

LEANDRO MAIA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE
TENDINITE EM EQÜINOS: AVALIAÇÃO CLÍNICA, ULTRA-
SONOGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

LEANDRO MAIA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE
TENDINITE EM EQÜINOS: AVALIAÇÃO CLÍNICA, ULTRA-
SONOGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

APROVADA: 14 de julho de 2008.

Prof. Geraldo Eleno Silveira Alves
(Co-orientador)

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Co-orientador)

Prof. José Dantas Ribeiro Filho

Prof. Cláudio César Fonseca

Prof^a. Maria Verônica de Souza
(Orientadora)

A Deus por guiar os meus passos e tornar possível mais este sonho.

Ao meu pai *in memoriam* e familiares.

A minha orientadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, me dando força, proteção e amparo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai (*in memoriam*) pela amizade, pelo aprendizado, pela educação, pelo amor e pela sabedoria que contribuíram de forma significativa para a minha formação pessoal e acadêmica. Pai, infelizmente você nos deixou de forma precoce, mas a cada instante sinto a sua presença e força que me ajudam a transpor todas as barreiras. Te amo para sempre, obrigado por tudo.

À minha mãe, pelo carinho, amor e apoio, sobretudo nesses últimos anos.

À minha querida vó, ou melhor, mãe Ninita, pelo exemplo de vida, carinho, amor e pelas orações todos os dias.

À minha vó Glorinha, pelo carinho, incentivo e pela diversão em todos os momentos. Essa “Marcega” é 10!

À Ge, pelo carinho, amor, pela educação e pelo incentivo constante.

Aos meus queridos irmãos Léo e André, pelo estímulo constante, pela amizade e pelo afeto. Também aos demais familiares, pelo incentivo e carinho.

À minha orientadora Verônica, pelo exemplo de profissionalismo, amizade, ensinamento e confiança ao longo desses cinco anos de trabalho. Essa nordestina, embora pareça ser “brava”, quem realmente a conhece sabe que ela tem “um coração de ouro” e que “sempre está ligada a 220 V”. Professora, muito obrigado pela grande contribuição na minha carreira acadêmica e que “venga” a Holanda. Adicionalmente, agradeço ao seu marido Raphael, pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos co-orientadores Geraldo Eleno Silveira Alves, Laércio dos Anjos Benjamim e José Ivo Ribeiro Júnior, pela significativa contribuição no desenvolvimento do trabalho e pelo conhecimento compartilhado.

Aos professores da Clínica de Grandes Animais Dantas e Pacifico, pelos conselhos, pela amizade, pelo ensinamento, profissionalismo e pela excelente contribuição para a minha formação acadêmica. Também ao professor Ernani, que mesmo com nossa pouca convivência sempre se mostrou prestativo e atencioso.

Aos demais professores do Departamento de Veterinária (DVT), especialmente Cláudio, Marlene, Andréa, Patarroyo, Eduardo, Jackson, Marquinhos e JD, pela amizade e por ministrarem um excelente curso.

Aos funcionários, ou melhor, amigos do Setor de Clínica de Grandes Vantuil (este trabalha), Cosme, Sidney, Vavá, Celinho (grande amigo) e Claudinho, que não pouparam esforços para a concretização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório clínico Lucinda, Aécio e Luiz Márcio, pela amizade e realização dos exames laboratoriais.

Aos demais funcionários do DVT, especialmente ao Zé (amigão), Luiz (preventiva) e à querida Rosi, que, independentemente da situação, não medem esforços para ajudar em tudo o que for necessário.

À Universidade Federal de Viçosa, pela sua excelente estrutura física que proporcionou um ótimo Curso de Graduação e de Pós-Graduação, e ao DVT, pela disponibilização da infra-estrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa.

Aos excelentes estagiários e bolsistas Yamê (grotinha), Bruna e João (grotão), que trabalharam e se esforçaram durante o período de férias, finais de semana e durante todo experimental para o desenvolvimento deste trabalho. Valeu galera!

Ao Dr. José do Carmo e Dr^a. Tânia, pela amizade, pelos ensinamentos e por disponibilizar o laboratório para a execução de todas as etapas da histopatologia. Adicionalmente, a todos os funcionários do seu laboratório, em particular a Cris e Simone, que sempre se mostraram dispostas a ajudar.

A todos os amigos de Pós-Graduação, especialmente a Lang e Lukiya pela ajuda na cirurgia, e Liana, na microscopia de polarização.

Aos queridos amigos “anormais” Natália (RF), Paulo (RF), Raoni (RF), Corina (RF), Kiki, Aline, Lili, Dayse, Grazi (RF), Matheus (guloso), Alexandra e Kelly. Também aos amigos-irmãos do Pós 2332 e da turma da Vet 2002. Enfim, a todos os meus amigos.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado, e à Fapemig, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À empresa Ouro Fino, pela concessão do antiinflamatório, e à Nutricell, pelo empréstimo do *standoff pad*.

Finalmente, aos cavalos, peças fundamentais neste estudo e na minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Estrutura e função do tendão.....	2
2.2. Etiopatogenia da tendinite.....	3
2.3. Tendinite do tendão do músculo flexor digital superficial.....	5
2.4. Monitoramento da tendinite.....	6
2.5. Tendinite induzida experimentalmente por colagenase.....	9
2.6. Tratamento clínico da tendinite.....	10
2.7. Plaquetas e fatores de crescimento.....	13
2.8. Plasma rico em plaquetas (PRP).....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Seleção dos animais.....	22
3.2. Manejo dos animais.....	23
3.3. Indução da tendinite.....	24
3.4. Protocolo laboratorial para obtenção do PRP.....	27
3.5. Tratamentos.....	28
3.6. Atividade física.....	29
3.7. Exames físico e ultra-sonográfico.....	30
3.7.1. Variáveis avaliadas na ultra-sonografia.....	31
3.7.1.1. Área transversal do tendão (ATT) e área transversal da lesão (ATL).....	31
3.7.1.2. Percentual da área lesada no interior de cada tendão e intensidade da lesão...	31
3.7.1.3. Ecogenicidade da lesão.....	32
3.7.1.4. Paralelismo das fibras colágenas.....	32
3.8. Exames laboratoriais.....	32
3.9. Biópsia e exame histopatológico do TFDS.....	33
3.10. Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Plasma rico em plaquetas (PRP).....	37
4.2. Avaliações clínica e laboratorial.....	37
4.3. Avaliação ultra-sonográfica.....	42
4.4. Avaliações macroscópica e histopatológica.....	46
5. DISCUSSÃO.....	54
5.1. Plasma rico em plaquetas (PRP).....	54
5.2. Avaliações clínica e laboratorial.....	55
5.3. Avaliação ultra-sonográfica.....	57
5.4. Avaliações macroscópica e histopatológica.....	60
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

RESUMO

MAIA, Leandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e histopatológica.** Orientadora: Maria Verônica de Souza, Co-Orientadores: Geraldo Eleno Silveira Alves, Laércio dos Anjos Benjamim e José Ivo Ribeiro Júnior.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena e econômica de diversos fatores de crescimento, com grande potencial terapêutico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito PRP no tratamento da tendinite induzida no tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS) de eqüinos mediante avaliação clínica, ultra-sonográfica e histopatológica. Para isso foram utilizados seis eqüinos hípidos machos castrados, com idade entre oito e 15 anos (\bar{x} = 12 anos). A tendinite do TFDS foi provocada em ambos os membros torácicos, mediante a administração intratendínea de 2,5 mg de colagenase ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), sendo esse procedimento considerado o início da fase experimental. Doze dias após a indução da tendinite, os animais foram submetidos a dois tratamentos: sendo que na lesão efetuada no TFDS direito (grupo tratado – GT), foi administrado 2,5 mL de PRP ativado com cloreto de cálcio a $0,0125 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo concentrações variando de 320.000 a 500.000 plaquetas. μL^{-1} ; na tendinite do TFDS esquerdo (grupo controle - GC), foi administrado 2,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Após três dias de iniciado o tratamento, os animais foram submetidos à atividade física controlada e progressiva durante 32 dias. Nos primeiros trinta dias após indução da tendinite, os eqüinos foram submetidos a exame físico diário e, posteriormente, foram monitorados clinicamente duas vezes por semana até o término do experimento. Exames ultra-sonográficos foram realizados antes e após indução da tendinite (48 horas após e no 7^o, 12^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o, 42^o dia do experimento), sendo avaliado a área transversal do tendão (ATT), área transversal da lesão (ATL), o percentual da ATL, a intensidade e ecogenicidade da lesão, assim como o paralelismo das fibras colágenas. No 48^o dia foi realizada biópsia do local da lesão para exame histopatológico. A avaliação clínica realizada após tratamento (12^o

dia ao 45° dia) revelou, em função do tempo, redução ($P < 0,05$) da intensidade do edema, da dor à palpação, do aumento de temperatura local, bem como o grau de claudicação. Entretanto, diferenças ($P < 0,05$) entre grupos somente foram observadas para o edema e para a dor à palpação, com menor intensidade no GT. Na avaliação ultra-sonográfica observou-se redução ($P < 0,05$) da ATL e da ecogenicidade da lesão em função do tempo, mas com diferença ($P < 0,05$) entre grupos apenas para ATL, onde os valores médios foram menores no GT. A análise histopatológica revelou, em ambos os grupos, atividade fibroblástica, neovascularização, infiltrado linfoplasmocitário, focos hemorrágicos e desorganização tecidual. No GT o TFDS apresentou-se mais ($P < 0,05$) organizado, com fibras colágenas e fibroblastos melhor dispostos na matriz tendínea. Adicionalmente, a análise qualitativa demonstrou menor ($P < 0,05$) atividade fibroblástica no GT, que não ($P > 0,05$) foi confirmada na morfometria (análise quantitativa). As principais conclusões do estudo foram que o PRP propicia menor intensidade de variáveis clínicas (edema e dor à palpação), o que proporciona maior conforto e bem estar para o animal, assim como promove maior redução da área da lesão e melhor organização tecidual.

ABSTRACT

MAIA, Leandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Clinical, ultrasonographic and histopathological evaluation of tendinitis in horses treated with platelets-rich plasma.** Adviser: Maria Verônica de Souza, Co-Advisers: Geraldo Eleno Silveira Alves, Laércio dos Anjos Benjamim and José Ivo Ribeiro Júnior.

Platelet-rich plasma (PRP) is an autologous and economic source of intense growth factors, with great therapeutic potential. This work aimed to carry out clinical, ultrasonographic and histopathological evaluations of the effect of PRP on the treatment of induced tendinitis of the superficial digital flexor tendon (SDFT) of horses. Thus, six healthy geldings aged between eight and fifteen years ($\bar{x} = 12$ years) were evaluated. SDFT tendinitis was induced in both forelimbs, by means of intratendinous administration of 2.5 mg of collagenase (2.5 mg.mL⁻¹), with such procedure being considered the start of the experimental phase. Twelve days after tendinitis induction, the animals were submitted to two treatments, with the lesion provoked in the right SDFT, (treated group – TG), receiving 2.5 mL of PRP activated with calcium chloride at 10%, at concentrations ranging from 320.000 to 500.000 platelets.μL⁻¹; and the lesion in the left TFDS (control group - CG), receiving 2.5 mL of saline solution (NaCl 0.9%). Three days after the treatment started, the animals were submitted to controlled and progressive physical activity during 32 days. In the first 30 days after tendinitis induction, the animals were submitted to daily physical examination and were later monitored clinically twice a week until the end of the experiment. Ultrasonographic examinations were carried out before and after tendinitis induction (48 hours after and on experiment days 7, 12, 14, 21, 28, 35 and 42), with tendon cross-sectional area (CSA), lesion cross-sectional area (L-CSA), L-CSA percentage, severity and echogenicity of the lesion and collagen fiber alignment being evaluated. On day 48, biopsy of the lesion site was conducted for the histopathological exam. Clinical evaluation after the treatments (from days 12 to 45) revealed, in function of the time, (P<0.05) reduced edema intensity, pain at palpation, local temperature increase, as well as degree of

lameness. However, differences ($P < 0.05$) between the groups were observed only for edema and pain at palpation, with less intensity in the TG. In the ultrasonographic examination, reduction ($P < 0.05$) in the L-CSA and in lesion echogenicity, in function of time, was observed, but with difference ($P < 0.05$) between groups only for the LCA, whose mean values were smaller in the TG. The histopathological evaluation revealed fibroblastic activity, neovascularization, lymphoplasmocitary infiltrate, hemorrhagic foci, and tissue disorganization in both groups. In the TG, the SDFT was more ($P < 0.05$) organized with collagen fibers, and fibroblasts better displayed in the tendinous matrix. In addition, the qualitative analysis showed smaller ($P < 0.05$) fibroblastic activity in the TG, which was not ($P > 0.05$) confirmed by morphometry (quantitative analysis). The main conclusions of the study were that the PRP provides lower intensity of clinical variables (edema and pain at palpation), providing greater comfort and well being to the animal, as well as, promotes greater reduction in the area of the lesion and better tissue organization.

1. INTRODUÇÃO

A importância dos equinos para o desenvolvimento do Brasil pode ser observada desde os tempos do Brasil-Colônia, quando o cavalo permeou todos os ciclos extrativistas, agrícolas e de mineração. O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo, e o agronegócio relacionado com a espécie resulta em um faturamento da ordem de R\$ 7,3 bilhões por ano, gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (GUERRA & MEDEIROS, 2006).

Com a intensificação da utilização de equinos para diferentes atividades, ocorreu um aumento nas afecções que afetam a espécie, particularmente do aparelho locomotor. A tendinite nos tendões dos músculos flexores desses animais é responsável pela alta morbidade, por prejuízos econômicos decorrentes dos gastos com tratamento, pela suspensão de treinamento e competições por longos períodos e, em alguns casos, pela incapacidade de retornar à atividade física. O principal desafio no tratamento dessa afecção está relacionado ao período necessário para reparação tecidual que, associado aos métodos terapêuticos tradicionais, pode levar meses ou anos para completa cicatrização da lesão, além do alto índice de recidivas. No entanto, novos tratamentos, como o plasma rico em plaquetas (PRP), vêm sendo recentemente utilizados com a finalidade de reduzir o período de cicatrização tendínea e a possibilidade de recidivas. Embora esta pareça ser uma terapia promissora, a realização de estudos controlados ainda é escassa, particularmente na espécie eqüina.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do PRP ativado no tratamento da tendinite no tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS) em equinos induzida por colagenase, mediante avaliações clínica, ultra-sonográfica e histopatológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estrutura e função do tendão

O tendão é um tecido conjuntivo denso modelado, composto por fibroblastos organizados e inseridos em matriz extracelular altamente organizada e rica em colágeno (DAHLGREN, 2007). A principal característica de uma molécula de colágeno é a estrutura longa e rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas, denominadas de cadeia alfa, mostram-se enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda torcida. Existem diferentes tipos de colágeno que podem se organizar em diferentes arranjos estruturais, porém aqueles que se organizam em fibrilas são: colágenos dos tipos I e V (tendões, ossos, pele, ligamentos, córnea e órgãos internos), II e XI (cartilagem, disco intervertebral, notocorda e humor vítreo) e III (pele, vasos sanguíneos e órgãos internos) (ALBERTS et al., 2006). Em particular, as fibrilas de colágeno do tipo III referem-se às fibras reticulares ou reticulina, consideradas estruturas delicadas e importantes na sustentação de componentes especializados da matriz extracelular (STEVENS & LOWE, 1995).

O tendão é constituído de unidades estruturais organizadas sucessivamente em moléculas de colágeno, microfibrilas, subfibrilas, fibrilas, fibras e fascículos (KASTELIC et al., 1978). O arranjo organizado do tendão, bem como as ligações entre as moléculas de colágeno, fibrilas e fibras, é que lhe confere a capacidade de suportar elevadas cargas e transmiti-las dos músculos aos ossos. É importante ressaltar que a maior quantidade de matriz aumenta a resistência do tendão, mas não necessariamente melhora a sua função e o torna mais elástico (SMITH, 1998). Segundo RILEY (2004), forças de tensão sobre o tendão que ocasionem aumento acima de 4% no seu comprimento (limite fisiológico) resultarão em lesão em um ou mais feixes de fibras. Ruptura completa pode ocorrer quando a tensão resulta em 8 a 12% de extensão.

Para que as fibrilas de colágeno realizem suas funções, essas devem estar alinhadas em feixes paralelos ao longo do eixo principal de tensão. As células do tecido conjuntivo controlam essa orientação em parte pelo depósito de colágeno de forma orientada, mas também pelo arranjo do mesmo subseqüentemente. Durante o desenvolvimento dos

tecidos, os fibroblastos trabalham o colágeno que secretam, arrastando-se sobre ele e puxando-o, de forma a orientar a compactação desse em camadas, delineando os feixes (ALBERTS et al., 2007).

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

A maior parte das células presentes na matriz tendínea é semelhante a fibroblastos, mas existe também uma pequena quantidade de células endoteliais, musculares lisas e nervosas, dependendo da intensidade da vascularização e inervação (JÓZSA & KANNUS, 1997). Os fibroblastos são considerados as células mais comuns do tecido conjuntivo, sendo capazes de modular sua capacidade metabólica, o que reflete na sua morfologia. As células com intensa atividade de síntese são denominadas fibroblastos, enquanto as metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Segundo a Nômina Histológica (1992), as células do tendão são denominadas de tendinócitos.

Em eqüinos, os tendões flexores digitais são considerados exemplos de resistência e elasticidade, apresentando resistência à compressão e tensão. Particularmente com relação à TFDS, sabe-se que essa estrutura proporciona ao animal uma locomoção eficiente, por apresentar propriedades biomecânicas de armazenar energia durante o apoio e dissipá-la no final da passada (SMITH, 1998).

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

2.2. Etiopatogenia da tendinite

As lesões de tendões são comuns em eqüinos, principalmente os atletas. Elas podem ser resultantes de uma única sobrecarga em que a magnitude da força exigida excede a

resistência máxima das fibras, ou do acúmulo de microlesões que levam à ruptura da estrutura tendínea (ALVES et al., 2001). Adicionalmente, alguns fatores como a idade, temperatura, fármacos e atividade local de mediadores bioquímicos podem afetar potencialmente a atividade dos tendinócitos (RILEY, 2005) e, conseqüentemente, a matriz tendínea. Segundo GAUGHAN (1994), a conformação dos membros e as técnicas de casqueamento/ferrageamento que predisõem a hiperextensão da região distal dos membros têm sido implicadas como fatores determinantes no desencadeamento das tendinites nos eqüinos.

De acordo com SMITH (1998) o processo de cicatrização do tendão ocorre em três fases. A primeira é a inflamatória, que dura de uma a duas semanas após a lesão, e caracteriza-se pela liberação de mediadores inflamatórios, incluindo as proteases que destroem o colágeno danificado e o intacto. Nesta fase, a sinalização ocasionada por alterações teciduais ativa as células de defesa do tendão, macrófagos locais, fibroblastos e mastócitos que liberam grande número de moléculas proinflamatórias, em particular os agentes vasodilatadores. O fluxo sanguíneo local aumentado, bem como o estabelecimento de um gradiente quimiotático, e a ativação das células endoteliais favorecem a transmigração rápida dos neutrófilos para o local da lesão, onde liberam grande quantidade de moléculas proinflamatórias, em particular as quimiocinas, os radicais livres e as proteases. Adicionalmente, os monócitos que infiltram no sítio da lesão diferenciam-se em macrófagos para exercer atividade fagocítica e citotóxica (MARSOLAIS & FRENETTE, 2005).

