva na reparação tecidual.

Neste estudo, a diferença encontrada sobre a concentração de plaquetas em relação a outros estudos pode ser atribuída à quantidade de plaquetas presente no sangue total, ao material de coleta (tubos ou bolsas de sangue), número de centrifugações realizadas e velocidade de centrifugação, bem como em outras variáveis envolvidas na obtenção do PRP (MAIA, 2008). Nenhum dos animais do experimento apresentou trombocitopenia, o que na opinião de Barbosa et al. (2006) seria um fator limitante para a obtenção de concentrações adequadas de plaquetas no PRP. Marx (2004), em um estudo *in vitro*, afirmou a existência de relação proporcional entre a concentração plaquetária e os níveis de FC. Seguindo este raciocínio, como no presente estudo o número de plaquetas concentradas foi elevado, entende-se que houve a disponibilização de um nível satisfatório de FC no local da lesão.

5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Para a avaliação clínica, foram utilizados os parâmetros de sensibilidade local, calor, pulso e edema. Outros estudos que avaliaram a resposta de tendinite a tratamentos também utilizaram esta forma de julgamento para mensurar a resposta inflamatória local (MAIA, 2008; MARANHÃO, 2008; MEIRELLES, 2010).

Foi realizada a administração de uma única dose de PRP 14 dias após a indução da lesão, quando a resposta inflamatória se apresentava mais moderada (FORTIER, 2008). Segundo Argueles et al. (2008), apenas uma aplicação de PRP é suficiente para o processo de reparação tendínea. Outros autores também tiveram resultados positivos no processo de reparação tendínea com apenas uma aplicação de PRP (ARGUELES et al., 2008; MAIA et al., 2009; MEIRELLES et al., 2010; RAJÃO et al., 2010). Em adição, todas as aplicações foram guiadas por ultrassonografia para que as mesmas fossem feitas

intralesionalmente, visto que o PRP tem seu efeito apenas no sítio de sua aplicação (ARGUELES et al., 2008; MAIA et al., 2009; OLEZA, 2009).

A fisioterapia, que consistiu em caminhada ao passo com os animais puxados no cabresto, se iniciou no D14 foi realizada em todos os animais sem que nenhum tivesse relutância em caminhar. Smith e Goodship (2004) afirmaram que a carga mecânica controlada é um elemento essencial à reparação tendinosa, porque melhora o processo de remodelação ao estimular a atividade dos tenócitos. Em adição, Schils (2010), em pesquisas com reabilitação humana, mostrou que o movimento pode ser utilizado com sucesso para produzir cicatrização de melhor qualidade para os músculos, tendões e ligamentos por aumentar o fluxo sanguíneo e linfático, produzir tensão para estimular a reparação do tecido para uma cicatrização mais rápida e produzir tensão para melhorar o alinhamento dos tecidos durante a cicatrização, além de limitar a extensão da fibrose no tecido conjuntivo.

Após a aplicação do PRP, o GTA foi o primeiro a responder positivamente em relação à diminuição de sensibilidade local e pulso digital. Oleza (2009) afirma que quando o PRP sofre ativação por agentes externos, as plaquetas sofrem degranulação *in vitro* e os FC são liberados antes de entrarem em contato com a lesão, proporcionando máxima concentração inicial de FC. Porém, a ativação do PRP também ocorre pela sua exposição ao colágeno que, por sua vez, se encontra no tecido tendinoso (WROBLEWSKI et al., 2010). Desta forma, Foster et al. (2009) e Mishra et al. (2009) afirmaram que a ativação *in vivo* das plaquetas através do colágeno tipo I tem a vantagem de induzir a formação lenta do coágulo, assegurando libertação também lenta dos FC na área de interesse, podendo ser considerado um ativador superior aos restantes, do ponto de vista terapêutico. Neste trabalho, constatou-se que a ativação leva a uma resposta mais precoce por ter já em um primeiro momento a ação ativa de todos os FC que foram liberados. No entanto, em um segundo momento, o GTI continua com uma melhora progressiva dos parâmetros clínicos, o que não ocorreu nos outros grupos.

A diminuição da sensibilidade observada nos animais tratados revela um possível efeito analgésico do PRP. Este efeito pode ser atribuído à inibição ou neutralização das citocinas pró-inflamatórias e substâncias que hipersensibilizam os nociceptores, através, principalmente, do TGF- β . Além disso, seu estímulo sobre a síntese de ácido hialurônico e, em geral, pelo reequilíbrio homeostático podem auxiliar na analgesia (OLEZA, 2009).

Estes achados corroboram com Maia, (2008) e Carmona et al. (2009) que tiveram redução da sensibilidade dolorosa nos animais tratados com o PRP.

O aumento de calor observado nos grupos tratados com PRP, após o tratamento, em relação ao GC, deve-se ao fato da degranulação plaquetária ter promovido o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas (HARRISON e CRAMER, 1993) e os FC liberados acelerarem a cicatrização tecidual por meio de estimular a proliferação celular, aumentar a síntese de matriz extracelular e estimular a neovascularização (OLEZA, 2009). Todos estes processos ligados à inflamação e à cicatrização aumentam o metabolismo local, aumentando assim a circulação sanguínea e a temperatura. Portanto, entende-se que, os animais dos grupos tratados com PRP, apresentaram organização da inflamação, fato que gerou diminuição da temperatura local, sendo mais discreta no GTI, pois a liberação de FC no PRP inativado ocorre mais lentamente e por um período maior, conforme descrito por Foster et al. (2009) e Mishra et al. (2009), ou seja, justificado pela formação de novos vasos.

O GTI foi o grupo que permaneceu por maior tempo com aumento de calor, confirmando mais uma vez o seu efeito terapêutico prolongado. Bosch et al. (2011) testaram o efeito de uma única aplicação de PRP em lesões criadas cirurgicamente em equinos. Avaliaram ainda a neovascularização, por ultrassonografia com “Color Doppler” e realizaram exame imunoistoquímico para o fator VIII (fator de Von Willebrand), que mostra-se presente apenas em células endoteliais intactas e funcionais. Os resultados permitiram verificar que os membros tratados com PRP apresentaram maior neovascularização. Para estes autores, a melhora na vascularização é entendida como uma razão para o prolongado efeito terapêutico de uma única aplicação de PRP, já que os fatores de crescimento agem por um curto período. Sendo assim, quanto maior o aumento de temperatura na fase crônica reparativa, maior o aumento do metabolismo local e melhor é a regeneração tecidual.

Visualmente, todos os equinos apresentaram aumento palmar/plantar no local de indução da lesão, que diminuiu durante o experimento. Isto ocorreu porque a fase aguda da tendinite é caracterizada por um edema difuso sobre a região afetada com aparecimento do coágulo entre as fibras colágenas (REEF, 1998; SPEIRS, 1997). Porém, não ocorreu diferença estatística pela mensuração da circunferência metacarpiana à altura do local da indução, nem entre os diferentes momentos de aferição de cada grupo e

nem entre os grupos avaliados. Estes achados divergem de um experimento realizado por Maia (2008) em cinco equinos onde induziu-se tendinite do TFDS com colagenase e tratou-se com infiltração intralesional de uma única dose de PRP. O autor observou em inspeção visual que o edema foi reduzido ao longo do tempo após o tratamento e se mostrou menos intenso no grupo tratado, em relação ao controle.