O grande número de moléculas liberadas na fase inflamatória causa danos aos componentes funcionais do tendão. Como exemplos destacam-se as enzimas da família das metaloproteinases (MMPs), que são capazes de degradar diferentes tipos de colágeno e outros componentes responsáveis pela função tendínea. Essas proteases são também indispensáveis na migração de células inflamatórias e remodelação da matriz extracelular (MARSOLAIS & FRENETTE, 2005). As MMP9 e MMP13 estão envolvidas na degradação do colágeno e no início da fase inflamatória, enquanto as MMP2, MMP3 e MMP14 apresentam função na remodelação do tecido cicatricial (RILEY, 2005). Em algumas áreas específicas, a ação das proteases é restrita pela secreção de vários inibidores, incluindo os teciduais de metaloproteinases (TIMPS). Esses inibidores são

protease-específicos e se ligam fortemente à enzima, bloqueando sua atividade. A superexpressão dos TIMPS inibe a migração de alguns tipos celulares, indicando a importância das metaloproteases para a migração celular (ALBERTS et al., 2006).

A segunda fase do processo de cicatrização é a reparação, que pode iniciar dias após a lesão e durar vários meses. Essa fase caracteriza-se pela ocorrência da angiogênese e fibroplasia, que resultam na formação de um tecido de cicatrização com alinhamento inadequado das fibras de colágeno, no aumento do colágeno, em particular do tipo III em relação ao tipo I (SMITH, 1998). Durante a resolução da inflamação, os macrófagos liberam uma série de fatores de crescimento, incluindo o transformante beta1 (TGF- β 1), o de fibroblástico básico (b-FGF) e o endotelial vascular (VEGF), que são essenciais para angiogênese e início da reparação tendínea (MARSOLAIS & FRENETTE, 2005).

WILLIAMS et al. (1984) ressaltaram que, com a redução da inflamação, ocorre a cicatrização da lesão. Porém, existe a possibilidade de expansão do tecido cicatricial para os tecidos peritendíneos, que pode resultar na formação de aderências. Essas fibroses peritendíneas podem afetar a função do TFDS e contribuir para a claudicação. Adicionalmente, a presença de fibrose intratendínea excessiva predispõe a recidiva da tendinopatia.

A última fase do processo de cicatrização é a de remodelação, que tem início meses após a lesão, e é caracterizada pela conversão do colágeno do tipo III em I. Nessa fase, a atividade física controlada otimiza a cicatrização do tendão (SMITH, 1998). Segundo ALVES et al. (2001), o estresse longitudinal obtido pela atividade física controlada estimula a produção e o alinhamento do colágeno em fibras paralelas durante a evolução da cicatrização, melhorando assim as propriedades mecânicas do tecido cicatricial (SMITH, 2003). Esse aspecto é importante, pois o elevado grau de paralelismo das fibras está relacionado à maior resistência do tendão.

2.3. Tendinite do tendão do músculo flexor digital superficial

Os membros torácicos participam ativamente do processo de amortecimento da carga durante a locomoção, o que aumenta a possibilidade de aparecimento de lesões nos tendões e ligamentos situados na face palmar da região metacárpica. Segundo

FERNANDES et al. (2003), a rotina intensa de treinamentos e as provas predisõem o equino a lesões musculoesqueléticas, dentre as quais se destacam as tendinites.

O TFDS freqüentemente trabalha perto do seu limite de resistência tênsil, o que aumenta o risco de rompimento. Além disso, a carga que os tendões flexores suportam faz deles os mais freqüentemente lesionados (SMITH, 1998). A tendinite nesses tendões caracteriza-se por longo período de reabilitação e baixa eficácia dos tratamentos em relação ao processo de cicatrização do tendão. Além da demorada recuperação do tendão, há diminuição da elasticidade tendínea, justificando as freqüentes recidivas (BARREIRA, 2005), o que resulta em prejuízo econômico (PALMER et al., 1994). Segundo GILLIS et al. (1995), nos casos de tendinite, podem ser necessários de 3 a 16 meses para completa cicatrização do tendão, e os índices de recidiva podem variar entre 48 e 58%.

Em equinos da raça Puro Sangue Inglês há relato de até 13% de casos de lesões no TFDS. Em 25% deles, as tendinites ocorrem antes da primeira corrida (ROONEY & GENOVESE, 1981). Dos animais que retornam ao treinamento após a recuperação de tendinites, cerca de 70% não conseguem voltar a competir (OIKAWA & KASASHIMA, 2002).

A tendinite dos tendões flexores caracteriza-se clinicamente por claudicação de grau moderado a intenso, que pode ser evidenciada imediatamente após a lesão e se tornar mais intensa após 24 a 48 horas. Além disso, podem ser observadas alterações locais como edema, aumento de temperatura, e dor à palpação (GAUGHAN, 1994).

2.4. Monitoramento da tendinite

O processo de reparação do tendão pode ser monitorado por métodos não invasivos, como a ultra-sonografia, ou invasivos, como o exame histopatológico, mediante realização de biópsia tendínea (FACCO, 2003).

A ultra-sonografia é uma técnica de diagnóstico por imagem de grande auxílio na detecção e no acompanhamento de lesões que afetam o aparelho locomotor (van SCHIE et al., 2000). 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; GENOVESE, 1993; MARR et al., 1993).

Em eqüinos, a avaliação ultra-sonográfica deve ser realizada com o animal em estação e, preferencialmente, com os membros apoiados, para que o peso seja distribuído de forma mais equilibrada entre os membros pélvicos e torácicos. Esse aspecto é importante, pois o apoio inadequado pode modificar o tamanho, a forma e a ecogenicidade dos tendões e ligamentos durante o exame (REEF, 1998). Segundo GENOVESE & RANTANEN (1998), o relaxamento do tendão pode produzir artefatos e diagnóstico errôneo.

A realização de tricotomia e o uso do gel no local da avaliação ultra-sonográfica são importantes para que não haja interferência na transmissão das ondas sonoras, bem como a presença de ar entre o transdutor e a superfície da pele (ALVES, 1998). Entretanto, em eqüinos com pêlo mais curto, o exame pode ser realizado sem tricotomia da região, mas a qualidade da imagem obtida costuma ser inferior (SMITH, 1998). Adicionalmente, em algumas situações (animal agitado, indócil) a sedação também pode ser necessária (WRIGLEY, 2006), ainda que possa alterar o apoio do animal.

Para avaliação ultra-sonográfica recomenda-se o uso de um aparelho portátil que permita a movimentação ao redor do animal, bem como o seu transporte para pistas de corrida, locais de treinamento e haras. Imagens de alta resolução são obrigatórias, visto que tendões e ligamentos são estruturas relativamente pequenas, sendo importante a identificação inclusive de lesões discretas (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. Por outro lado, o uso de transdutores de 5 MHz não é recomendado, pois lesões mais discretas podem não ser detectadas (GENOVESE & RANTANEN, 1998).

REEF (1998) ressaltou que os transdutores de 10 MHz são ideais para obtenção de imagens mais superficiais de tendões e ligamentos, particularmente daqueles de menor tamanho, como é o caso dos tendões extensores e ligamentos colaterais. Na opinião de GENOVESE & RANTANEN (1998) a utilização do *standoff pad* (distanciador) é essencial quando se deseja estudar a superfície do TFDS.

Durante a avaliação do TFDS devem-se considerar cinco variáveis sonográficas básicas: tamanho, formato, textura, posição e alinhamento das fibras. Estas variáveis são usadas para identificar anormalidades no TFDS ou verificar o estado de reparação. Para

um estudo mais metódico das estruturas moles localizadas na região metacárpica, SMITH (1998) recomendou a divisão da região em sete zonas ou níveis, tomando como base a distância entre o carpo e a articulação metacarpofalangiana. Segundo REEF (1998), a área transversal do tendão (ATT), a área transversal da lesão (ATL), a ecogenicidade e o alinhamento das fibras devem ser classificados em cada zona para melhor avaliação da lesão em toda extensão do tendão.

ALVES (1998) ressaltou que em condições fisiológicas cada estrutura possui densidade própria. Nesse sentido, quanto mais denso for o tecido mais ecos retornarão ao transdutor e, conseqüentemente, maior será a ecogenicidade da imagem projetada no monitor. De acordo com GENOVESE & RANTANEN (1998), a densidade reflete o grau de ecodensidade das fibras colágenas, dos fluidos inflamatórios, e do infiltrado celular ou uma combinação desses componentes teciduais, em função da cronicidade do processo.

As lesões de fase aguda das tendinites serão observadas no monitor como uma imagem hipocóica ou anecóica (SPURLOCK et al., 1989a; MARR et al., 1993). Já as lesões crônicas apresentar-se-ão com aumento de ecogenicidade quanto maior for a presença de tecido fibroso (ALVES, 1998).

GAUGHAM (1994) ressaltou que outras técnicas de diagnóstico por imagem como a radiografia e a cintilografia também podem auxiliar no diagnóstico de tendinite. Mais recentemente, a ultra-sonografia computadorizada (van SCHIE et al., 2003) tem sido utilizada para reduzir a interferência de possíveis artefatos nos sonogramas. Esta técnica, entretanto, ainda não está disponível no Brasil.

O exame histopatológico do tecido tendíneo obtido mediante biópsia vem sendo rotineiramente utilizado na avaliação do efeito de diferentes terapias na qualidade da cicatrização do TFDS (ALVES, 1998; MACHADO et al., 2000; ALVES et al. 2002; FERNANDES et al., 2003; MARXEN et al., 2003; BARREIRA, 2005).

As técnicas de coloração mais utilizadas na realização de um exame histopatológico do TFDS são hematoxilina-eosina (HE) (SPURLOCK et al., 1989a; MARR et al., 1993; ALVES, 1998; FERNANDES et al., 2003; MARXEN et al., 2003; van SCHIE et al., 2000; BARREIRA, 2005), Tricrômico de Masson (MARR et al., 1993; MARXEN et al., 2003) e Picrosirius Red (ALVES, 1998; FERNANDES et al., 2003).

As lâminas histológicas em cortes longitudinais e transversais coradas com HE e Tricrômico de Masson são analisadas mediante microscopia de luz (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004), enquanto as coradas com Picosirius Red são analisadas em luz polarizada (MONTES & JUNQUEIRA, 2004). Na microscopia de polarização, as fibras colágenas do tipo I são birrefringentes, ou seja, aparecem brilhantes contra um fundo escuro. Entretanto, ao serem analisadas em microscópio de luz, após coloração com HE, as fibras apresentam-se coradas de rósea e com estriação longitudinal, devido ao caráter acidófilo e pela constituição por fibrilas, respectivamente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Baseando-se em informações de vários autores, van SCHIE et al. (2003) classificaram histologicamente as seguintes fases de evolução do processo de cicatrização para o TFDS: tecido necrótico, tecido de granulação inicial, tecido de granulação tardio, tecido fibrótico inicial, tecido fibrótico tardio e tecido cicatricial. Na prática, as variáveis mais frequentemente avaliadas no exame histopatológico do TFDS incluem vascularização, celularidade, paralelismo e retração das fibras colágenas e presença de células inflamatórias e fibrocartilagenosas, além da caracterização do tecido conjuntivo interfascicular (MARXEN et al., 2003).

2.5. Tendinite induzida experimentalmente por collagenase

A administração intratendínea de collagenase tem-se mostrado um modelo eficaz para o estudo de tendinite do TFDS, por mimetizar características semelhantes às lesões verificadas naturalmente. FERNANDES et al. (2003) observaram 48 horas após a indução da tendinite a presença de edema, dor à palpação e grau variável de claudicação. O exame ultra-sonográfico revelou, além de hipocogenicidade, aumento da área transversal do tendão e da lesão, assim como edema peritendíneo.

Estudos com indução experimental de tendinite do TFDS têm demonstrado que nas primeiras semanas após a aplicação intratendínea de collagenase, as imagens ultra-sonográficas apresentam redução da ecogenicidade (áreas hipocóicas a anecóicas) e área da lesão com tamanho variável (SPURLOCK et al., 1989a; MARR et al., 1993; ALVES et al., 2001, 2002; FERNANDES et al., 2003; MARXEN et al., 2004).

De acordo com WILLIAMS et al. (1984), a administração de collagenase no centro do tendão resulta em rápida dissolução de fibras colágenas, necrose celular, hemorragia e

inflamação, que se assemelham a muitos aspectos observados em lesões espontâneas decorrentes de traumas. Estes autores avaliaram as alterações clínicas, macroscópicas e histopatológicas do TFDS de 16 pôneis em diferentes momentos após a administração intratendínea de colagenase. O exame histopatológico revelou, após uma semana da indução da lesão, organização evidente do exsudato, além da presença de fibroblastos arredondados ao redor da área lesionada. Além disso, foi observado grande número de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, conjuntamente com pequenos vasos sangüíneos se desenvolvendo no tecido de granulação. Adicionalmente, estavam associados ao tecido de granulação áreas de hemorragia com fibrina coagulada e fibras colágenas danificadas. Após um mês da lesão, o tecido recém-formado estava densamente povoado por fibroblastos arredondados, células mononucleares dispersas, além de mitoses e formação de novos capilares.

A dose de colagenase utilizada experimentalmente por via intratendínea é variável (FOLAND et al., 1992; ALVES et al., 2002; MARXEN et al., 2004). Entretanto, estudo com 12 equinos submetidos à aplicação de 0,5 mL ou 1 mL ($2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) de colagenase por via intratendínea demonstrou que a dose de 2,5 mg da enzima apresentou melhor padronização ultra-sonográfica para a realização de estudos experimentais de tendinite do TDFS (YAMADA et al., 2007). Segundo SPURLOCK et al. (1989a), à medida que se eleva a unidade de colagenase administrada no tendão, o tamanho da lesão aumenta e a ecogenicidade diminui.

2.6. Tratamento clínico da tendinite

São inúmeros os tratamentos clínicos disponíveis para as fases aguda e crônica da tendinite. O objetivo da terapia é melhorar a qualidade do tecido cicatricial, para que o animal possa ter maior possibilidade de retornar à sua atividade física. Para isso, é importante não apenas a detecção precoce da lesão, mas também o monitoramento da mesma (CAETANO, 2002).

A terapia inicial para a fase aguda é voltada para o controle da inflamação (SMITH, 1998). A redução da inflamação aguda é conseguida mais efetivamente com a combinação de tratamentos utilizando antiinflamatórios locais e sistêmicos. A hidroterapia com água gelada ou gelo ajuda a diminuir a liberação venosa de fluidos, proteínas e mediadores

inflamatórios, limitando a formação de hematoma e edema (HENNINGER, 1994; SMITH, 1998; REEF, 1999). Adicionalmente, a hidroterapia com água gelada minimiza o efeito da colagenase, por manter a temperatura tecidual mais baixa (EQUINE SPA, 2004).

Na fase de reparação, ou seja, de formação do tecido cicatricial, o tratamento utilizado deve maximizar a capacidade de reparação e remodelação do tecido e minimizar o risco de recidiva (SMITH, 1998). Para essa fase está disponível uma série de medicamentos, dos quais se destacam os glicosaminoglicanos polissulfatados (PSGAGs), os glicosaminoglicanos não-sulfatados, o fumarato de β -aminopropionitrila (FBAPN) e, mais recentemente, as células-tronco mesenquimais (CTMs) e o PRP.

Os PSGAGs pertencem ao grupo de polissacarídeos polissulfatados (McILWRAITH, 2006), sendo responsáveis pela redução da atividade das colagenases e dos macrófagos e pela melhoria no alinhamento das fibras de colágeno durante a reparação do tendão (SMITH, 1992). Entretanto, MARXEN et al. (2004) estudando equinos da raça Árabe, com idade entre dois e seis anos, tratados com cinco aplicações intralesionais de PSGAGs em intervalos de quatro dias, não observaram benefícios da terapia para o tratamento da tendinite do TFDS, experimentalmente induzida com 2,5 mg ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de colagenase. DYSON (2004) evidenciou resultados similares ao estudo anterior ao tratar equinos com tendinite espontânea do TFDS por via intralesional ou intramuscular com PSGAG.

O hialuronato de sódio é um glicosaminoglicano não-sulfatado constituinte do tecido conjuntivo da matriz extracelular do tendão (GIFT et al., 1992). Acredita-se que a aplicação intratendínea de hialuronato contribua para a diminuição do tamanho da lesão e da formação de aderências (SAWDON et al., 1996; DYSON, 1998). Por outro lado, FOLAND et al. (1992) relataram que, baseando-se em avaliações histológica, ultrasonográfica e biomecânica, a administração intratendínea de hialuronato de sódio em equinos com tendinite não promove melhora na reparação tendínea.

O FBAPN, substância tóxica encontrada em sementes do vegetal *Lathyrus odoratus*, se liga à enzima lisil oxidase, inibindo a diaminação da lisina, que constitui o primeiro passo na formação de ligações cruzadas covalentes entre as fibras colágenas (STRYER, 1988).

Em estudo comparativo utilizando-se diferentes drogas (hialuronato de sódio, PSGAG e FBAPN) em 219 equinos com tendinite espontânea, DYSON (2004) constatou

que o tratamento com o FBAPN, associado a exercício controlado, reduz o risco de recidivas, além de proporcionar um bom alinhamento das fibras colágenas após quatro meses do início do tratamento. Em outro estudo, realizado por ALVES et al. (2001) em 16 eqüinos com tendinite do TFDS induzida experimentalmente com 1,25 mg (2,5 mg.mL⁻¹) de colagenase, foi observado que o tratamento com FBAPN por via intralesional, quando associado à atividade física controlada, favorece o remodelamento da cicatrização do tendão, tendo em vista o melhor paralelismo das fibras colágenas na área da cicatriz.

REEF et al. (1997), estudando 99 eqüinos com tendinite espontânea do TFDS com um a quatro meses de evolução, concluíram que o tratamento com FBAPN por via intralesional na dose de 7 a 8 mg (total de cinco aplicações) resulta na redução significativa da ATT, bem como no melhor alinhamento das fibras colágenas quando comparado com os tendões tratados com placebo (solução salina). Entretanto, estudo *in vitro* realizado por DAHLGREN et al. (2001) com o propósito de avaliar os efeitos do FBAPN administrado isoladamente ou em combinação com o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) sobre o metabolismo dos tendinócitos do TFDS de eqüino, revelou que o tratamento isolado com este fármaco resulta em diminuição da síntese de proteínas e colágenos, que pode ser interpretado como uma supressão da cicatrização do tendão. Adicionalmente, os autores ressaltaram que os resultados do estudo sugerem que o FBAPN deva ser usado com precaução e com regime de atividade física cuidadosamente controlada, para que se possa evitar o aparecimento de graves seqüelas.

As CTMs são capazes de se transformar em diferentes tipos celulares especializados (SULLIVAN, 2005), estando presentes em pequeno número em todos os tecidos (YOUNG et al., 1998). Segundo SMITH et al. (2003), essas células apresentam potencial de diferenciação em tendinócitos, com regeneração da matriz tendínea após lesão. Em estudo recente, BARREIRA (2005) constatou que a terapia com células precursoras mesenquimais obtidas da medula óssea acelera o processo de cicatrização dos tendões. Entretanto, na opinião de SMITH et al. (2003), apesar da resposta, o tratamento exige cautela, pois o uso de grandes volumes de aspirado da medula óssea (30 a 50 mL) pode ocasionar destruição do tecido tendíneo e alguns tipos celulares podem prejudicar a cicatrização do tendão. Portanto, o material obtido deve ser processado em laboratório especializado para que se obtenha entre 2.000.000 e 6.000.000 de células mesenquimais,

que deverão ser misturadas a uma pequena quantidade de diluente, para finalmente serem administradas na região lesionada (SMITH et al., 2003; SULLIVAN, 2005).