Em outro estudo, em que foram avaliados 15 equinos com tendinite induzida experimentalmente por colagenase tratados com ultrassom terapêutico e arnica montana a 20%, os equinos tratados tiveram maior redução na intensidade do edema, mensurado pelo perímetro do metacarpiano (MARANHÃO, 2008). 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). Para Stashak (1991), esta condição ocorre especialmente após 45 dias de estabelecimento da lesão inicial. Deste modo, a avaliação ultrassonográfica realizada ajudou a determinar os fatores que exercem influência sobre a circunferência na região avaliada, que foram edema e coágulo entre as fibras colágenas. No estudo realizado por nosso grupo, apenas a região da indução da tendinite mostrou-se aumentada após a indução da tendinite. Assim, pode-se concluir que o edema ocorreu somente no local da lesão, que pode ser justificado com a afirmação de Oleza (2009), que diz que os FC mitogênicos contidos nas plaquetas estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese, podendo assim, afetar a circunferência metacarpiana.

5.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Durante todo o experimento, foi possível realizar avaliação ultrassonográfica com os equinos simetricamente em estação, com peso igualmente distribuído entre os membros torácicos e pélvicos, mesmo após a indução da lesão, como recomendado por Reef (1998) e Speirs (1997). O transdutor de frequência de 7,5 MHz utilizado com o auxílio de espaçador (*standoff pad*) permitiu boa visualização do TFDS e das estruturas adjacentes, permitindo a obtenção de imagem com boa resolução, que de acordo com Speirs (1997) é essencial para a avaliação de tendões e ligamentos.

As alterações ultrassonográficas (edema peritendíneo e perda da ecogenicidade e do paralelismo linear das fibras colágenas) observadas até D14 foram atribuídas à ação catabólica da colagenase sobre o tecido tendíneo (MAIA, 2008). Esses achados corroboram com os de outros autores (ALVES et al., 2002; FERNANDES et al., 2003; MARANHÃO, 2008; MAIA, 2008; YAMADA et al., 2009), que também observaram modificações ultrassonográficas do TFDS após administração intratendínea da enzima.

Após a indução da lesão (D7), ocorreu aumento da área transversal do tendão (ATT) tanto no GC quanto nos grupos tratados, que pôde ser mensurado a partir do dia 7. Fernandes (2001), estudando 18 equinos com tendinite induzida por colagenase, atribuiu o aumento da área transversal do tendão, observado em 88,88% dos animais, à pressão intratendínea exercida pelo edema, que promoveu a separação dos feixes de fibras colágenas. No nosso estudo, o aumento da ATT diminuiu gradativamente em todos os grupos, que pode ser explicada pela organização do tecido cicatricial e a diminuição do edema.

A perda da ecogenicidade (padrão hipoeecóico e anecóico) em lesões agudas do TFDS corresponde à presença de hemorragia, fibrinólise ou tecido de granulação inicial (MARR et al., 1993). Segundo Gillis (2007), as lesões tendinosas agudas são caracterizadas pela desintegração dos feixes, originando uma ecogenicidade menos intensa (hipoeecogenica) e mais irregular, cuja variação depende da consistência morfológica da lesão quando do exame. No presente estudo, após a perda inicial de ecogenicidade foi possível observar aumento da ecogenicidade no local da lesão a partir de D28. Esta evolução positiva foi melhor observada nos grupos tratados em relação ao grupo controle. Estes achados corroboram os de outros autores que observaram melhora dos parâmetros ultrassonográficos em animais tratados com PRP (RAMÍREZ, 2006; MAIA, 2008; OLEZA, 2009; RAJÃO et al., 2010; RIDERMANN et al., 2010)

Segundo Foland et al. (1992) e Fernandes et al. (2003), é possível determinar a área da lesão entre 48 e 72 horas após a indução da tendinite com colagenase. Entretanto, outros estudos com colagenase somente mensuraram a área da lesão a partir do sétimo dia de indução (ALVES et al., 2002; MARXEN et al., 2004; MAIA, 2008). No presente estudo, a área transversal da lesão (ATL) pode ser mensurada a partir do segundo dia da indução da tendinite, porém ocorreu aumento da área de lesão no D7,

quando esta foi melhor observada. Portanto, o tempo necessário para destruição do colágeno pela colagenase e a delimitação das alterações provocadas no TFDS com tendinite provocada pela colagenase é variável (MAIA, 2008). Os dados obtidos em nosso estudo concordam tanto com os achados de Foland et al. (1992) e Fernandes et al. (2003), pois observamos a lesão causada à partir de 48 horas, quanto de Alves et al. (2002), Marxen et al. (2004) e Maia (2008), no sentido em que observamos uma lesão mais bem estabelecida no D7.

Houve diminuição da ATL durante o acompanhamento das lesões tanto no GC, quanto nos grupos tratados, embora não tenha sido observada diferença entre os grupos. Segundo Reef (1998), a diminuição dessa variável ultrassonográfica é indicativa de cicatrização e remodelação das fibras de colágeno. Estes achados corroboram com um estudo com equinos (N=6) tratados com hialuronato de sódio após 48 horas da indução da tendinite e a intervalos semanais até o 42º dia de iniciado o experimento, onde também não apresentaram diferenças ($p>0,05$) ultrassonográficas (ATT, ALT e arquitetura da lesão) entre os grupos tratados e o controle (GAUGHAN et al., 1994). Porém Maia (2008), em um estudo com equinos (N=6) tratados com uma aplicação de PRP ativado doze dias após a indução da tendinite com colagenase, notou que ocorreu redução ($p<0,05$) da ATL em membros tratados com PRP, em relação ao controle (solução salina). Tal resultado foi confirmado por outros autores (ARGUILES et al., 2008; RIDERMANN et al., 2010). Os exercícios controlados podem ter influenciado positivamente na organização da lesão tanto nos grupos tratados quanto no controle. Segundo Smith (2011), exercícios ajudam na conversão do colágeno além de alinhar as fibras de colágeno na direção da força e evitam a formação das aderências, embora em nosso estudo não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa da ATL entre os grupos.

No presente estudo, apenas foi possível observar melhora no paralelismo de fibras colágenas nos últimos dias de avaliação (D35, D42 e D49), onde o GTA teve considerável melhora na organização de fibras em relação aos outros grupos. O GTI também apresentou melhora no paralelismo da lesão com o tempo. Contrariamente, o GC, apresentou melhora mais tardia no paralelismo de fibras, apresentando até o último momento de avaliação, animais com ausência deste parâmetro. Estes achados corroboram com os de Bosch et al. (2009), que relataram que nos grupos tratados com

PRP obtiveram 80% de correto alinhamento das fibras contra 60% do grupo controle. Maia et al. (2009) em análise histológica para verificar os efeitos do PRP no tratamento de tendinite do TFDS, induzida por colagenase observaram que comparado com o grupo controle, a zona lesionada dos tendões tratados com PRP demonstrou maior organização da MEC em relação à disposição das fibras de colágeno e dos fibroblastos, e uma redução no número e tamanho do núcleo destas células durante a fase de remodelação, sugerindo uma maior maturidade do tecido cicatricial. Estes autores também verificaram uma diminuição na formação de aderências na superfície dos tendões no grupo tratado com PRP comparativamente aos tendões do grupo controle, reforçando a ideia de que o tratamento com PRP promove reparação tendinosa mais organizada e uniforme.

A melhora inicial mais rápida na organização de fibras que foi observada no GTA em relação ao GTI se deve ao fato da administração de PRP ativado (cloreto de cálcio), ter máxima concentração FC logo no início, levando ao aumento de metabolismo mais rápida que nas lesões tratadas com PRP inativado (McCARREL e FORTIER, 2009; FORTIER, 2008). Por outro lado, foi possível observar que a maioria das lesões nos grupos melhoraram, porém apenas algumas apresentavam paralelismo perfeito das fibras colágenas. Segundo Dahlgren (2007), a remodelação tendínea se inicia seis semanas após a lesão e estende-se por seis a 12 semanas ou mais. Neste sentido, a adoção de um tempo maior de avaliação permitiria a avaliação de um maior número de animais com, provavelmente, alinhamento de fibras perfeito e uma maior diferenciação entre os grupos, caso estes fossem avaliados por um período mais longo do que os 49 dias adotados. No entanto, assim como para a área da lesão, podemos especular que a diferença observada entre os grupos tratados com PRP e o controle, no que tange o paralelismo de fibras, pode ser biologicamente importante e essencial para a recuperação do tendão.