Outros tratamentos, como a laserterapia, o ultra-som terapêutico e as ondas de choque extra-corpóreas, também vêm sendo utilizados na terapia da tendinite em equinos. FERNANDES et al. (2003) avaliaram os efeitos do ultra-som terapêutico de modo pulsado e contínuo com frequência de 3 MHz no tratamento de 18 equinos com tendinite do TFDS, induzida por colagenase. Ao término do experimento os autores constataram que a atividade fibroblástica e a neovascularização foram mais pronunciadas nos grupos tratados em relação ao controle, além da mais rápida redução dos sinais clínicos nos primeiros.

MACHADO et al. (2000) avaliaram os efeitos da laserterapia com emissão do raio laser arsenieto de gálio na reparação de tendinite do TFDS induzida por colagenase, em 10 equinos mestiços com idade entre dois e cinco anos, mediante avaliações ultra-sonográfica e histopatológica. Os resultados revelaram que a terapia proporcionou apenas efeito analgésico na fase inflamatória, mas com relação ao processo de reparação, o raio laser não influenciou de forma significativa.

O PRP, uma fonte autógena e econômica de diversos fatores de crescimento, importantes na reparação tecidual, será melhor descrito na seqüência.

2.7. Plaquetas e fatores de crescimento

As plaquetas são corpúsculos anucleados, com a forma de disco, medindo cerca de 2 a 4 μm de diâmetro, derivados de células gigantes e multinucleadas da medula óssea, os megacariócitos. Esses corpúsculos apresentam importante função no processo de coagulação do sangue e sobrevivem por aproximadamente 10 dias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Estruturalmente, as plaquetas apresentam microtúbulos, microfilamentos de actina e miosina, glicogênio, lisossomo, grânulos alfa (α -grânulos) e grânulos densos, localizados no citoplasma. Os grânulos densos contêm adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio, enquanto os α -grânulos possuem fatores de coagulação e de crescimento e outras proteínas (ZUCKER-FRANKLIN et al., 1988). Os α -grânulos são exemplos de organela secretora, e apresentam compartimentalização e

conteúdo protéico adquiridos por dois mecanismos distintos: biosíntese a partir dos megacariócitos e endocitose e pinocitose (HARRISON & CRAMER, 1993).

Normalmente, as plaquetas encontram-se no estado inativo (EVERTS et al., 2006). A sua ativação pode ser realizada por agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaqueta, serotonina e epinefrina) e farmacológicos (ionóforo de cálcio, cloreto de cálcio e análogos de endoperóxido cíclico) (BLOCKMANS et al., 1995; CARMONA et al., 2007). Acredita-se que todos esses agonistas desencadeiam seus efeitos através da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas (BLOCKMANS et al., 1995). Após estimulação agonista, os α -grânulos plaquetários liberam proteínas por exocitose no local de lesão para iniciar o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas (HARRISON & CRAMER, 1993).

Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfológicamente e desenvolvem pseudópodos que promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a desgranulação dos grânulos (EVERTS et al., 2006). A Figura 1 apresenta a seqüência de acontecimentos após a ativação das plaquetas pela trombina.

Os fatores de crescimento são peptídeos sinalizadores que regulam o metabolismo celular pela interação com um organizado complexo de receptores de superfície celular, pelas vias de sinalização intracelular e, finalmente, pelo aumento da transcrição de fatores e produção de proteínas que resultam na proliferação e diferenciação celular, como também pelo aumento da produção da matriz extracelular (DAHLGREN et al., 2001). Esses peptídeos liberados na matriz extracelular ligam-se ao receptor tirosina-quinase, presente nas células teciduais. A ativação desse receptor cursa com a sinalização de informações para genes responsáveis pelo controle da divisão celular. O RNAm é transcrito, produzindo assim uma resposta biológica que inicia a cascata que induz a reparação e regeneração tecidual (ANTONIADES & WILLIAMS, 1983; SCHLIEPHAKE, 2002) (Figura 2).

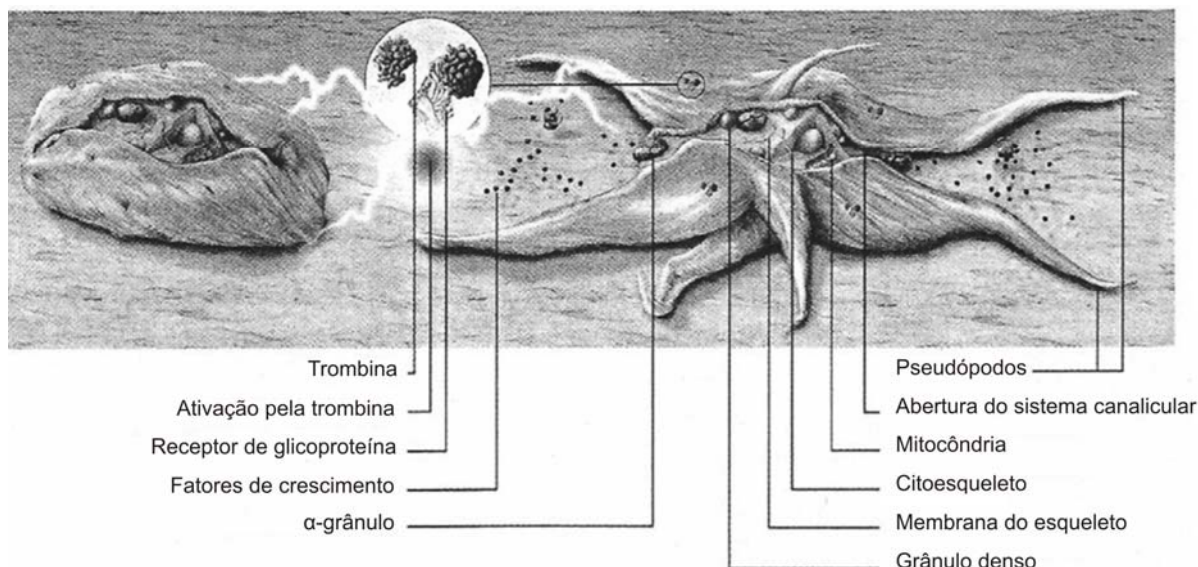


Figura 1 - Esquema das plaquetas nas formas inativa (à esquerda) e ativa (à direita) Quando ativadas pela trombina, as plaquetas mudam de forma com o desenvolvimento de pseudópodos para promover a agregação plaquetária e, subseqüentemente, liberação dos grânulos. Traduzido de EVERTS et al. (2006).

A desgranulação plaquetária propicia a liberação de TGF- β , fibrinogênio, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), VEGF, tromboplastina plaquetária, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (HARRISON & CRAMER, 1993). Adicionalmente, outros fatores como o de crescimento fibroblástico básico (FGFb) (EVERTS et al., 2006), de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (KUBOTA et al., 2004) e o IGF-I (WEIBRICH et al., 2002) também estão presentes nas plaquetas.

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

(reepitelização). Resumidamente, os fatores de crescimento provenientes dos α -grânulos plaquetários produzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição da matriz extracelular (EVERTS et al., 2006). Uma breve caracterização de alguns destes fatores é apresentada na Tabela 1 e na Figura 3.

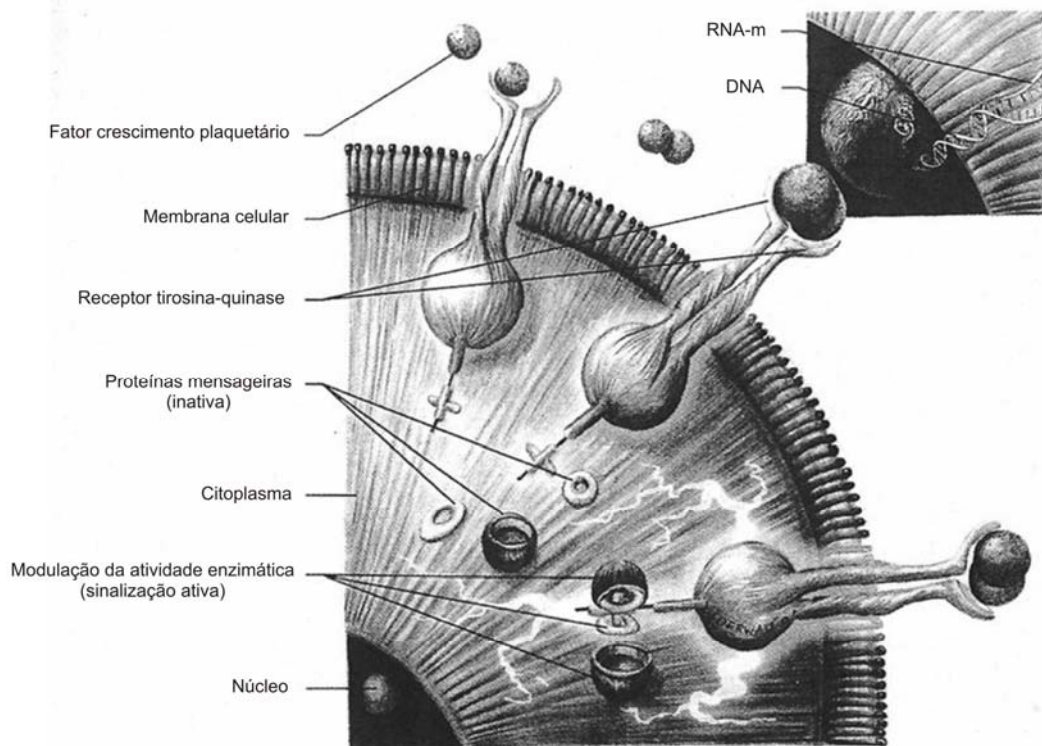


Figura 2 – Esquema do mecanismo pelo qual os fatores de crescimento plaquetários se ligam ao receptor tirosina-quinase. Essa ligação cursa com a transmissão de sinais intracelulares para o núcleo. Traduzido de EVERTS et al. (2006).

Tabela 1 - Fatores de crescimento presentes no PRP: fonte e função

Fator de crescimento	Fonte	Função
FC transformante beta (TGF-β)	Plaquetas, matrizes óssea e cartilaginosa, linfócitos T helper (Th1) ativados, células natural killer, macrófagos, monócitos e neutrófilos	Estimula a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; regula a mitogênese endotelial, fibroblástica e osteoblástica; regula a síntese de colágeno e a secreção de collagenase; regula o efeito mitogênico de outros fatores de crescimento; estimula a quimiotaxia endotelial e a 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 collagenase; estimula a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos ^{1,6}
FC epidérmico (EGF)	Plaquetas, macrófagos e monócitos	Estimula a quimiotaxia endotelial e angiogênese; regula a secreção de collagenase; estimula a mitogênese epitelial e mesenquimal ^{7,8}
FC endotelial vascular (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 de 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 & FRENETTE (2005), 4. ROSIER et al. (1998), 5. WANG (1996), 6. FRIESEL & MACIAG (1995), 7. CANALIS et al. (1989), 8. STEENFOS (1994), 9. MARTIN et al. (1992), 10. RHEE et al. (2004), 11. HOM & MAISEL (1992), 12. KUBOTA et al. (2004) e 13. SCHWARTZ-ARAD et al. (2007). Fonte: Modificado a partir de EVERTS et al. (2006).

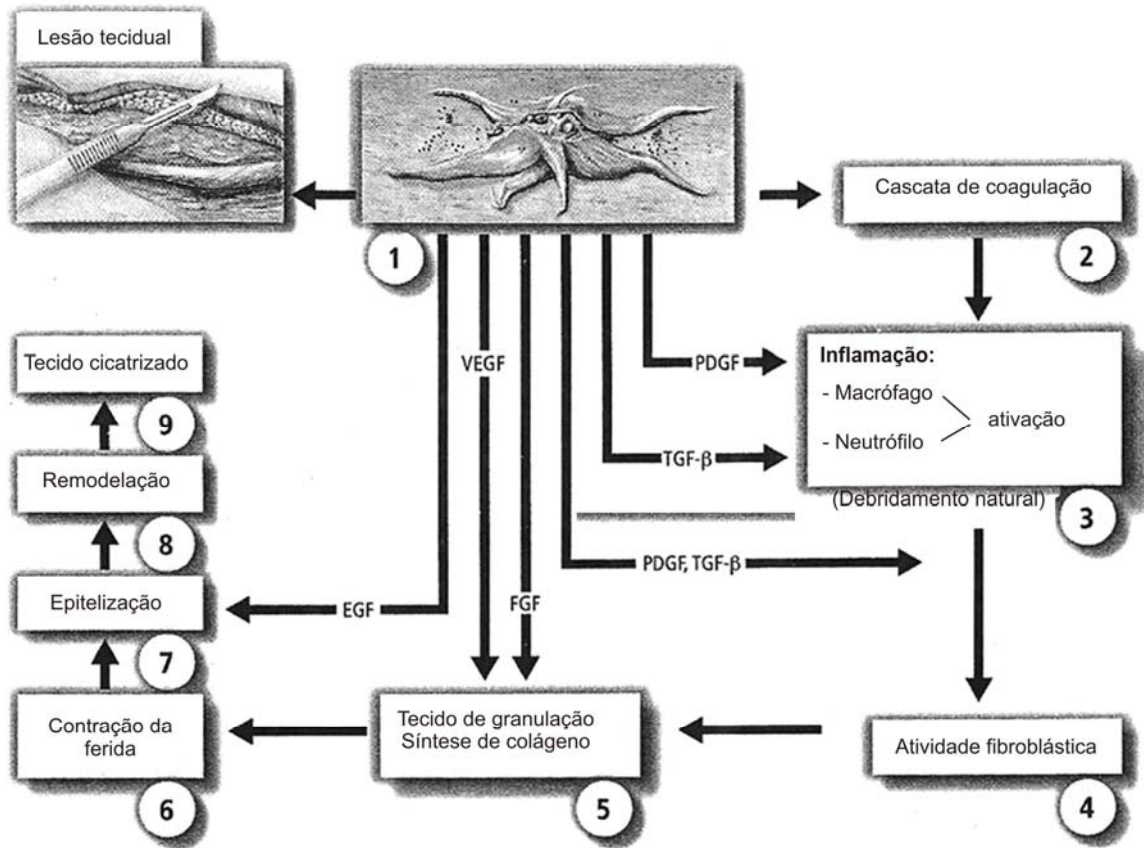


Figura 3 - Funções de fatores de crescimento derivados das plaquetas. Os números indicam a seqüência de ações durante as diferentes etapas do processo de cicatrização das feridas. Traduzido a partir de EVERTS et al. (2006).

2.8. Plasma rico em plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas é uma fonte autógena de fácil aquisição e de baixo custo, que contém diversos fatores de crescimento importantes na reparação tecidual, devido à ação mitogênica, quimiotática e neovascular. É derivado do sangue total e deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos (MARX et al., 1998; GONSHOR, 2002; KEVY & JACOBSON, 2004), que nos equinos podem variar entre 100.000 e 350.000 plaquetas. μL^{-1} (SCHALM et al., 1975).

Na opinião de ANITUA et al. (2004), concentrações superiores a 300.000 plaquetas. μL^{-1} são suficientes para o preparo do PRP. Em estudo *in vitro* com fragmentos do TFDS de equinos, SCHNABEL et al. (2007) demonstraram eficiência do PRP

utilizando concentração média de 395.000 plaquetas. μL^{-1} , mas segundo BARBOSA et al. (2006), a concentração de plaquetas no PRP depende da contagem inicial no sangue total, ou seja, quanto maior o número inicial de plaquetas mais rico será o PRP. Dessa forma, a trombocitopenia é um fator limitante para a concentração adequada de plaquetas.

O PRP atua na modulação e aceleração dos processos cicatriciais, sendo esses efeitos decorrentes dos fatores de crescimento contidos nos grânulos plaquetários (DINATO et al., 2001). Embora o exato mecanismo de ação sinérgica não esteja completamente elucidado, a aplicação local de fatores de crescimento tem potencial terapêutico importante no tratamento de feridas crônicas (DEBUS et al., 2000).

BENNETT & SCHULTZ (1993) relataram que esses fatores aceleram a cicatrização de tecidos sadios e promovem a reparação de ferimentos. Segundo DECLAIR (1999), os fatores de crescimento são essenciais na regulação dos eventos celulares envolvidos no processo de cicatrização por propiciarem a quimiotaxia para o local da lesão e influenciarem significativamente na deposição da matriz extracelular. Em humanos, o PRP tem sido associado a enxertos para reconstruções maxilo-faciais e tratamento de defeitos ósseos periodontais, por estimular a reparação óssea e a osteointegração, proporcionando assim, a obtenção de um tecido ósseo de melhor qualidade (SILVA et al., 2006). Estudo recente realizado por MISHRA & PAVELKO (2006) em 140 pacientes humanos com tendinite crônica demonstrou que o tratamento local com PRP reduz a dor e, na opinião dos autores, constitui-se numa opção terapêutica antes da intervenção cirúrgica. ASPENBERG & VIRCHENKO (2004) observaram que uma única administração intralesional de PRP pode melhorar a reparação tendínea em ratos, sendo esse efeito decorrente dos fatores do crescimento liberados durante a ativação das plaquetas.

Em Medicina Veterinária é crescente a utilização do PRP para realização de enxertos ósseos. Entretanto, PAGLIOSA & ALVES (2007) ressaltaram que embora haja resultados contraditórios no uso do plasma rico em plaquetas como fonte de fatores de crescimento, há um potencial evidente para seu uso como estimulador da osteogênese em focos de fraturas. No entanto, é necessária a padronização para obtenção e emprego desse material como enxerto ósseo, já que a técnica de produção é relativamente simples e de baixo custo. SILVA et al. (2007), avaliando os efeitos do PRP combinado à hidroxiapatita não-absorvível na formação do calo ósseo em fraturas diafisárias induzidas experimentalmente

em rádio de cães e fixadas com placas e parafusos ósseos, constataram que a associação do PRP com a hidroxiapatita não acelerou o processo de formação do calo ósseo, se comparado com a utilização isolada da hidroxiapatita (grupo controle). NUNES FILHO et al. (2007) também não observaram benefícios do PRP quando utilizado isoladamente ou em combinação com osso autógeno com a finalidade de reparação de cavidades ósseas no corpo da mandíbula de cães. Entretanto, BARBOSA (2006), utilizando PRP associado ou não a autoenxerto para reparação de falhas ósseas na crista da tíbia de cães, constatou que o uso combinado ao enxerto proporciona melhor crescimento ósseo do que quando o PRP e o enxerto são utilizados isoladamente.

AKEDA et al. (2006), estudando o disco intervertebral de suínos *in vitro*, constataram que o PRP foi efetivo na estimulação da proliferação celular, bem como no metabolismo da matriz extracelular, podendo assim ser aplicado por via local.

Em sete equínos acometidos de tendinite ou desmíte, ARGUELLES et al. (2005) observaram redução na intensidade da claudicação e melhora na imagem ultra-sonográfica das estruturas envolvidas, após tratamento com aplicação intralesional de PRP, com alguns animais retornando às atividades físicas após dois meses de tratamento. Em estudo recente realizado com cinco equínos, sendo dois acometidos com tendinite aguda do TFDS e três com desmíte proximal do ligamento suspensório, ARGUELLES et al. (2008) observaram melhora clínica em ambas as afecções após tratamento intralesional com PRP; porém, a avaliação ultra-sonográfica demonstrou que apenas os animais com tendinite apresentaram evolução positiva. Por outro lado, todos os equínos avaliados retornaram ao treinamento habitual seis meses após tratamento, não sendo observada recidiva até 20 meses após o mesmo, período em que os animais ainda se encontravam em observação. Estudo *in vitro* com fragmentos de TFDS de equínos realizado por SCHNABEL et al. (2007) demonstrou que o PRP, quando comparado a outros produtos do sangue (plasma pobre em plaquetas, plasma total, sangue total e aspirado de medula óssea), apresenta elevada concentração de fatores de crescimento, com efeitos anabólicos sobre a síntese da matriz tendínea. CARMONA et al. (2007), utilizando concentrados de plaqueta no tratamento de osteoartrite nas articulações femorotibial, metacarpofalangiana, tibiotársica e talocalcâneo-central e centroquartal de equínos, observaram melhora da claudicação, redução na efusão articular e efeito antiinflamatório.