6 CONCLUSÕES

1. A administração de PRP, em dose única, aos 14 dias após a lesão tendínea, sendo ativado ou inativado promoveu melhora da sensibilidade local, conferindo maior conforto para o animal durante o período de recuperação da tendinite.
2. O PRP ativado e inativado levou a crer que houve a tendência da área avaliada em modificar-se de anecóico para isoecóico, caracterizando assim, melhora da ecogenicidade da lesão, mensurada por ultrassonografia entre os grupos avaliados.
3. A administração de PRP promoveu melhor reorganização das fibras de colágeno, mensurada por ultrassonografia, nos grupos controles em comparação ao grupo tratado, em menor tempo, com a utilização do PRP ativado.
4. O protocolo de preparo do PRP inativado foi mais rápido, portanto estando sujeito a menos erros de técnica e sendo menos dispendioso, tornando esta técnica mais viável de ser realizada a campo.

7 REFERÊNCIAS

- ABELLANET, I.; PRADES, M. Repeated Intralesional Platelet Rich Plasma (PRP) Injection Evaluated in 72 Sport Horses with Superficial Flexor Tendon Injuries Improves Clinical Scores and Return to Performance. **Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association**, Guarujá, p. 24-27, Sep. 2009.
- ÁLVAREZ, M. E.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J.U. Contaminación bacteriana en concentrados de plaquetas de caballos. **Arch Med Vet**, v. 42, p. 49-56, 2010.
- ALVES, A.L.G. et al. Tendon splitting surgical treatment on experimental equine acute tendonitis. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba. v.7, n. 2, p. 45-51, 2002.
- ALVES, A. L. G. et al. Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea equina. Avaliação clínica e ultra-sonográfica. **Revista de Educação Continuada. CRMV-SP**, v. 4, n. 1, p. 19-27, 2001.
- ANAND, S. et al. Membrane-associated CD40L and sCD40L in antherothrombotic disease. **Thromb Haemost**, v. 90, n. 3, p. 377-384, 2003.
- ANITUA, E. et al. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 1, p 4-15, 2004.
- APPEL, T. R. et al. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. **Clin Oral Implant Res**, v. 13, p. 357-362, 2002.
- ARGUELLES, C. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Vet. Resc.** v. 162, n. 7, p. 208-211, 2008.
- BAMES, G. L. et al. Growth factor regulation of fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, Durhan, v. 14, n. 11, p. 1805-1815, 1999.
- 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, supl. 1, p. 1-145, 2006.
- BARREIRA, A.P.B. **Implante autólogo de células mesenquimias no tratamento de tendinites induzidas em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica e imunoistoquímica. Dissertação de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária).** Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
- BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet activation. **Blood Reviews**, v. 9, n. 3, p. 143-156, 1995.

BOSCH, G. et al. Computerized Analysis of Standardized Ultrasonography Images to Monitor the Repair of Surgically Created Core Lesions in Equine Superficial Digital Flexor Tendons Following Treatment with Intratendinous Platelet Rich Plasma or Placebo. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 92-98, 2009.

BOSCH, G. 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, p. 554-561, 2011.

BRECHER, G. e CRONKITE, E.P. Morphology and enumeration of human blood platelets. **J. Appl. Physiol.**, v. 3, p. 365-377, 1950.

CANALIS, et al. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 140, n. 3, p. 530-537, 1989.

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, p. 167-170, 2007.

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

CREVIER-DENOIX, N. 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**, New York, v. 38, n. 11, p. 2212-2220, 2005.

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

DENOIX, J. M.; CREVIER, N.; AZEVEDO, C. Ultrasound examination of pastern in horses. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRATITIONERS. **American Association Equine Praciotioners**, San Francisco, Californian, v. 37, p. 363-380, 1991.