Na Medicina Veterinária, a técnica para obtenção do PRP vem sendo baseada naquela utilizada para a espécie humana. O PRP pode ser obtido a partir da coleta do sangue total em tubos ou bolsas de sangue contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,8%, seguida de centrifugação e ativação do concentrado de plaquetas (CARTER et al., 2003; SUTTER et al., 2004; BARBOSA, 2006; CARMONA, 2006; CARMONA et al., 2007; SCHANABEL et al., 2007). É importante ressaltar que, segundo a literatura, são utilizadas normalmente duas centrifugações para a obtenção do PRP, sendo a velocidade de rotação da segunda superior à da primeira (ASPENBERG & VIRCHENKO, 2004; BARBOSA, 2006; FERRAZ et al., 2006; CARMONA et al., 2007; SCHANABEL et al., 2007; SILVA et al., 2007). Recentemente, CARMONA (2006) usou um protocolo para a obtenção do PRP, onde o sangue total foi centrifugado e ativado com cloreto de cálcio a 10% para utilização no tratamento de enfermidades músculo-esqueléticas (osteoartrites, tendinites e desmites) de equinos. Em outro estudo, com o propósito de se avaliarem diferentes velocidades de centrifugação (1.300, 1.600 e 3.200 rpm) do sangue total de cães para obtenção do PRP, FERRAZ et al. (2006) constataram que a velocidade de centrifugação mais adequada após a primeira (800 rpm por 10 minutos) foi de 1.600 rpm, pelo mesmo período de tempo. Esses autores obtiveram concentrações médias de 550.000 plaquetas. μl^{-1} e ressaltaram que as amostras submetidas a 3.200 rpm apresentaram alto grau de lise plaquetária, que poderia representar uma contagem aparentemente elevada das plaquetas, além de falha da técnica pela incapacidade desses fragmentos liberarem os fatores de crescimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas pré-experimental e experimental deste estudo foram realizadas no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV), com duração de 88 dias.

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram submetidos a análise da Comissão de Ética do DVT/UFV e após aprovação receberam nº. de protocolo 73/2007.

3.1. Seleção dos animais

Foram utilizados seis eqüinos mestiços hígidos (Figura 4) machos, castrados e com idade entre 8 e 15 anos, provenientes dos municípios de Teixeira e Porto Firme, MG. Nas propriedades, esses animais eram utilizados para trabalho e mantidos em piquetes. Ocasionalmente, recebiam capim-elefante (*Pennisetum purpureum*).



Figura 4 - Eqüinos selecionados para o experimento.

Durante o processo de seleção, os animais foram submetidos a exame físico, sendo avaliados comportamento, condição corporal, postura, grau de hidratação, coloração de mucosa, tempo de enchimento capilar (TEC), frequência cardíaca (FC), frequência

respiratória (FR), temperatura corporal (TC) e movimentos intestinais. Particularmente em relação ao grau de hidratação, a avaliação foi realizada através do turgor de pele, umidade da mucosa oral e TEC. Adicionalmente, foi realizado exame estático e dinâmico do aparelho locomotor, bem como ultra-sonográfico da região metacárpica palmar dos membros torácicos. Foram selecionados apenas animais sem lesões no aparelho locomotor e com escore corporal entre 2 a 3, da classificação de SPEIRS (1999), ou seja, de moderado a bom.

As informações referentes à idade e ao peso dos eqüinos antes do início do experimento são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Idade e peso dos eqüinos (fase pré-experimental).

Eqüinos	Idade (anos)	Peso (kg)
I	15	250
II	13	259
III	12	350
IV	8	300
V	12	333
VI	12	352
$\bar{X} \pm s$	$12 \pm 2,28$	$307 \pm 45,05$

s: desvio padrão.

3.2. Manejo dos animais

Um mês antes do início da pesquisa, os eqüinos foram colocados em baias individuais de 20 m², recebendo feno de *Coast cross* e ração¹. Sal mineral² e água foram deixados *ad libitum*. A manutenção dos animais em baias na fase pré-experimental teve como finalidade facilitar sua adaptação ao manejo a que seriam submetidos.

Duas semanas antes do início da fase experimental, os animais foram pesados e vermifugados por via oral com ivermectina e praziquantel³ na dose de 0,2 mg kg⁻¹, para a eliminação de endo e ectoparasitas. Adicionalmente, nesse mesmo período foi realizado

¹ Total - Rodovia Fernão Dias km 699, Distrito Industrial, Três Corações, MG. CEP: 37410-000.

² Nutriplan Indústria com Produtos Agropecuários Ltda, Rua Norte, 150, Santa Fé do Sul, SP. CEP: 15775-000.

³ Equivalen - Bequisa - Rodovia Padre Manoel da Nóbrega km 281, Gleba 37 - Samaritá, São Vicente, SP. CEP: 11346-300.

hemograma completo e conduzidas a determinação da proteína plasmática total (PPT) e do fibrinogênio.

No período entre a fase pré-experimental e experimental todos os animais ganharam peso e apresentaram escore de três (SPEIRS, 1999).

3.3. Indução de tendinite

No dia anterior à indução da tendinite, ambos os membros torácicos foram tricotomizados na região metacárpica palmar.

A tendinite do TFDS foi induzida nos membros torácicos direito (MTD) e esquerdo (MTE), mediante a administração de colagenase¹. Para isso, 2,5 mg da enzima foram pesados sobre papel alumínio estéril, em balança de precisão² com quatro casas decimais. Em seguida, a colagenase foi transferida para uma seringa de 3 mL, onde se realizaram a diluição e a homogeneização em 1 mL de água destilada estéril. Posteriormente, a seringa com a solução foi acondicionada em isopor com gelo por no máximo 10 minutos até o momento da aplicação.

Para a administração da colagenase, os animais foram inicialmente sedados com xilazina³ a 10% na dose de 1 mg kg⁻¹, por via intravenosa. Em seguida, foram realizados os bloqueios dos nervos palmares medial e lateral na região metacárpica proximal, utilizando-se 3 mL de cloridrato de lidocaína⁴, sem vasoconstritor (Figura 5). Posteriormente, com o auxílio de um transdutor linear ultra-sonográfico de 7,5 MHz, posicionado no plano transversal da região metacárpica, foi realizada a mensuração da distância da pele até o centro do TFDS (Figura 6). Essa distância foi marcada em uma agulha 21G⁵ com o auxílio de uma caneta. Após a marcação, 2,5 mg de colagenase foram administradas por via intratendínea monitorados pela imagem de ultra-som (Figura 7), utilizando-se a marcação realizada na agulha hipodérmica. A colagenase foi aplicada na região palmar do TFDS, no ponto médio localizado entre a borda distal do osso acessório do carpo e a proximal dos ossos sesamóides proximais, de forma a atingir o centro do

¹ Colagenase tipo 1: C-0130, Sigma Pharmaceutical – Box 1408 St Louis, Missouri 63178 USA.

² Bosch – Via Anhangüera km 98, Vila Boa Vista, Campinas/SP, CEP: 13065-900.

³ Sedazine Fort Dodge - Rua Luiz Fernando Rodriguez, 1701, Campinas, SP. CEP:13065-858.

⁴ Hipolabor - Rodovia BR 262, Km 12,3 – Borges, Sabará, MG. CEP: 31950-640.

⁵ Becton Dickison and Company Rutherford, New Jersey, 07070 USA.

tendão (correspondendo a zona 2B descrita por GENOVESE et al., 1986). Entretanto, quando a região de indução coincidiu com a localização do ramo comunicante, a administração da colagenase foi realizada distal ao terço médio (imediatamente abaixo da zona 2B), para não comprometer essa estrutura anatômica. Adicionalmente, após a indução da tendinite, foi realizado um ponto de sutura na pele no padrão simples separado, a fim de orientar os exames ultra-sonográficos posteriores.

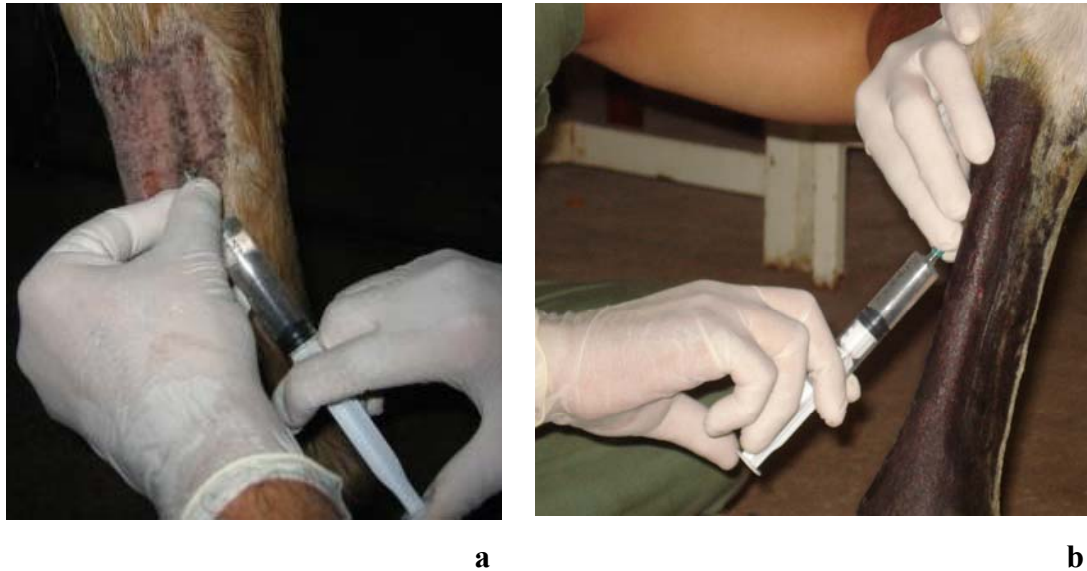


Figura 5 - Bloqueio dos nervos palmares. a. Medial. b. Lateral, na região metacárpica proximal, previamente à indução da tendinite.

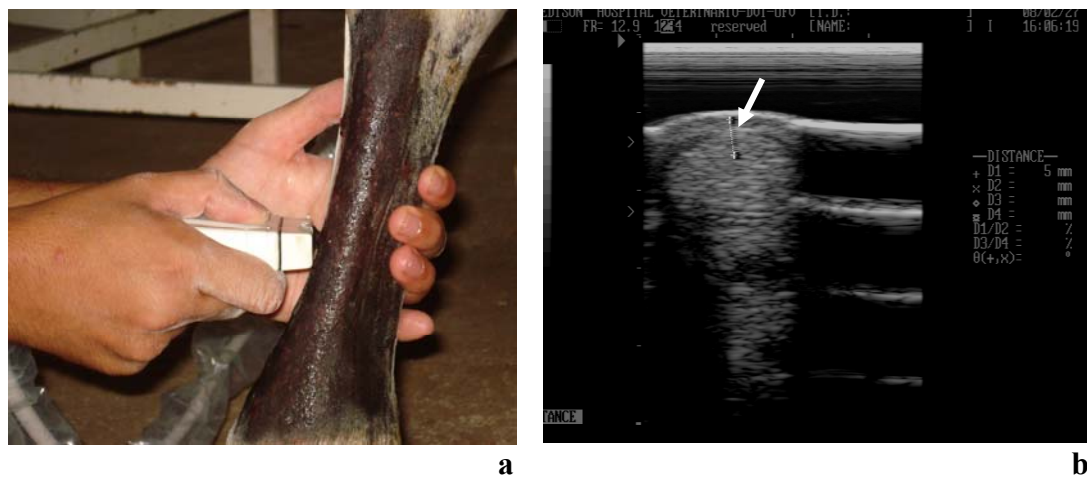


Figura 6 - a. Transdutor linear ultra-sonográfico de 7,5 MHz, posicionado no plano transversal da região metacárpica. b. Mensuração da distância entre a pele e o centro do tendão do músculo flexor digital superficial (seta).

Uma vez realizada a infiltração da colagenase, foi aplicada bandagem frouxa na região metacárpica, que permaneceu 24 horas. No período compreendido entre a indução da tendinite e o início dos tratamentos propostos, os animais ficaram em repouso nas baias.

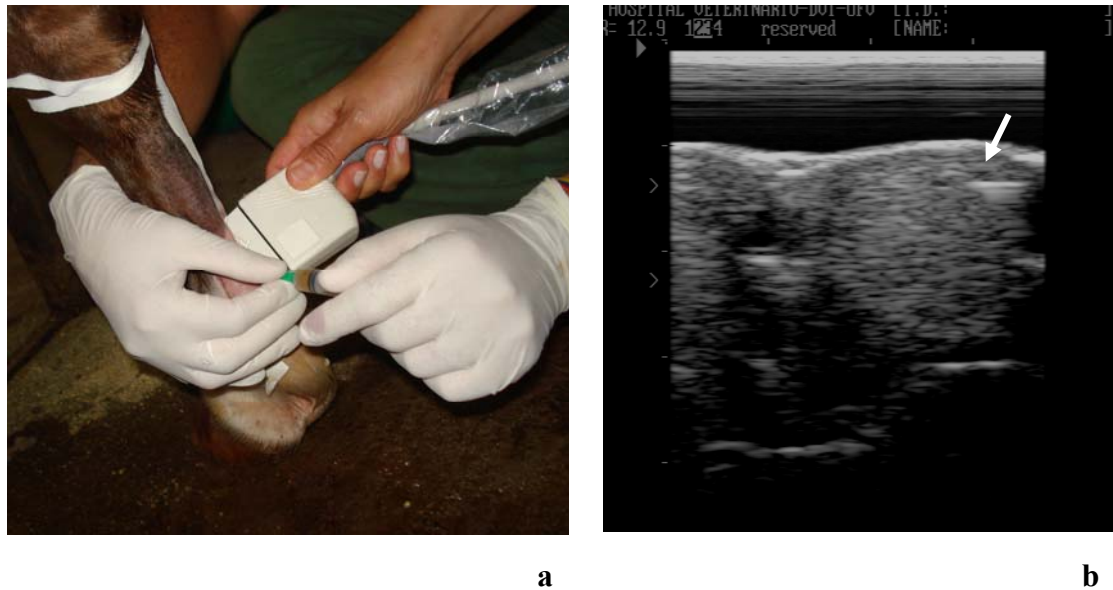


Figura 7 - a. Administração intratendínea da colagenase monitorada pelo transdutor de ultra-som. b. Imagem transversal demonstrando a agulha (seta) no tendão do músculo flexor digital superficial para indução da tendinite.

Ainda que se entenda a importância ética da utilização de analgésicos e antiinflamatórios para o bem-estar do animal após a indução da tendinite, e como o objetivo deste estudo foi a utilização de uma técnica que venha substituir muitas outras que em ocasiões são ineficientes a longo prazo, decidiu-se pela não-aplicação de antiinflamatórios não esteroidais. Assim, pode-se esclarecer que o mesmo seria um obstáculo à plena eficiência da tendinite experimental, bem como ocasionar dúvidas com relação à eficácia do tratamento proposto para o estudo (o PRP), além de interferir nas avaliações clínica e ultra-sonográfica realizadas. Por outro lado, após a biópsia do TFDS, realizada no final do experimento (ver pág. 34), foi utilizado um antiinflamatório não-

esteroidal, uma vez que pela incisão cirúrgica a agressão é sempre mais intensa e, certamente, culmina em maior comprometimento do bem-estar do animal.

3.4. Protocolo laboratorial para obtenção do PRP

Para a obtenção do PRP foram realizadas modificações a partir do método descrito por CARMONA (2006). Para isso, amostras de 81 mL do sangue de cada um dos animais foram colhidas por punção da veia jugular externa, em 18 tubos com capacidade para 4,5 mL, contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,8%¹.

As amostras de sangue foram homogeneizadas e centrifugadas a 120 g, durante cinco minutos. De cada tubo centrifugado foi descartado 1,5 mL do plasma presente na superfície, com o propósito de se usar um plasma mais concentrado em plaquetas na segunda centrifugação. Para isso, 20 mL do plasma obtido após a primeira centrifugação foram acondicionados em dois tubos sem anticoagulante², com 10 mL de capacidade, procedendo-se em seguida, à centrifugação dos mesmos a 473 g por cinco minutos. Após a segunda centrifugação, o plasma foi dividido em duas frações: o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) e a fração remanescente denominada plasma rico em plaquetas (Figura 8). O plasma pobre foi descartado e o PRP, reservado. Deste, 2,5 mL foram acondicionados em um novo tubo a vácuo sem anticoagulante, para ativação. Para tal, foram adicionados 125 µL de solução de cloreto de cálcio a 0,0125 mol.L⁻¹³. Posteriormente, o tubo com PRP foi incubado em estufa a uma temperatura de 20 a 22 °C, por duas horas, com a finalidade de estimular a desgranulação dos grânulos plaquetários. Adicionalmente, para liberação do coágulo de fibrina formado, procedeu-se nova centrifugação a 1.720 g por oito minutos, com a finalidade de facilitar a aplicação intratendínea do PRP.

Os tubos contendo o PRP ativado para aplicação intratendínea foram acondicionados em caixa de isopor com gelo identificado com o nome do animal.

¹ Tubo vacutainer com citrato de sódio - Vacuum II - Rua Maria Soldeira Lourençon, 176, Itupeva, SP. CEP:13950-000.

² Tubo vacutainer BD. Becton Dicksion Ind. Cirúrgicas Ltda. Av. Pres. Juscelino Kubitschek, Juiz de Fora, MG. CEP: 36081-000.

³ Cloreto de cálcio (Wiener lab) - Av. Guido Caloi, 1935, Térreo, bloco A, São Paulo, SP. CEP: 05802-140.

A certificação da concentração de plaquetas no PRP foi realizada tanto manual (método de Rees-Ecker) quanto automaticamente (aparelho de contagem de células sanguíneas¹), logo após a segunda centrifugação.



Figura 8 - Acondicionamento do plasma resultante da segunda centrifugação em tubo de 10 mL. O sobrenadante corresponde ao plasma pobre em plaquetas. A fração remanescente é denominada de plasma rico em plaquetas.

3.5. Tratamentos

Todos os animais foram tratados por aplicação intralesional 12 dias após a indução da tendinite. Na lesão efetuada no TFDS direito (grupo tratado – GT), foram administrados 2,5 mL do PRP ativado com cloreto de cálcio a $0,0125 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figura 9), contendo concentrações variando entre 320.000 e $500.000 \text{ plaquetas.}\mu\text{L}^{-1}$. Já na tendinite do TFDS esquerdo (grupo controle - GC), foram administrados 2,5 mL de solução salina a 0,9%².

Os volumes de 2,5 mL do PRP e da solução salina foram divididos em três pontos de aplicação, sendo 1,5 mL aplicado no local da lesão, 0,5 mL meio centímetro proximal dela e os outros 0,5 mL, meio centímetro distal da mesma. Para isso, foram utilizadas agulha de 21 G e seringas de 3 e 1 mL para o maior e menor volume, respectivamente.

¹ Coulter ACT-8 - Avenida Francisco Sales, 1463 sala 508, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG. CEP: 30150-221.

² Solução fisiológica Sanobiol – Laboratório Sanobiol Ltda - Av. das Quaresmeiras, s/nº, Distrito Industrial, Pouso Alegre, MG. CEP: 37550-000

3.6. Atividade física

Os animais foram submetidos à atividade física controlada e progressiva a partir de 15 dias da indução da tendinite, com monitoramento periódico por exame ultrassonográfico.

A atividade física de duração de 32 dias foi baseada naquela descrita por BARREIRA (2005), com redução do tempo total de atividade. Foi utilizado o seguinte esquema:

- Do 15^o dia de início do experimento até o 24^o: locomoção ao passo durante cinco minutos.
- Do 25^o ao 36^o dia: locomoção ao passo durante 10 minutos.
- Do 37^o ao 46^o dia: locomoção ao passo durante 15 minutos.

Durante essa atividade, os animais foram puxados pelo cabresto.

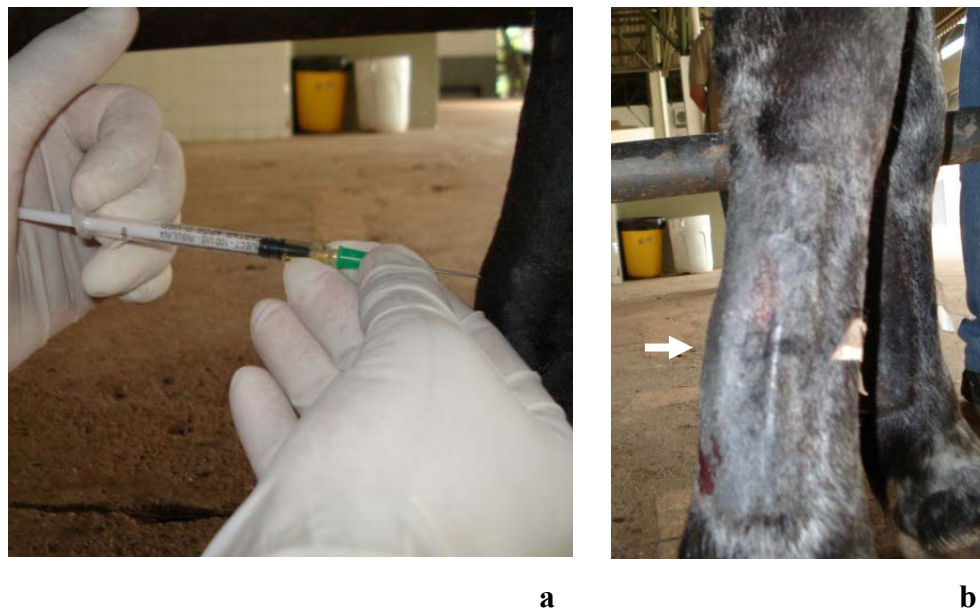


Figura 9 - a. Aplicação intralésional do plasma rico em plaquetas (PRP) no tendão do músculo flexor digital superficial direito utilizando seringa de 1 mL e agulha de 21G. b. Edema (seta) produzido imediatamente após a aplicação do PRP.

3.7. Exames físico e ultra-sonográfico

Durante o primeiro mês do experimento, foi realizado exame físico diário, sendo verificadas as mesmas variáveis do processo seletivo. Posteriormente, as avaliações foram realizadas duas vezes por semana até o 45^o dia.

Todos os animais foram submetidos a exames estático e dinâmico do aparelho locomotor. No exame estático, foram utilizados os métodos inspeção e palpação da região metacárpica palmar de ambos os membros torácicos, sendo averiguados a presença de edema (regiões medial, lateral e palmar do TFDS), dor à palpação e o aumento de temperatura local. A intensidade dessas variáveis foi classificada em: 0 (ausente), 1 (discreta), 2 (moderada) e 3 (intensa).

A avaliação dinâmica foi realizada em uma pista de superfície dura de 25 metros de comprimento por oito de largura. Inicialmente os animais foram observados ao passo e, posteriormente, na marcha, com o propósito de se avaliar a presença ou ausência de claudicação, que foi quantificada em escores de 0 a 5, adaptados a partir da classificação descrita por KESTER (1991):

Grau 0: não se observa claudicação;

Grau 1: claudicação em grau discreto, observada na marcha;

Grau 2: claudicação em grau discreto ao passo e moderado na marcha;

Grau 3: claudicação em grau moderado ao passo e intenso na marcha;

Grau 4: claudicação em grau intenso ao passo, com impossibilidade de locomoção na marcha; e

Grau 5: incapacidade de suportar peso no membro afetado.

O exame ultra-sonográfico foi realizado com equipamento portátil¹, provido de transdutor linear de 7,5 MHz, que proporcionou acompanhamento do TFDS antes da administração da colagenase, 48 horas após a indução da tendinite e no 7^o, 12^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias do experimento. As avaliações foram realizadas nos planos transversal e longitudinal, e as imagens obtidas, foram registradas a partir de uma placa de captura de vídeo instalada no computador², para posterior comparação entre os membros nos

¹ Aparelho de ultra-som linear da marca Medison, modelo Sonovet 600, Rua Apiacás, 910, Perdizes, São Paulo, SP. CEP: 05011-7020.

² Pixel View – www.prolink.com.tw, Taiwan.

diferentes momentos avaliados. As imagens obtidas pela captura apresenta melhor qualidade de visualização; porém o equipamento utilizado promove uma ampliação das mesmas. Dessa forma, para o cálculo da área transversal do tendão (ATT) e da lesão (ATL) foi necessário efetuar um ajuste nos valores obtidos para as imagens capturadas, considerando um fator de correção que foi obtido após testes prévios, nos quais foram correlacionados os dados de áreas obtidos nas imagens capturadas e os resultantes das imagens impressas, as quais não exibiam qualquer ampliação ou redução. O fator de ajuste utilizado na correção das imagens capturadas pela placa de vídeo foi de 3,1.

3.7.1. Variáveis avaliadas na ultra-sonografia

3.7.1.1. Área transversal do tendão (ATT) e área transversal da lesão (ATL)

A ATT e a ATL (em cm²) foram medidas a partir das imagens ultra-sonográficas obtidas a partir do plano transversal no local, proximal e distal à região de indução da tendinite, mediante a orientação de um ponto de sutura simples separado e marcação com o uso de uma caneta Texta fineline 700. As mensurações foram realizadas utilizando-se o software QUANT V1.0.0.28, desenvolvido pelo Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, MG, e já padronizado para utilização no tendão de equinos por ARISTIZÁBAL et al. (2005).

3.7.1.2. Percentual de área lesada no interior de cada tendão e intensidade da lesão

Para a determinação e avaliação dessas variáveis tomaram-se como base as informações descritas por GENOVESE & RANTANEN (1998).

O percentual de área lesada foi obtido por meio da relação entre a área total da lesão e área transversal do tendão. A intensidade da lesão foi avaliada de acordo com o padrão descrito:

Discreta: comprometimento de 1 a 15% da ATT;

Moderada: comprometimento de 16 a 25% da ATT; e

Intenso: comprometimento acima de 25% da ATT.

3.7.1.3. Ecogenicidade da lesão

A ecogenicidade foi graduada de 0 a 4, segundo a classificação de GENOVESE et al. (1986):

- 0: padrão normal (isoeecóico);
- 1: redução em 25% do padrão isoeecóico (predominantemente isoeecóico);
- 2: redução em 50% do padrão isoeecóico;
- 3: redução em 75% do padrão isoeecóico (predominantemente anecóico); e
- 4: redução em 100% do padrão isoeecóico (totalmente anecóico).

3.7.1.4. Paralelismo das fibras colágenas

A determinação do paralelismo das fibras foi realizada nas imagens obtidas longitudinalmente e graduada em escala de 0 a 3, conforme descrito por ALVES et al. (2001):

- 0: ausência de paralelismo;
- 1: paralelismo discreto;
- 2: paralelismo parcial; e
- 3: paralelismo total.

3.8. Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais foram realizados duas semanas antes do início do experimento e semanalmente até o término da fase experimental.

Após anti-sepsia com álcool iodado, foram obtidas amostras de 5 mL de sangue por punção da veia jugular externa (agulha vacutainer 25 x 8¹), em tubos de vidros a vácuo contendo o anticoagulante EDTA², para determinação dos valores de hematócrito, PPT, fibrinogênio, plaquetas, leucócitos totais e contagem diferencial.

A concentração de hematócrito (%) e a contagem dos leucócitos totais (células x 10³ μL^{-1}) e de plaquetas foram realizadas em aparelho de contagem de células sanguíneas.

¹ BD Vacutainer - Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda. Rua Alexandre Dumas, 1976, Chácara Santo Antônio, São Paulo, SP. CEP: 04717-004.

² Vacuum II - Rua Maria Soldeira Lourençon, 176, Itupeva, SP. CEP: 13295-000.

A contagem diferencial de células brancas foi realizada em microscópio de luz Olympus CX 40¹. A refratometria² foi a técnica utilizada para a determinação da concentração das proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio.

Estes exames foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do DVT/UFV.

3.9. Biópsia e exame histopatológico do TFDS

Após 48 dias do início do experimento, foi realizada biópsia do TFDS de ambos os membros torácicos. Para isso, os animais foram deixados em jejum alimentar por 12 horas.

Para o procedimento cirúrgico, os equinos foram sedados com xilazina a 10% (1 mg kg⁻¹), por via intravenosa. Em seguida, foi realizada a indução anestésica mediante a associação de 2 g de tiopental sódico³ com éter gliceril guaiacolato (EGG) a 10%⁴. A manutenção anestésica foi realizada com halotano⁵.

Com o animal em decúbito lateral sobre mesa cirúrgica, estando o local de indução da tendinite previamente tricotomizado, realizou-se anti-sepsia com iodo-povidine degermante a 1%⁶. Após incisão cutânea, foram realizadas divulsão romba do tecido subcutâneo e exposição do TFDS.

Uma vez localizada a região da lesão, conduziu-se a biópsia com o auxílio de lâmina de bisturi n.º 24⁷ (Figura 10), para obtenção de um fragmento com aproximadamente 0,8 cm³ de volume para realização de exame histopatológico.

Após a biópsia, foi procedida a tenorrafia no padrão de sutura em laço fechado, para se evitar possível ruptura tendínea no pós-operatório. A síntese do tecido subcutâneo foi feita com fio vicril 2-0⁸. Já para a síntese cutânea, foi utilizado fio de náilon n.º 0,4.

¹ Olympus CX 40 - Model CX 40RF100, Olympus optical Co, Ltda, Japão.

² Refratômetro - Atago, Hand Refractometer, Mod. Uricon cat No 135.

³ Tiopentax - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Rodovia Itapira-Lindóia, Km 14, Itapira, SP. CEP: 13970-000.

⁴ Éter gliceril guaiacolato – Vetec Química Fina Ltda, Rua Pastor Manoel Avelino de Souza, 1021, Distrito de Duque de Caxias, RJ. CEP: 25250-000.

⁵ Halotano Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Rodovia Itapira-Lindóia, Km 14, Itapira, SP. CEP: 13970-000.

⁶ Iodo povidine a 1% - Rioquímica Indústria Farmacêutica, Av. Tarraf, 2.590/2.600, São José do Rio Preto, SP. CEP: 15057-430.

⁷ Lâmina de bisturi Free Bac - Embramac, Rua Pedro Ferreira, 155, sala 1305, Itajaí, SC. CEP: 88301-900.

⁸ Vicril 2-0 – Eletro-Light Ltda. Av. Constatino Nery, 1272, Manaus, AM. CEP: 69050-000.



Figura 10 – Remoção de fragmento do TFDS no local da lesão com o auxílio de pinça e bisturi para exame histopatológico

Após biópsia, foi administrado meloxicam¹ por via oral, na dose de 0,6 mg kg⁻¹, a cada 24 horas, durante 10 dias, até o 58^o dia do experimento. Adicionalmente, durante esse período de pós-operatório, foram realizadas limpezas e curativos diários da ferida cirúrgica, bem como monitoramento clínico.

Os fragmentos colhidos foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada e processados por métodos histológicos rotineiros até a inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos em planos transversais e longitudinais, os quais foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina², Tricrômico de Masson³ e Picrosirius Red⁴. A análise histopatológica foi realizada em microscopia de luz (Olympus CX 40) e sob luz polarizada (Olympus AX 70⁵), sem o prévio conhecimento do avaliador do conteúdo dos grupos a que pertenciam as lâminas, conforme metodologia adotada por ALVES (1998).

Para a verificação da reparação dos tendões, foram utilizados alguns critérios descritos por BARREIRA (2005), sendo observadas as características morfológicas dos fibroblastos, a presença e tipo de infiltrado inflamatório, a neovascularização e a organização tecidual, que foi avaliada mediante a disposição das fibras colágenas e dos

¹ Maxicam gel – Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Rodovia Anhagüerara, 330, Km 298, Cravinhos, SP. CEP: 14140-000.

² Easy path - Erviegas instrumental cirúrgico Ltda, Lacedemônia, 268, São Paulo, SP. CEP: 04634-061.

³ Tricrômico de Masson com azul de anilina, EP 11-20013, Easy path - Erviegas instrumental cirúrgico Ltda, Lacedemônia, 268, São Paulo, SP. CEP: 04634-061.

⁴ Picrosirius e hematoxilina de Carazz, EP 11-20011 - Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda, Rua Lacedemônia 268, São Paulo, SP. CEP: 04634020.

⁵ Olympus AX 70 - Model AX 70 TRF, Olympus optical Co, Ltda, Japão.

fibroblastos na matriz tendínea. Para graduar cada característica avaliada no exame histopatológico, foi utilizada a escala descrita por FOLAND et al. (1992): 0 (ausente), 1 (discreta), 2 (moderada) e 3 (intensa).

A análise quantitativa dos vasos sangüíneos e dos fibroblastos foi realizada utilizando um retículo micrométrico de 1 mm², acoplado à ocular de microscópio de luz da marca Olympus CX 40. O número de vasos sangüíneos e de fibroblastos na região da lesão foi obtido após a contagem de 10 campos aleatórios observados em objetivas de 20X para a primeira variável, e de 40X para a segunda.

A Figura 11 apresenta a linha do tempo das diferentes etapas executadas durante a fase experimental.

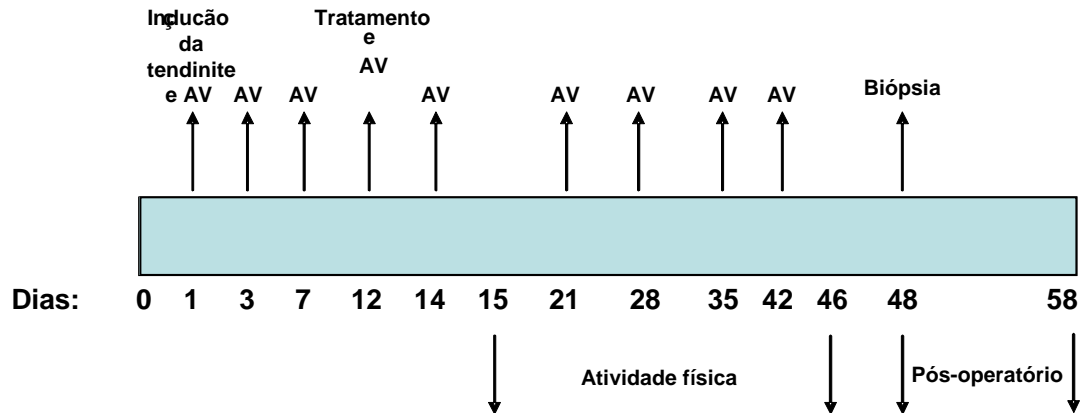


Figura 11 - Etapas do experimento: indução da tendinite (dia 1), avaliações (AV) clínica e ultra-sonográfica; realização dos tratamentos (GT: grupo tratado; GC: grupo controle), atividade física, biópsia e acompanhamento pós-cirúrgico.

3.10. Análise estatística

Na análise estatística foram avaliadas variáveis métricas e escores (notas) referentes às características clínicas (grau de claudicação, edema, temperatura e sensibilidade dolorosa à palpação), ultra-sonográficas (área transversal do tendão e da lesão tendínea, ecogenicidade da lesão e paralelismo das fibras colágenas) e histopatológicas (quantidade dos fibroblastos, presença e tipo de infiltrado inflamatório, neovascularização e organização tecidual).

As variáveis ultra-sonográficas (área transversal do tendão e da lesão tendínea; ecogenicidade da lesão e paralelismo das fibras colágenas) e clínicas (grau de claudicação; edema; temperatura e sensibilidade dolorosa à palpação) foram analisadas por meio de análises de regressões em função do tempo e do tratamento, estudado por uma variável dummy (GT=1 e GC=0), cujos coeficientes foram testados pelo teste t a 5% de probabilidade.

Os dados pareados dos grupos tratado e controle, referentes aos resultados da histopatologia (quantidade e características dos fibroblastos; presença e tipo de infiltrado inflamatório; neovascularização; e organização tecidual), foram analisados utilizando-se os testes t e de Wilcoxon a 5% de probabilidade, de acordo com a ocorrência de normalidade ou não das variáveis analisadas, respectivamente, no último tempo de avaliação (48 dias).

Para a análise de regressão foram utilizadas as médias dos grupos experimentais GT e GC nos diferentes tempos de avaliação após o tratamento.

4. RESULTADOS

4.1. Plasma rico em plaquetas (PRP)

A concentração das plaquetas no sangue utilizado para o preparo do PRP variou de 140.000 a 196.000 (166.500 ± 21.257) plaquetas. μL^{-1} . Já no PRP, a concentração foi de 320.000 a 500.000 (407.500 ± 58.800) plaqueta. μL^{-1} (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração de plaquetas no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP) obtida a partir dos eqüinos utilizados no experimento.

Eqüinos	Plaquetas no sangue total (μL^{-1})	Plaquetas no PRP (μL^{-1})
I	176.000	390.000
II	140.000	420.000
III	176.000	390.000
IV	144.000	320.000
V	196.000	425.000
VI	167.000	500.000
$\bar{X} \pm s$	166.500 ± 21.257	407.500 ± 58.800

s: desvio padrão.

4.2. Avaliações clínica e laboratorial

Durante o exame físico realizado nas fases pré-experimental e experimental, não foram observadas alterações de postura, comportamento, grau de hidratação, motilidade intestinal e consistência das fezes. As mucosas mantiveram-se normocoradas, e o tempo de enchimento capilar foi de dois segundos.

Os valores mínimos, máximos e médios referentes à TC, FC e FR, obtidos durante a fase experimental, estão apresentados na Tabela 4.

Após administração de 2,5 mg da colagenase no TFDS direito e esquerdo, os animais desenvolveram inflamação aguda, caracterizada pela presença de edema (moderado a intenso) e dor à palpação (discreta a moderada), que permaneceram por 12 dias, além do aumento de temperatura local (discreto a moderado), observado por quatro dias. Adicionalmente, foi constatada a presença de claudicação (inicialmente em grau 3, reduzindo para grau 1) durante seis a oito dias em três animais, e até os tratamentos nos demais (12^o dia).

Tabela 4 - Valores mínimos, máximos e médios de temperatura corporal (TC), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR), obtidos durante a fase experimental nos eqüinos utilizados no estudo.