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, p. 1502-1508, 2004.

EVERTS, P. A. M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **J. Extra Corpor. Techn**, v. 38, p. 174-187, 2006.

FELDMAN, B. F. **Schalm's veterinary hematology**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

FERNANDES, M. A. L. **Avaliação dos efeitos do ultrassom terapêutico sobre lesões experimentais do Tendão do Músculo Flexor digital Superficial em equinos: estudo clínico, ultrassonográfico e histopatológico.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

FERNANDES, M. A. L.; ALVES, G. E. S.; SOUZA, J. C. A. Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de equinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico de dois protocolos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 1-11, 2003.

FERRARO, et al. Estudo morfológico de tendões flexores de equinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, n. 2, p. 117-125, 2003.

FOLAND, J. W. et al. Effect sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendonitis in horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, n. 12, p. 2371-2376, 1992.

FORTIER, L. A. Platelet rich plasma - use in tendons, suspensory ligaments and joints. Materials and methods. In: **AGP-meeting Applying Regenerative Therapies for Tendon and Joint Caused Lameness of Horses**. Bonn (Germany). 6-7 oct. 2008.

_____. Medical therapies for tendonitis. **Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association**: Guarujá, Brazil, 24-27 Sep. 2009.

FOSTER T. E. et al. Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. **Am. J. Sport Med.** V. 37, n.11, p. 2259-2272, 2009.

FRIESEL, R. E.; MACIAG, T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 9, n. 10, p. 919-925, 1995.

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

GENOVESE, R. L. Prognosis of superficial flexor tendon and suspensory ligament injuries. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. **American Association of Equine Practitioners**, San Antonio, Texas, v. 39, p. 17-19, 1993.

GENOVESE, R. L.; RANTANEN, N. W. The superficial digital flexor tendon, In: RANTANEN N. W.; MCKINNON A. O. **Equine Diagnostic Ultrasonography**. Williams and Wilkins, Balti-more, p. 289-398. 1998.

GENTRY, P. A. Platelet biology. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schulman's Veterinary Hematology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p.459-466.

GILLIS, C. Soft tissue injuries: tendinitis and desmitis. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine sports medicine and surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. cap. 20, p. 412-432.

GILLIS, C. Ultrasonography for monitoring healing and rehabilitation. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, p. 174-178, 2007.

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

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: background and process. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 22, n. 6, p. 547-557, 2002.

GREGÓRIO, C. S. S. Terapia regenerativa com plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões tendinosas e ligamentosas em equinos. Tese de mestrado (Medicina veterinária). Universidade técnica de Lisboa. Lisboa. 2012

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

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

HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine sports medicine and surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. cap. 20, p. 412-432.

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

HOM, D. B.; MAISEL, R. H. Angiogenic growth factors: Their effects and potential in soft tissue wound healing. **Annals of Otolaryngology Rhinology Laryngology**, Iowa, v. 101, n. 4, p. 349- 354, 1992.

JORGENSEN, J. S.; GENOVESE, R. L.; ROSS, M. W. Superficial digital flexor tendonitis: Superficial digital flexor tendonitis in racehorses. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J., **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 2.ed. Missouri: Elsevier Saunders, p. 706-715, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

KAJIKAWA, Y. et al. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 215, p. 837-845, 2008.

- KANE, J. C. P.; FIRTH, E. C. The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. **The Veterinary Journal**, v. 181, p. 79-89, 2009.
- KEYV, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **The Journal of Extra Corporeal Technology**, v. 36, n. 1, p. 28-35, 2004.
- KUBOTA, S. et al. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. **Journal of Biochemistry**, Bethesda, v. 136, n. 3, p. 279-282, 2004.
- LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. Biomechanics of tendon injury and repair. **Journal of Biomechanics**, v. 37, p. 865-87, 2004.
- MAIA, L. et al. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy In: Horses: Histologic evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 8, p. 618-626, 2009.
- MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica e histopatológica**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- MAIA, L.; SOUZA, M. V. Components rich in platelets used in wound healing tendon, ligaments and osteo-articular diseases of animals. **Ciência rural**, v. 39, n. 4, p. 1279-1286, 2009.
- 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, p. 4-18, 1997.
- MARANHÃO, R. P. A. **Aspectos epidemiológicos de alterações do aparelho locomotor e o uso da arnica montana no tratamento da tendinite experimental em equinos**. Dissertação de Doutorado. (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- MARR, C. M. et al. Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 1, p. 23-29, 1993.
- MARSOLAIS, D.; FRENETTE, J. Inflammation and tendon healing. **Médecine Sciences**, v. 21, n. 2, p. 180-186, 2005.
- MARTIN, P. et al. Growth factors and cutaneous wound repair. **Progress in Growth Factor Research**, New York, v. 4, n. 1, p. 25-44, 1992.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MARXEN, S. 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, p. 701-708, 2004.

MATRAS, H. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, p. 617, 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**. 2009.

McILWRAITH, C. W. Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures. In: STASHAK, T.S. **Adams' lameness in horses**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, cap.7 p. 459-644.

McLELLAN, J.; PLEVIN, S. Evidence-based clinical question: Does it matter which platelet-rich plasma we use. **Equine Veterinary Education**, v. 23, n. 2, p. 101-104, 2011.

MEIRELLES, M. G. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento de tendinite em equinos. **XII ENPOS**, 2010.

MISHRA, A. et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. **Tissue Engineering**, v. 15, n. 3, p. 431-435, 2009.

NAGATA M. J. H. et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. **Eur. J. Dent**, v. 4, p. 395-402, 2010.

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**. Dissertação de PhD (Doutorado em Medicina Veterinária). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2009.

OLICHESKI, A. T., **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de Riquetsia do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de porto alegre, rs, Brasil**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Doenças Parasitárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2003.

PALMER, S. E. et al. Practical management of superficial digital flexor tendinites in the performance horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 10, n. 2, p. 425-281, 1994.

PELAGALLI, A. et al. Adhesive properties from different animal species. **J Comp Path**, v. 128, p. 127-131, 2003.

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, p. 620-626, 1994.

PIERCE G.F. et al. Role of platelets-derived growth factoring wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 45, n. 4, p. 319-326, 1991.

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

RAJÃO, M. D. et al. **Relato de três casos de tratamento de tendinite no tendão do Músculo Flexor Digital Superficial (TFDS) utilizando plasma rico em plaquetas (PRP)**. Pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Búzios, 2010.

RANTANEN, N. W.; MCKINNON, A. O. 'Diagnostic Ultrasound: Applications in the Equine Limb', **Equine Diagnostic ultrasonography**, 1ªEd, Williams & Wilkins, 1998. p. 103-117,

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**. 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**. 2.ed.. Missouri: Elsevier Saunders, 2011, p. 182-205.

RANTANEN, N. W.; MCKINNON, A. O. 'The Superficial Digital Flexor Tendon', **Equine Diagnostic Ultrasonography**, 1ª Ed, Williams & Wilkins, 1998. p. 289-398.

REBAR, A.H. et al. **Guia de hematologia para cães e gatos**. 1 ed., São Paulo: Roca, 2003. p. 133-156.

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

RHEE, J. S. et al. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. **Trombosis Haemostasis**, Aberdeen, v. 92, n. 2, p. 394-402, 2004.

RIDERMAN, G. et al. Autologous conditioned plasma therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. **J Vet Sci**, v. 11, p. 173-175, 2010.

ROSIER, R. N. et al. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. **Clinical Orthopaedics Related Research**, Philadelphia, supl. 355, p. 294-300, 1998.

ROSS, M. W. Conformation and lameness. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J., **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 2. ed.. Missouri: Elsevier Saunders, 2011, p. 15-31

SANCHEZ, A. R. et al. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Guildford, v. 18, n. 1, p. 93- 103, 2003.