Eqüino	Temperatura Corporal (°)	Frequência Cardíaca (bpm)	Frequência Respiratória (respirações/min)
	Min-Máx ($\bar{X} \pm s$)	Min-Máx ($\bar{X} \pm s$)	Min-Máx ($\bar{X} \pm s$)
I	36,3-38,1 (37,0 \pm 0,4)	28-40 (33,6 \pm 3,2)	8-24 (12,1 \pm 3,9)
II	36,2-38,0 (37,0 \pm 0,4)	28-40 (34,2 \pm 3,0)	8-20 (12,8 \pm 2,8)
III	36,2-38,0 (37,0 \pm 0,4)	28-44 (34,1 \pm 4,2)	8-24 (12,7 \pm 3,7)
IV	36,3-38,3 (37,1 \pm 0,5)	28-48 (33,5 \pm 4,6)	8-20 (12,7 \pm 2,7)
V	36,5-38,1 (37,1 \pm 0,4)	28-40 (33,8 \pm 3,4)	8-20 (13,1 \pm 2,9)
VI	36,2-38,2 (37,1 \pm 0,5)	32-48 (37,0 \pm 4,5)	8-28 (14,6 \pm 5,0)

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

Após a administração intratendínea do PRP, bem como da solução salina a 0,9% (12^o dia do experimento), as alterações clínicas locais e a claudicação continuaram nos grupos tratado (GT) e controle (GC), em intensidades que variaram de discreta a moderada. Entretanto, o edema localizou-se não apenas na região da indução da tendinite, mas se estendeu em direções proximal, distal, lateral e medial, permanecendo de forma discreta em dois animais até o 30^o dia, e nos demais até o 45^o dia (última avaliação clínica). A estimativa da intensidade do edema, bem como sua redução ($P < 0,05$) em função do tempo está apresentada na Figura 12. Houve diferença ($P < 0,05$) entre as médias dos grupos, com menor intensidade no GT.

A dor à palpação, observada no exame estático, apresentou intensidade variando de discreta a moderada, estando presente até o 20^o (N = 3), 30^o (N = 1) e 45^o (N = 2) dias. A estimativa da intensidade dessa variável em ambos os grupos após o tratamento, bem como a sua redução ($P < 0,05$) em função do tempo, estão apresentados na Figura 13. Ocorreu diferença ($P < 0,05$) entre as médias dos grupos, com menor intensidade no GT. Adicionalmente, observa-se maior efeito do tratamento sobre essa variável em comparação com o tempo.

O aumento de temperatura local foi discreto e esteve presente apenas durante quatro dias após o tratamento nos seis animais, não sendo observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos.

O exame dinâmico revelou claudicação em grau que variou de 1 a 2 [escala de 1 a 5 (KESTER, 1991)] em cinco animais, permanecendo durante dois (N = 2), 18 (N = 2) e 33 (N = 1) dias após o tratamento. Um dos animais (n^o III) não apresentou claudicação. A

Figura 14 mostra a redução ($P < 0,05$) da intensidade desta variável em função do tempo em ambos os grupos, sem que diferenças ($P > 0,05$) fossem observadas entre eles.

O exercício gradativo e controlado, iniciado três dias após o tratamento com PRP, não ocasionou relutância em se locomover, embora alguns animais ainda estivessem apresentando edema e dor à palpação local.

As equações de regressão utilizadas para a construção das Figuras 12 a 14 estão apresentadas na Tabela 5. Nota-se a influência do tempo na redução das variáveis, assim como a diferença ($P < 0,05$), já mencionada anteriormente, com relação ao edema local e dor à palpação. Adicionalmente, é importante ressaltar que o efeito do tempo foi similar para todas as variáveis clínicas estudadas, sendo $\beta_1 = 0,0229435$. Para cada dia após o tratamento, os valores das variáveis reduziram em média 0,0229435.

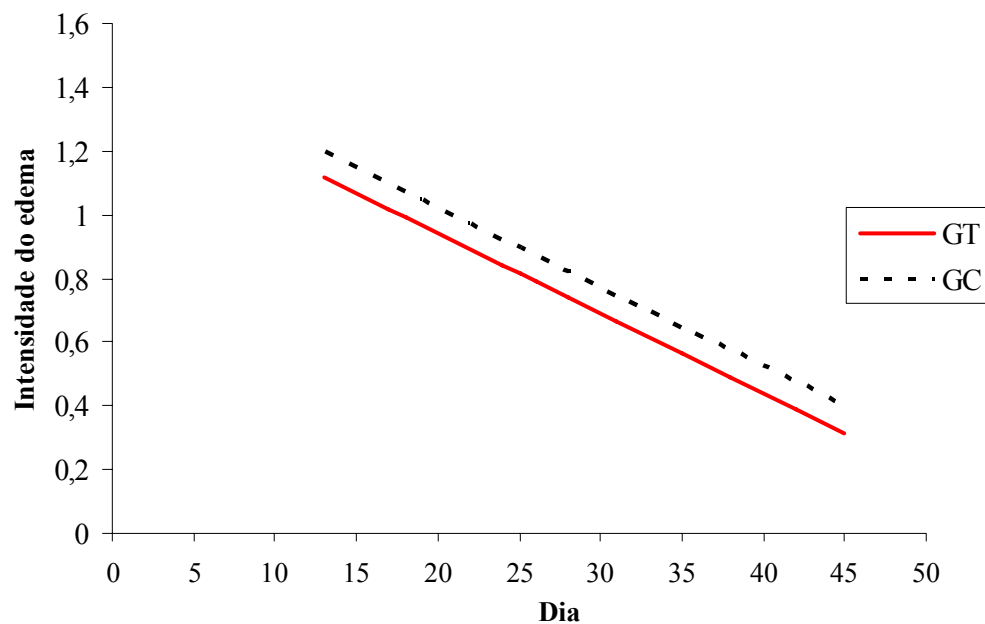


Figura 12 - Estimativas do grau de intensidade do edema (de 0 a 3) nos grupos tratado (GT) e controle (GC), em função do tempo de avaliação.

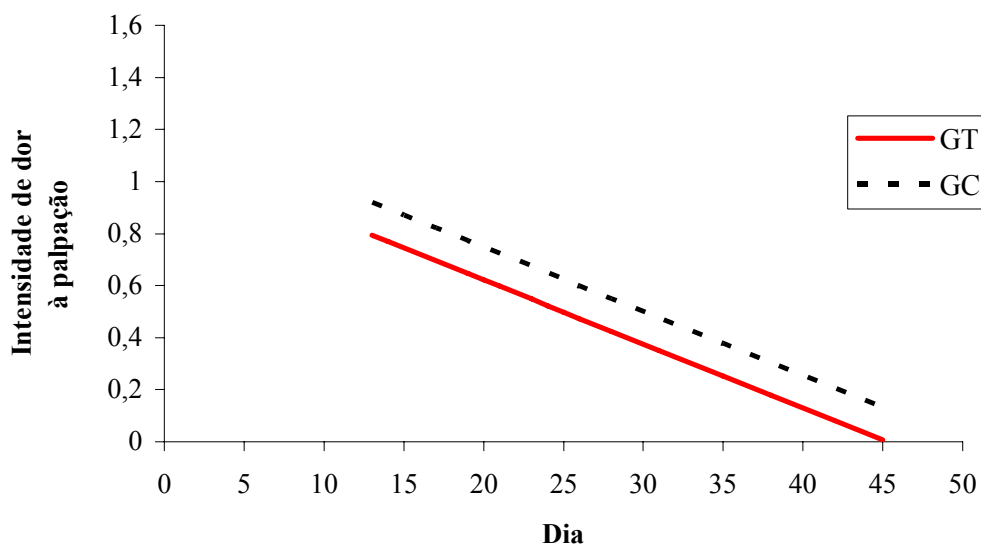


Figura 13 - Estimativas do grau de intensidade da dor à palpação (de 0 a 3) nos grupos tratado (GT) e controle (GC), em função do tempo de avaliação.

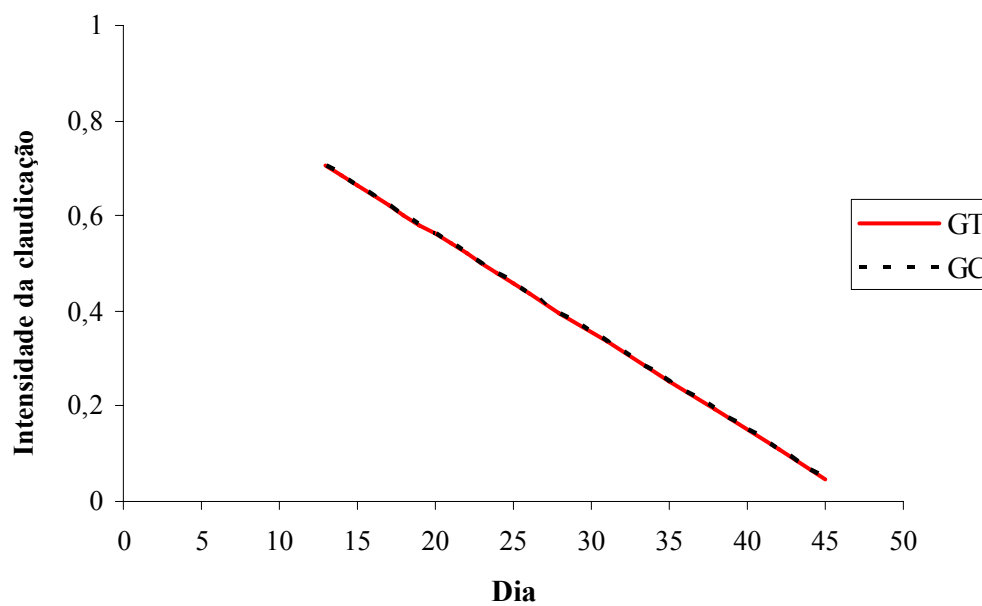


Figura 14 - Estimativas do grau de claudicação (de 0 a 5) nos grupos tratado (GT) e controle (GC), em função do tempo de avaliação.

Tabela 5 - Equações de regressão das variáveis clínicas estimadas em função do grupo (G) e do tempo (T) de avaliação após o tratamento em dias.

Variável clínica	Equações de regressão	R ² (%)
Edema	$\hat{Y} = 1,52155 - 0,024927 * T - 0,08333 * G$	80,9
Dor à palpação	$\hat{Y} = 1,23835 - 0,024594 * T - 0,12500 * G$	73,3
Aumento de temperatura	$\hat{Y} = 0,7129 - 0,021697 * T$	33,0
Claudicação	$\hat{Y} = 0,97234 - 0,020556 * T$	71,3

*Significativo pelo teste t (P<0,05); G=0 (GC) e G=1 (GT).

Os valores mínimos, máximos e médios das variáveis hematológicas avaliadas semanalmente até o término da fase experimental estão apresentados na Tabela 6. Observa-se que os valores médios do hematócrito, PPT, leucócitos totais, fibrinogênio e plaquetas variaram de 28,4 a 33,3%, 7,1 a 7,6 g.dL⁻¹, 6.557 a 10.057 células.μL⁻¹, 0,2 a 0,3 g.dL⁻¹ e 159.857 a 202.142 μL⁻¹, respectivamente. Uma vez iniciado o experimento, a contagem diferencial dos leucócitos revelou valores de neutrófilos variando de 2.480 a 6.222 células.μL⁻¹, sendo inferiores aos obtidos na fase pré-experimental (4.408 a 8.500 células.μL⁻¹).

Tabela 6 - Valores das variáveis hematológicas (hematócrito, proteína plasmática total, leucócitos totais, fibrinogênio e plaquetas) obtidos durante a fase experimental, nos equinos estudados.

Equinos	Hematócrito (%)	PPT (g dL ⁻¹)	Leucócitos T. (células μL ⁻¹)	Fibrinogênio (g dL ⁻¹)	Plaquetas (μL ⁻¹)
	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	25,6-35,0	7,0-8,0	6.000-13.200	0,1-0,4	117.000-226.000
	(31,5 ± 2,9)	(7,6 ± 0,3)	(9.128 ± 2.482)	(0,2 ± 0,1)	(174.571 ± 38.191)
II	29-35,0	6,4-7,6	8.300-14.500	0,2-0,5	130.000-280.000
	(32,7 ± 2,5)	(7,2 ± 0,4)	(9.900 ± 2.118)	(0,3 ± 0,1)	(159.857 ± 8.306)
III	27,0-37,0	7,2-8,0	4.900-9.000	0,1-0,4	150.000-249.000
	(32,5 ± 3,6)	(7,6 ± 0,29)	(6.557 ± 1.642)	(0,2 ± 0,1)	(202.142 ± 30.678)
IV	25,0-39,0	7,0-8,0	5.400-14.300	0,1-0,5	105.000-220.000
	(31 ± 4,6)	(7,5 ± 0,34)	(10.057 ± 2.837)	(0,3 ± 0,2)	(171.857 ± 43.287)
V	26,0-33,0	7,1-7,6	5.000-10.800	0,1-0,8	120.000-230.000
	(28,4 ± 2,37)	(7,3 ± 0,2)	(7.485 ± 2.138)	(0,3 ± 0,2)	(173.857 ± 47.827)
VI	30,0-37,0	6,9-7,6	5.000-16.600	0,1-0,8	110.000-230.000
	(33,3 ± 2,57)	(7,1 ± 0,2)	(8.857 ± 3.992)	(0,3 ± 0,2)	(172.571 ± 42.149)

PPT: proteínas plasmáticas totais; T: totais; Mín: mínimo; Máx: máximo; s: desvio padrão.

4.3. Avaliação ultra-sonográfica

Todas as avaliações ultra-sonográficas foram realizadas com o membro dos animais bem apoiados, permitindo boa distribuição do peso e, conseqüentemente, a obtenção de imagens de qualidade, tanto no plano transversal como no longitudinal.

O uso do distanciador proporcionou boa individualização do TFDS, particularmente nas imagens obtidas no plano transversal.

Nas avaliações realizadas previamente ao tratamento (dias 0, 3, 7 e 12), os achados mais importantes nos tendões direito e esquerdo foram a presença de edema peritendíneo após 48 horas da indução da tendinite (Figura 15), a perda do perfeito paralelismo das fibras colágenas e a visualização inicial da lesão mediante a perda de ecogenicidade no 7^o dia, com melhor delimitação no 12^o dia.

Nessa etapa previamente ao tratamento, os valores médios da área transversal do TFDS (ATT) variaram entre $1,34 \pm 0,29$ e $1,46 \pm 0,37$ cm² no TFDS direito e entre $1,29 \pm 0,22$ e $1,38 \pm 0,27$ cm² no TFDS esquerdo. Comparando com o tempo zero, a ATT direito (GT) aumentou em 8,95% até o 7^o dia, retornando a dimensão semelhante à fase pré-experimental (dia zero) no 12^o dia. Por outro lado, não houve aumento na ATT esquerdo (GC), mas apenas redução em 6,5% da área ao se comparar os valores obtidos nos dias zero e 12.

Os valores médios da área transversal da lesão (ATL) foram os mesmos no 7^o e 12^o dias, sendo de $0,16 \pm 0,06$ cm² no tendão direito (GT), com valores percentuais em relação à área transversal do tendão de 10,95 e 11,94% no 7^o e 12^o dias, respectivamente. No TFDS esquerdo (GC), a área transversal da lesão apresentou valores médios de $0,15 \pm 0,08$ cm² no 7^o dia e de $0,16 \pm 0,04$ cm² no 12^o dia, com valores percentuais de 11,45 e de 12,40%, para estes respectivos dias.

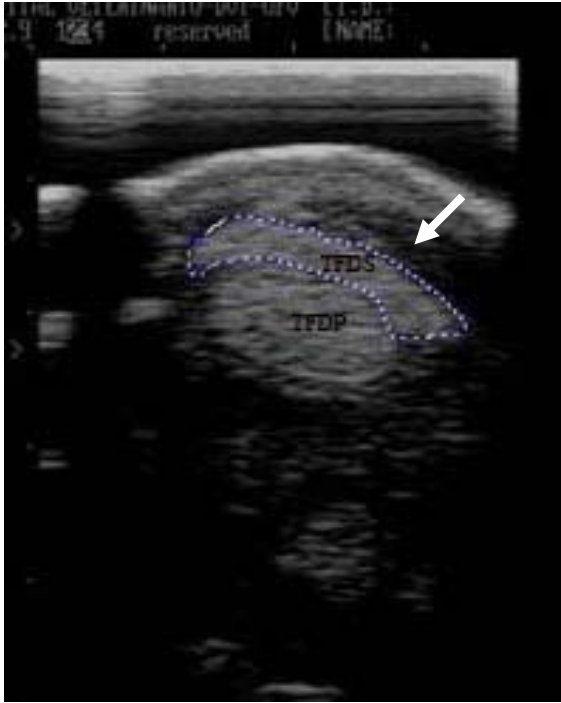


Figura 15 – Imagem ultra-sonográfica em plano transversal mostrando os tendões dos músculos flexores digitais superficial (TFDS) e profundo (TFDP), com evidência de edema peritendíneo intenso (seta) no membro torácico direito do animal IV, 48 horas da indução a tendinite.

A perda da ecogenicidade variou entre 50 e 75% do padrão ecóico, e a intensidade da lesão foi discreta, segundo a classificação de GENOVESE et al. (1986) e GENOVESE & RANTANEN (1998), respectivamente.

O perfeito paralelismo das fibras colágenas observado nos cortes longitudinais no dia zero (antes da indução da tendinite) foi perdido no 3^o dia, sendo assim classificado inicialmente entre discreto e parcial (grau 1 a 2, ALVES et al., 2001) e, posteriormente, como parcial (Figura 16) em ambos os grupos até o 12^o dia.

Nas avaliações realizadas após o tratamento (dias 14, 21, 28, 35 e 42), a única variável que diferiu ($P < 0,05$) entre o GC e o GT foi a área transversal da lesão (ATL) (Figura 17), com menores valores médios no GT. Já a redução ($P < 0,05$) em função do tempo foi observada tanto para a ATL como para o grau de ecogenicidade da lesão em ambos os grupos, conforme demonstrado nas Figuras 18 e 19. O mesmo comportamento não ($P > 0,05$) foi verificado nas demais variáveis ultra-sonográficas (ATT e paralelismo das fibras colágenas) em estudo.

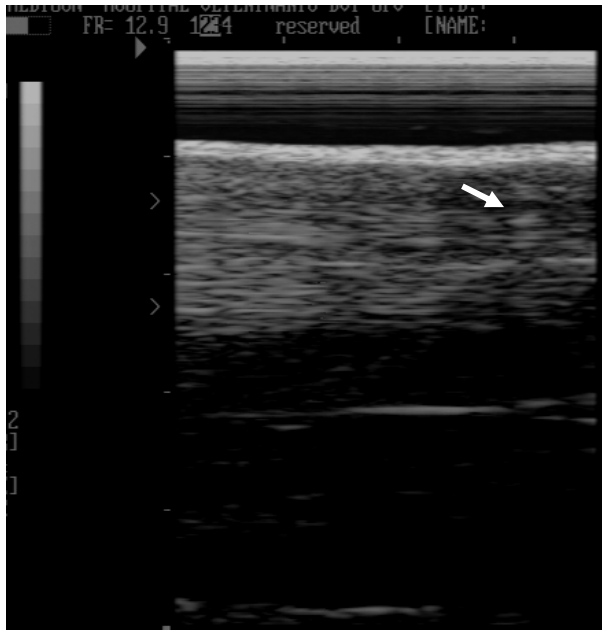


Figura 16 – Imagem ultra-sonográfica em plano longitudinal, evidenciando paralelismo das fibras colágenas em grau 2 (seta), no membro torácico direito do animal VI, após sete dias da indução da tendinite.

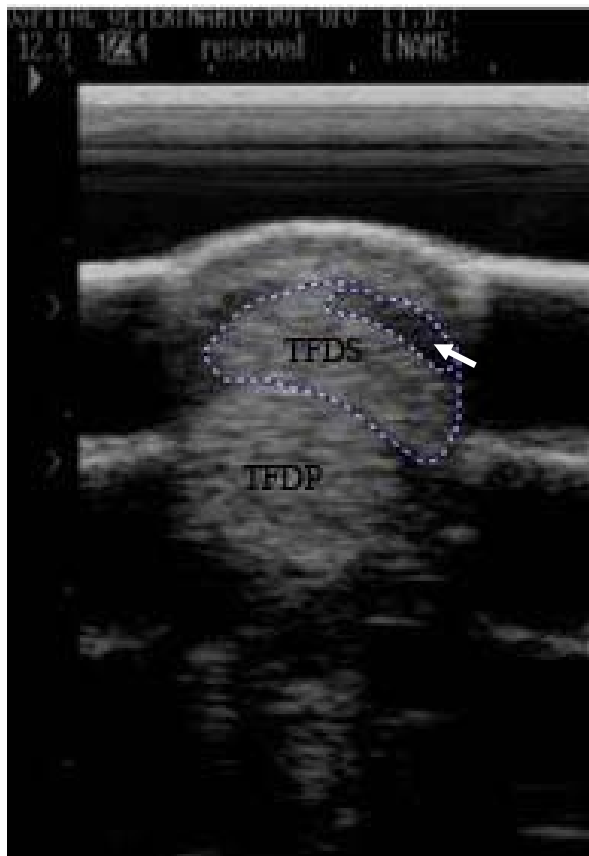


Figura 17 – Imagem ultra-sonográfica em plano transversal mostrando os tendões dos músculos flexores digitais superficial (TFDS) e profundo (TFDP), evidenciando a área transversal da lesão (seta) no membro torácico esquerdo do animal III (21º dia).

Após o tratamento, a intensidade da lesão, baseada no percentual da ATL, continuou sendo classificada como discreta (1 a 15% da ATT) em ambos os grupos até a última avaliação ultra-sonográfica (42º dia).

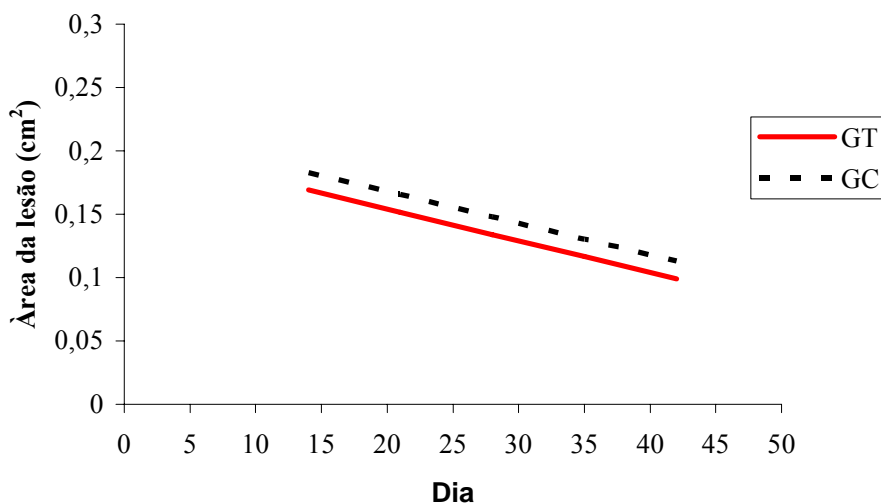


Figura 18 - Estimativas da área da lesão nos grupos tratado (GT) e controle (GC) após o tratamento, em função do tempo de avaliação.

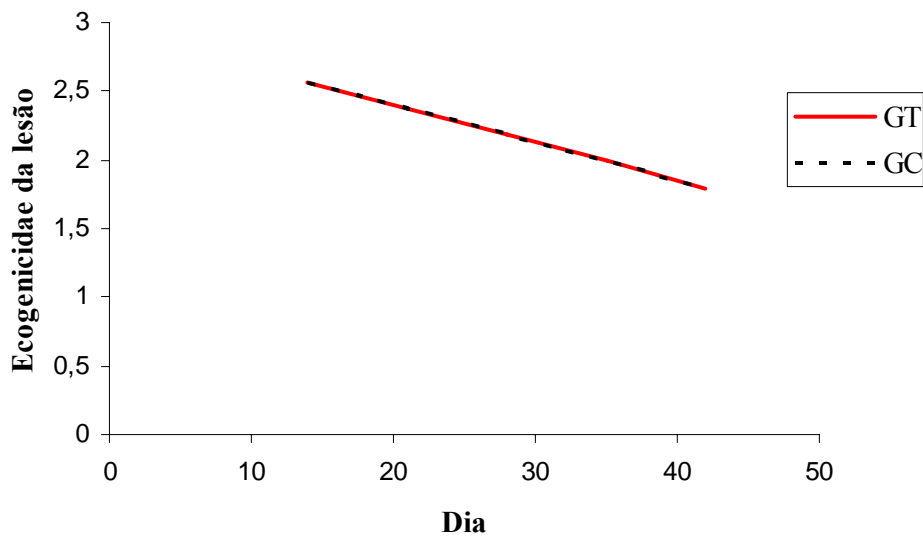


Figura 19 - Estimativas do grau de ecogenicidade da lesão (0 a 4) nos grupos tratado (GT) e controle (GC) após o tratamento, em função do tempo de avaliação.

Em ambos os grupos a ecogenicidade da lesão manteve-se hipoecóica, com perdas entre 25% e 75% (grau 1 a 3, GENOVESE et al., 1986) durante os diferentes momentos de avaliação pós-tratamento, mas sem diferenças ($P>0,05$) entre os grupos.

Nas avaliações realizadas após o tratamento com PRP ou administração intratendínea de solução salina a 0,9% (entre o 14^o e o 42^o dias), os valores médios da área transversal do tendão variaram de $1,24 \pm 0,10$ a $1,53 \pm 0,15$ cm² no GT e de $1,34 \pm 0,18$ a $1,56 \pm 0,16$ cm² no GC, sem que diferenças ($P>0,05$) fossem observadas entre os grupos.

Durante esse mesmo período de avaliação ultra-sonográfica, o paralelismo das fibras colágenas manteve-se parcial, ou seja, no grau 2 da classificação de ALVES et al. (2001). Não houve diferenças ($P>0,05$) entre grupos.

As equações de regressão utilizadas para a construção das Figuras 18 e 19 estão apresentadas na Tabela 7. Nota-se a influência do tempo na redução das variáveis, assim como a diferença ($P<0,05$), já mencionada anteriormente, com relação à área transversal da lesão, de acordo com o grupo.

Tabela 7 - Equações de regressão das variáveis ultra-sonográficas, área transversal da lesão e ecogenicidade da lesão estimadas em função do grupo (G) e tempo (T) de avaliação após o tratamento em dias.

Variável	Equações de regressão	R ² (%)
Área transversal da lesão	$\hat{Y} = 0,218000 - 0,014000 * G - 0,0025000 * T$	93,3
Ecogenicidade da lesão	$\hat{Y} = 2,9530 - 0,027500 * T$	65,0

*Significativo pelo teste t ($P<0,05$); G=0 (GC) e G=1 (GT).

4.4. Avaliações macroscópica e histopatológica

Durante a realização da biópsia no 48^o dia, foram observadas perda do brilho dos tendões e presença de aderências entre o TFDS e o paratendão (Figura 20a) em quatro membros do GC e em dois do GT. Adicionalmente, um dos animais do GC apresentou aderências entre os tendões dos músculos flexores digital superficial e profundo (Figura 20b). Nenhum tendão mostrou sinais de infecção (exsudação serossanguinolenta ou purulenta) no local ou próximo à lesão.

Após o procedimento cirúrgico e recuperação anestésica, todos os animais mantiveram-se em estação. Depois da retirada da bandagem (com 24 horas), foi

constatada a presença de edema local, dor à palpação e intenso aumento de temperatura, bem como claudicação (graus 2 a 4).

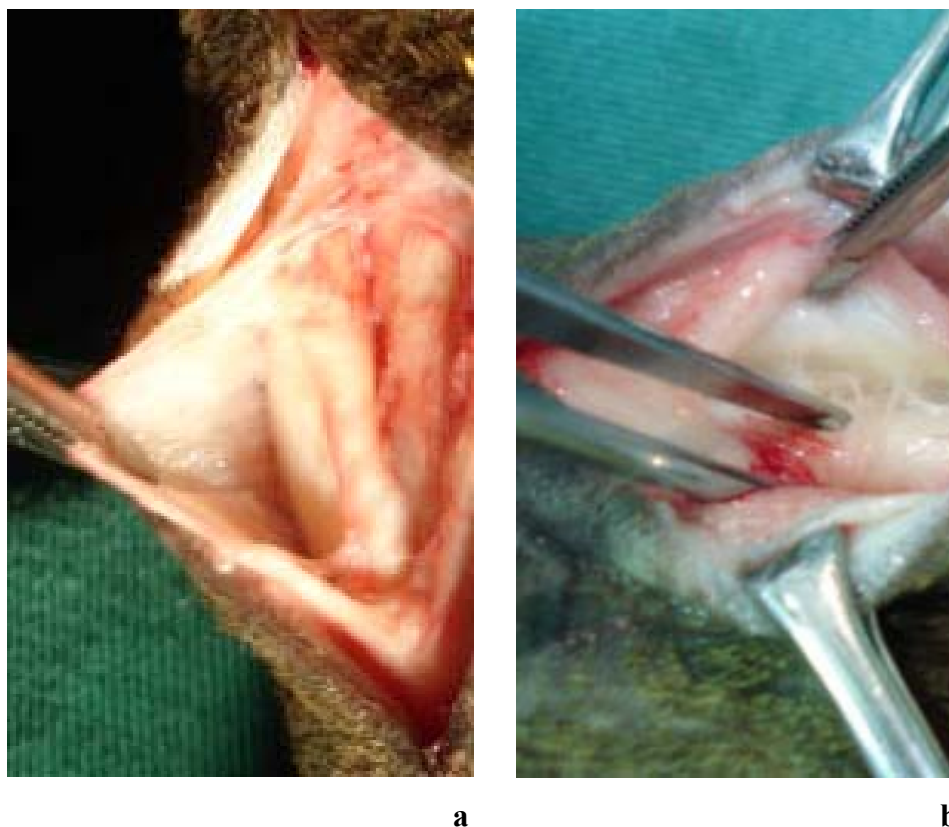


Figura 20 - a. Aderências do tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS) com o paratendão, presente no animal IV do GC. b. Aderências do TFDS com o tendão do músculo flexor digital profundo (GC - animal IV).

A análise qualitativa dos cortes histológicos corados com HE é apresentada na Tabela 8. Observa-se no GT, que a atividade fibroblástica foi classificada entre moderada a intensa, a neovascularização em moderada, o infiltrado inflamatório perivascular entre discreto e moderado e a organização tecidual em moderada. No GC, atividade fibroblástica se apresentou de forma intensa, a neovascularização entre moderada e intensa, o infiltrado inflamatório perivascular entre discreto a moderado e a organização tecidual de discreta a moderada.

Septos conjuntivos hipertrofiados estiveram presentes em ambos os grupos. Entretanto, foi possível evidenciar a melhor disposição e linearidade das fibras colágenas e dos fibroblastos no GT em comparação com o GC. Por outro lado, diferenças ($P < 0,05$) entre os grupos foram observadas somente em relação à atividade fibroblástica e organização tecidual, com menor intensidade no GT. Nas Figuras 21, 22 e 23 estão ilustradas a atividade fibroblástica, a neovascularização e a organização tecidual, bem como a presença de infiltrado inflamatório perivascular.

Tabela 8 - Medianas das intensidades das variáveis (atividade fibroblástica, neovascularização, infiltrado inflamatório e organização tecidual) e suas respectivas caracterizações durante avaliação histopatológica qualitativa nos grupos controle (GC) e tratado (GT) no 48^o dia do experimento.

Variáveis	Grupos	
	GC	GT
Atividade Fibroblástica Características dos fibroblastos	3,0a Predomínio de fibroblastos arredondados, com alguns alongados.	2,5b Predomínio de fibroblastos alongados, mas com alguns arredondados.
Neovascularização Características dos vasos sanguíneos	2,5a Presença de vasos com lúmen de diferentes diâmetros, localizados principalmente nos septos conjuntivos.	2,0a Presença de vasos com lúmen de diferentes diâmetros, localizados principalmente nos septos conjuntivos.
Infiltrado inflamatório Características do infiltrado	1,5a Presença de linfócitos e plasmócitos perivascularares.	1,5a Presença de linfócitos e plasmócitos perivascularares.
Organização tecidual Característica do tecido	1,5a Fibras colágenas e fibroblastos dispostos de forma mais irregular e septos conjuntivos hipertrofiados.	2,0b Fibras colágenas e fibroblastos dispostos de forma mais regulares e septos conjuntivos hipertrofiados.

Classificação da intensidade = 0: ausente, 1: discreta, 2: moderada, 3: intensa. Medianas seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha, não se diferem ($P > 0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

O exame histopatológico de cinco membros do GC (83,3%) e dois do GT (33,3%) nas lâminas coradas com HE revelaram focos hemorrágicos (Figura 24) localizados predominantemente nos septos conjuntivos, além de metaplasia condrocítica em estágio inicial no MTE (GC) do animal III (Figura 25).

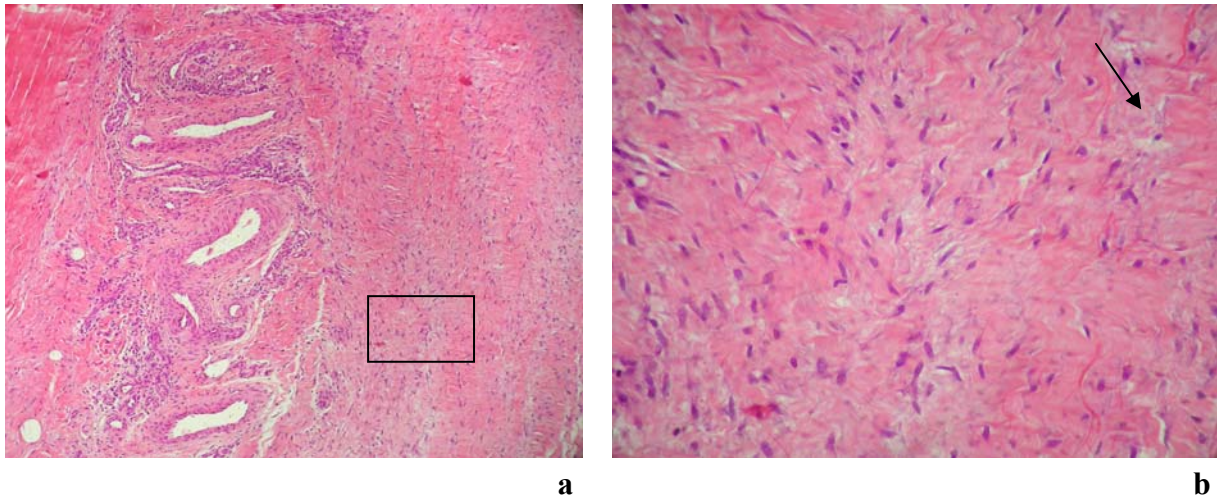


Figura 21 - Fotomicroscopia de luz do GC (animal I): a) nota-se atividade fibroblástica e neovascularização intensa (24x) (detalhe) e b) fibras colágenas e fibroblastos com diferentes tamanhos e formas dispostas aleatoriamente, além da presença de substância fundamental amorfa (seta) (70x). HE.

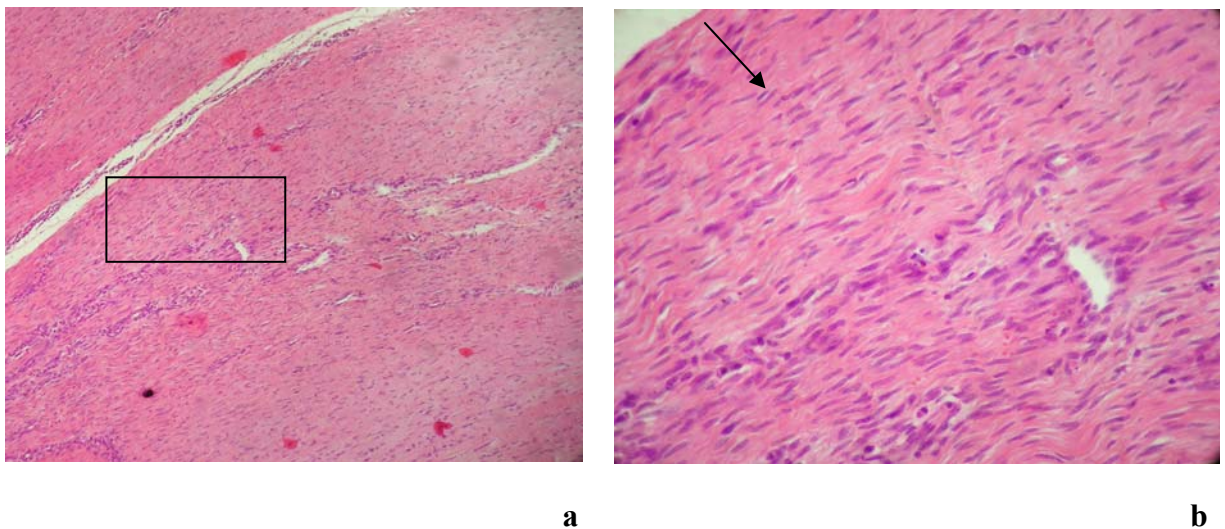


Figura 22- Fotomicroscopia de luz do GT (animal I): a) atividade fibroblástica intensa e neovascularização (24x) (detalhe) e b) fibras colágenas e fibroblastos predominantemente alongados, dispostos de forma mais regular (seta) (70x). HE.

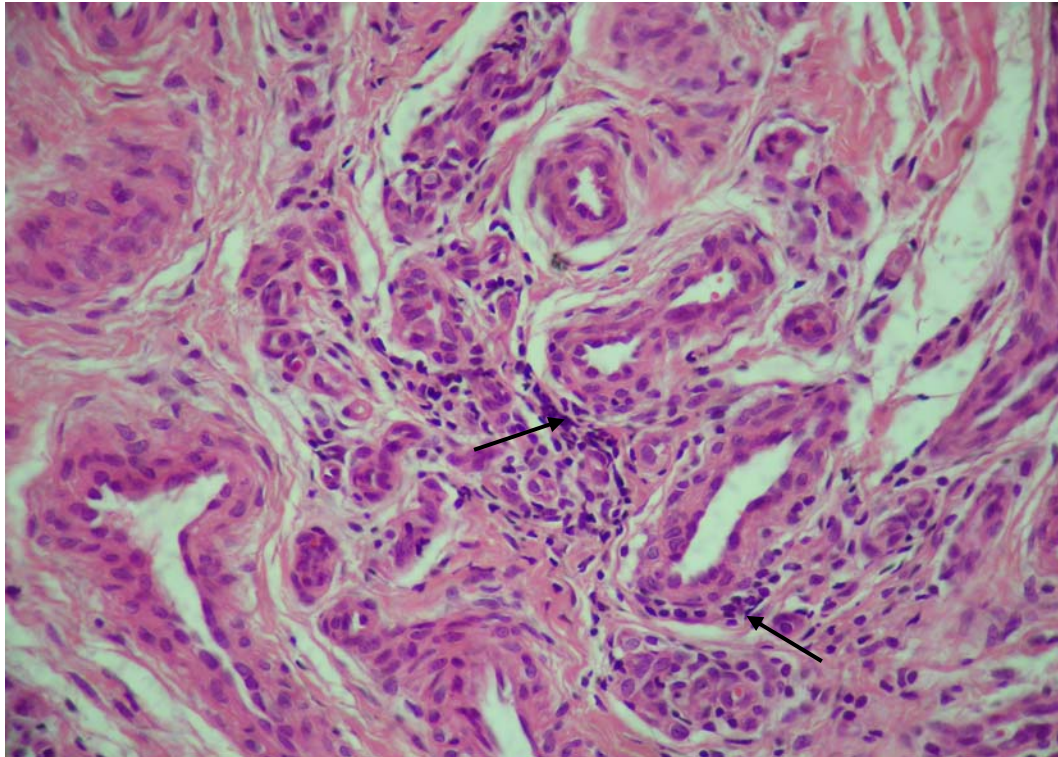


Figura 23 - Fotomicroscopia de luz do GC (animal I): neovascularização intensa e presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular (setas) (180x). HE.