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, cap.7, p.103-117, 1998.

SCHNABEL, L. V. et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitalis superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, p. 230-240, 2007.

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**, Baltimore, MD, USA, vol. 56, p. 374-378, 2010.

SCHWARTZ-ARAD, D.; LEVIN, L.; ABA, M. The use of platelet rich plasma (PRP) and platelet rich fibrin (PRP) extracts in dental implantology and oral surgery. **Refuat Hapeh Vehashinayim**, v. 24, n. 1, p. 51-55, 2007.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Basic biology of tendon injury and healing. **Surgeon**, v. 3, n. 5, p. 309-316, 2005.

SILVA, P. S. A. **Plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SMITH, R. K. W. Pathophysiology of tendon injury. In: ROSS, N. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 2.ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011. Cap. 69, p. 694-706.

SMITH, R. K. W.; GOODSHIP, A.E. Tendon and ligament physiology. In HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine sports medicine and surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 130-151, 2004.

SMITH, R. K. W.; WEBBON, P. M. Physiology and pathophysiology of tendon and ligament. In: COLAHAN, P. T. et al. **Equine medicine and surgery**. 5 ed. v.2. Missouri: Mosby, Inc, p.1358-1362, 1999.

SPEIRS, V.C. O sistema musculoesquelético. In: SPEIRS, V. C. **Exame clínico de equinos**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 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, p. 184-188, 1989.

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

STASHAK, T. S. **Equine wound management**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. P.278.
STEENFOS, H. H. Growth factors and wound healing. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, Göteborg, v. 28, n. 2, p. 95-105, 1994.

SUTTER W. W., Autologous Cell-based Therapy for Tendon and Ligament Injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, p.198-208, 2007.

TABLIN, F. Platelet structure and function. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL J.G.; JAIN, N.C., et al. **Schulman's veterinary hematology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p.453-458.

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

TEXTOR, J. A.; NORRIS, J. W.; TABLIN, F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 2, p. 271-278, 2011.

TRINDADE-SUEDAM, I. K. et al. Avoiding leukocyte combination and early platelet activation in platelet-rich plasma. **J. Oral Implan**, v. 33, p. 334-339, 2007.

VENDRUSCOLO, C. P. 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, p. 106-110, 2012.

WANG, J. H. C. Mechanobiology of tendon. **Journal of Biomechanics**, v. 39, p.1563–1582, 2006.

WANG, J. S. Basic fibroblastic growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Göteborg, suppl. 269, p.1-33, 1996.

WATKINS, J. P. et al. Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: Collagen-type transformation and tissue morphologic an tissue reorganization. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, n.10, p. 2091-2096, 1985.

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

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, p. 118-123, 2005.

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, p. 1294-1299, 1997.

WRIGLEY, R.H. Ultrassonografia de tendões, ligamentos e articulações. In: STASHAK, T.S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. 5 ed. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 4, p. 417-601.


WROBLEWSKI, A. P.; MEJIA, H. A.; WRIGHT, V. J. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 20, p. 98-105, 2010.

YAMADA A. L. M. et al. Comparação de diferentes doses de colagenase em modelo de indução de tendinite para equinos: estudo clínico e ultrassonográfico. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1124-1130, 2009.


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

ZUCKER-FRANKLIN, D. et al. **Atlas of blood cells: function and pathology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988, p.777.

ANEXO 1


**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 DA ATIVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITES EM EQUINOS.", UnBDOC n.º 54225/2011, 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

ANEXO 2

Quadro 3. Intervalo de valores fisiológicos das variáveis hematológicas de equinos para hemácias (Hem), volume globular (VG), leucócitos (Leuc), proteínas totais (PPT.) e plaquetas (Plt).

Hem. ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	VG (%)	Leuc ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PPT. (g/dL)	PLT. ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
6,2 – 10,8	34 - 47	5,0 – 10,2	5,5 - 7,4	100 - 300

Fonte: HINCHCLIFF, 2004.