A coloração Tricrômico de Masson proporcionou boa individualização das fibras, permitindo fácil observação da neovascularização (Figura 26) em ambos os grupos.

A análise qualitativa dos cortes histológicos pelo método histoquímico Picrosirius Red permitiu a identificação da presença de colágeno do tipo I (cor amarela ou vermelha) e tipo III (fibras reticulares, cor verde), bem como verificação da disposição e organização das fibras colágenas por meio da microscopia de luz polarizada em ambos os grupos (Figuras 27). No GT, os feixes de fibras colágenas apresentaram melhor orientação, mas em alguns campos foram evidenciadas áreas de desorganização tecidual, caracterizadas por disposição aleatória das fibras colágenas. No GC, embora tenha predominado a disposição aleatória das fibras colágenas, em alguns campos foi possível observar regiões com organização das mesmas.

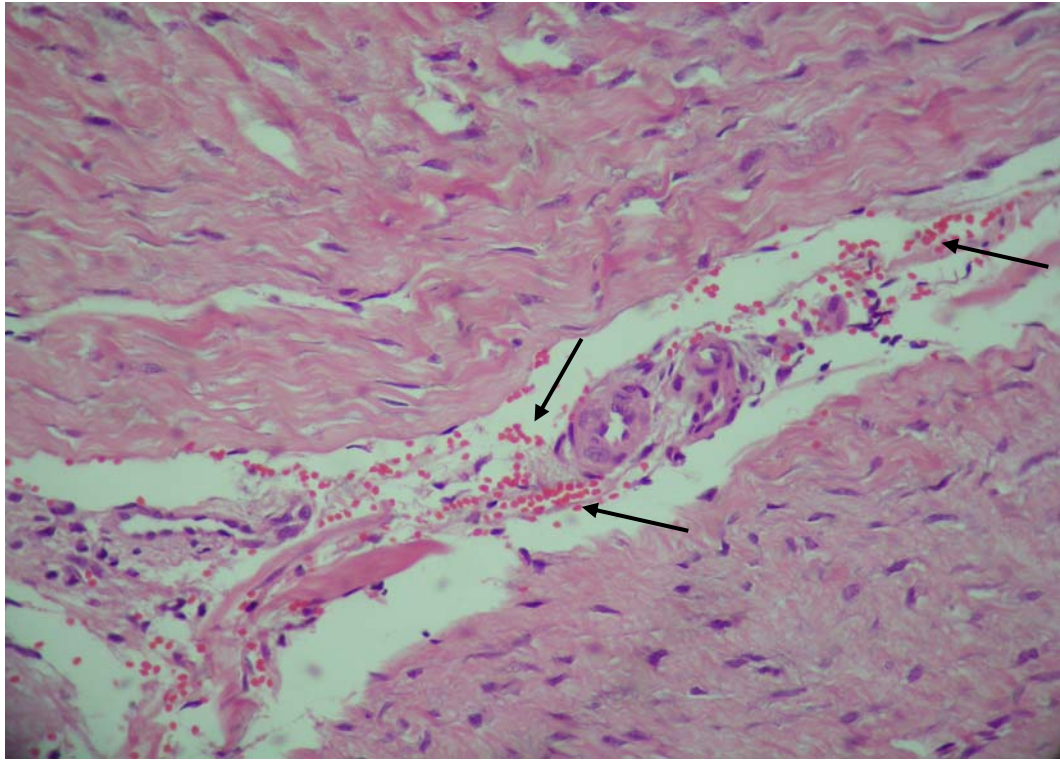
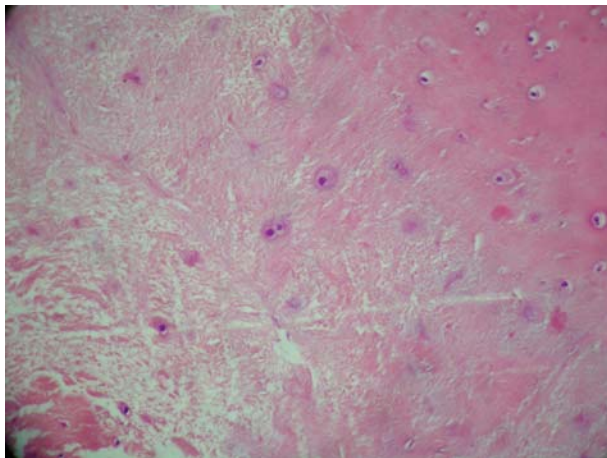
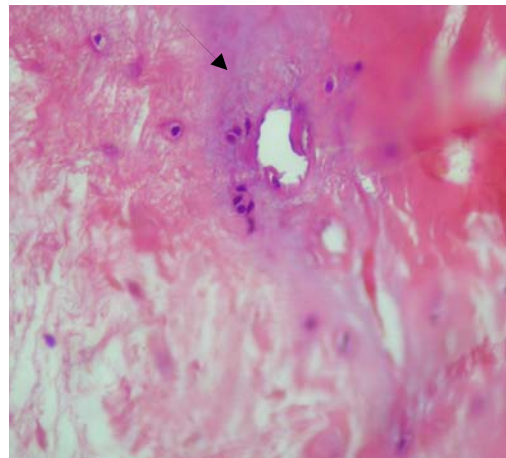


Figura 24 - Fotomicroscopia de luz do GC (animal V): focos hemorrágicos (setas) (171x). HE.



a



b

Figura 25 - Fotomicroscopia de luz do GC (animal III): a) metaplasia condrocítica, com células condróides em diferentes estágios e b) matriz com mucopolissacarídeo (seta), circundada por células condróides (53,14x). HE.

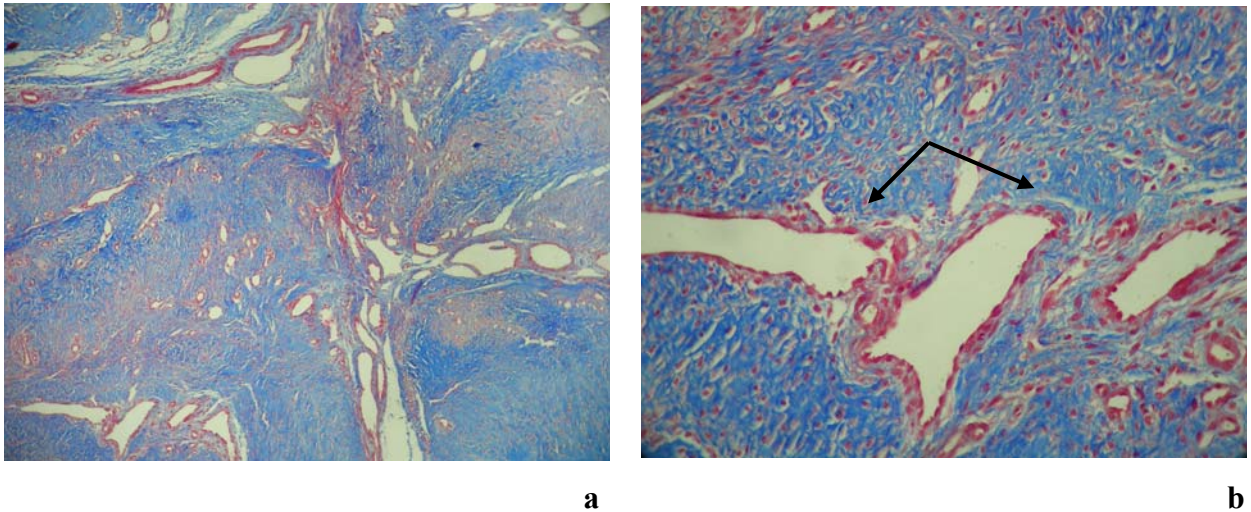


Figura 26 - Fotomicroscopia de luz do GT (animal V): a) fibras colágenas coradas em azul, com intensa neovascularização e presença de vasos sanguíneos com lúmen de diferentes diâmetros (16x) e b) veias (setas) (64x). Tricrômio de Masson.

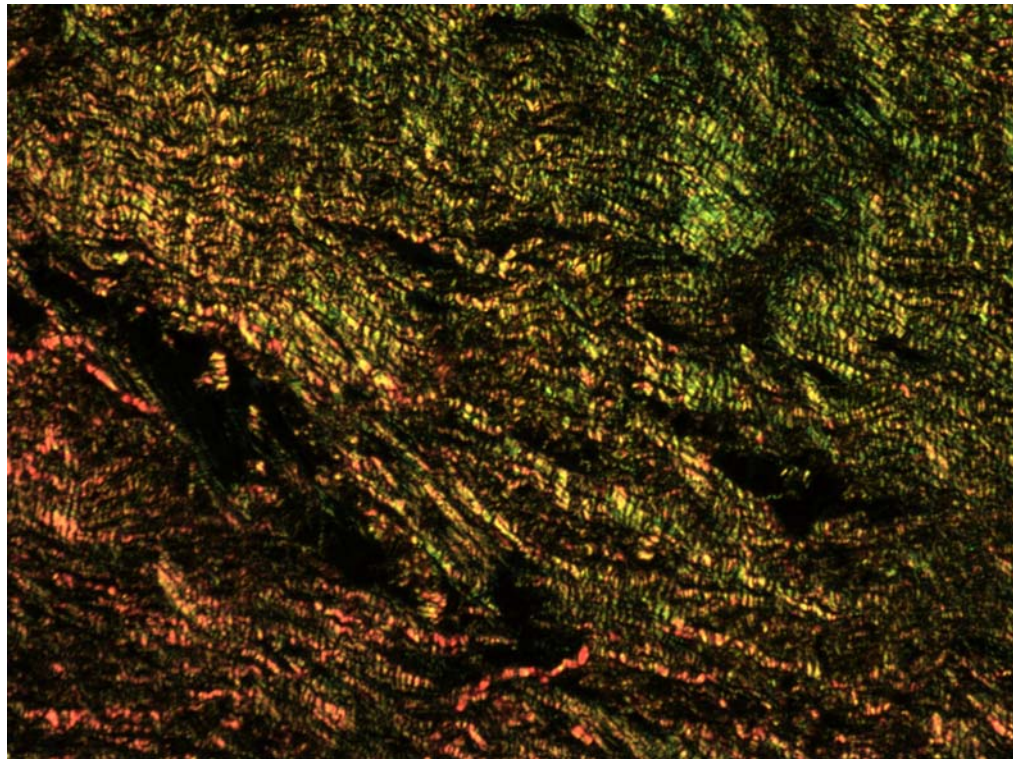


Figura 27 - Fotomicroscopia em luz polarizada do GC (animal IV). Nota-se disposição aleatória das fibras colágenas, assim como presença de colágenos dos tipos I (amarelo ou vermelho) e III (verde) (10x). Picrosirius Red.

A análise quantitativa do número de fibroblastos e vasos sanguíneos, realizada na região da lesão, revelou no GT valores médios de $44,3 \pm 26,7$ fibroblastos mm^2 e $7,3 \pm 6,0$ vasos sanguíneos mm^2 . Já no GC, esses valores foram de $66,6 \pm 34,5$ e $7,2 \pm 4,4$ mm^2 para os fibroblastos e vasos sanguíneos, respectivamente. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os grupos em relação a essas variáveis.

5. DISCUSSÃO

5.1. Plasma rico em plaquetas (PRP)

As pequenas adaptações no protocolo para obtenção do PRP realizadas em experimentos-piloto antes do início do estudo permitiram a obtenção de concentrações plaquetárias médias superiores às de CARMONA (2006).

O processamento para obtenção do PRP foi fácil, porém trabalhoso. A concentração de plaquetas no sangue total antes da obtenção do PRP estava dentro dos níveis fisiológicos preconizados para eqüinos por SCHALM et al. (1975), que é de 100.000 a 350.000 plaquetas. μL^{-1} . Com base nesses achados, nenhum dos animais apresentou trombocitopenia, o que na opinião de BARBOSA et al. (2006) seria um fator limitante para obtenção de concentrações adequadas de plaquetas no PRP. Por outro lado, ainda que a concentração de plaquetas seja importante para o PRP, o fundamental é a quantidade de fatores de crescimento liberados a partir da ativação das mesmas. Essa assertiva está de acordo com os resultados obtidos por ARGUELES et al. (2008), que embora tenham obtido no PRP concentrações médias inferiores (250.000 plaqueta. μL^{-1}) às de CARTER et al. (2003) (490.000 plaquetas. μL^{-1}), as quantidades de TGF- β foram maiores.

A concentração média de plaquetas (407.500 ± 58.800) no PRP foi superior à de alguns estudos recentemente realizados em eqüinos (CARMONA et al., 2007; SCHNABEL et al., 2007; ARGUELES et al., 2008) e ao valor mínimo de 300.000 plaquetas. μL^{-1} , preconizado por ANITUA et al. (2004) para o preparo do PRP. Entretanto, esses valores médios foram inferiores aos encontrados por CARTER et al. (2003) e SUTTER et al. (2004), que obtiveram, respectivamente, concentrações médias de 490.000 e 855.000 plaquetas. μL^{-1} , como mencionado anteriormente. Diferenças na concentração de plaquetas no PRP entre diferentes espécies vêm sendo relatadas (FERRAZ et al., 2006; MISHRA & PAVELKO, 2006; ANDRADE et al., 2008; ARGUELES et al., 2008; KAJIKAWA et al., 2008), o que dificulta a definição de um valor mínimo necessário para o seu preparo. Essas diferenças podem ser atribuídas à quantidade de plaquetas presente no sangue total, 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.

No presente estudo, a consistência do PRP obtida após ativação proporcionou fácil aplicação intratendínea, podendo ser utilizada no tratamento de outros tecidos moles.

5.2. Avaliações clínica e laboratorial

A administração intratendínea de colagenase demonstrou ser um modelo eficaz para o estudo de tendinite do TFDS, por mimetizar características semelhantes às lesões observadas naturalmente. Os sinais clínicos (edema, dor à palpação, aumento de temperatura e claudicação) observados após a indução da tendinite foram atribuídos à ação da colagenase, que, segundo WILLIAMS et al. (1984), provoca rápida dissolução das fibras colágenas, necrose celular, hemorragia e inflamação. Essas informações referentes à ação da colagenase justificam a ocorrência dos sinais clínicos observados não apenas no presente estudo, mas também em outros que utilizaram doses de 1,25 mg (MACHADO et al., 2000; ALVES et al., 2001; FERNANDES et al., 2003; BARREIRA 2005) e 2,5 mg (MARXEN et al., 2004) da colagenase para indução da tendinite no TFDS de eqüinos.

Os valores médios da TC, FC e FR mostraram-se dentro da faixa de referência para a espécie eqüina, que são, respectivamente, de 37,0 a 39,0 °C, 28 a 40 bpm (SPEIRS, 1999) e de 10 a 16 respirações/minuto (MASSONE, 2003). Entretanto, em alguns animais os valores mínimos e máximos dessas variáveis apresentaram-se discretamente acima ou abaixo dos fisiológicos. O aumento das FC e FR pode ser atribuído à excitação durante exame físico, acarretando aumento na liberação de adrenalina (COLES, 1984). Já os valores inferiores aos de referência, constatados para a FR e a TC podem ser decorrentes do horário de realização das avaliações, que ocorreram entre seis e sete horas da manhã, em que a temperatura ambiente estava naturalmente mais baixa. PALUDO et al. (2002), avaliando eqüinos de diferentes raças (N = 40) em diferentes horários do dia (6, 7:30, 14 e 14:30 horas), encontraram valores médios de FR menores ($15,32 \pm 3,96$) às seis horas da manhã. Os autores demonstraram influência da raça, temperatura ambiente e atividade física em variáveis clínicas (FC, FR e TC) e hematológicas (contagem total de hemácias, leucócitos totais, hematócrito, concentração de hemoglobina e proteína plasmática total) estudadas.

A persistência dos sinais clínicos (edema, dor à palpação, aumento de temperatura e claudicação) a partir do tratamento foi atribuída à lesão pré-existente e aos volumes de

PRP (GT) e solução salina (GC) infundidos, que podem ocasionar destruição mecânica de fibras colágenas imaturas, com conseqüente desenvolvimento de um novo foco de inflamação, conforme mencionado por MARXEN et al. (2004) em eqüinos tratados com glicosaminoglicano polissulfatados. Alterações clínicas locais, bem como claudicação, também foram relatadas por ALVES (1998) e BARREIRA (2005) após administração intratendínea de fumarato de β -aminopropionitrila e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

A presença dos sinais clínicos não inviabilizou o início da atividade física progressiva no 15^o dia. Segundo REEF (1998), a menos que a lesão seja intensa ou que a tendinite se manifeste na área do TFDS localizada no interior do canal cárpico ou nas suas inserções nas falanges proximal e média, alguns eqüinos podem não claudicar. Essa informação pode explicar a ausência de claudicação no animal III, bem como a intensidade [grau 1 a 2 (KESTER, 1991)] desse sinal clínico nos demais animais.

As variáveis clínicas, edema e dor à palpação, foram as únicas que, além de reduzirem ($P < 0,05$) ao longo do tempo após o tratamento, se mostraram menos intensas ($P < 0,05$) no GT. Em estudo recente realizado em cinco eqüinos, sendo dois acometidos com tendinite aguda do TFDS e três com desmíte proximal do ligamento suspensório, ARGUELLES et al. (2008) observaram, ao término do tratamento, que o PRP reduz o grau de claudicação. Todos os animais avaliados retornaram seis meses após o tratamento, a nível de desempenho anterior à lesão, não sendo observada recidiva após 20 meses. Em humanos com tendinite crônica, tratados com PRP, MISHRA & PAVELKO (2006) observaram redução ($P < 0,001$) da dor em 93% dos casos.

Os valores médios das variáveis hematológicas (hematócrito, proteína plasmática total, fibrinogênio, plaquetas e leucócitos totais) avaliadas durante a fase experimental apresentaram-se dentro da faixa de normalidade (SCHALM et al., 1975). Os valores máximos dos leucócitos totais estiveram dentro ou ligeiramente acima dos padrões de referência. Entretanto, experimento envolvendo eqüinos hípidos da raça Mangalarga Marchador demonstrou que os valores máximos podem chegar a $17.200 \text{ células } \mu\text{L}^{-1}$ (SOUZA et al., 2004).

A concentração do fibrinogênio plasmático está diretamente relacionada à gravidade de uma afecção. Nesse sentido, ocorrem elevações nos casos de inflamação intensa,

podendo se manter dentro dos valores de referência nas enfermidades menos graves (COLES, 1984). No presente estudo, apesar dos valores médios serem normais para equínos [(0,1 a 0,4 g dL⁻¹ (SCHALM et al., 1975; KANEKO et al., 1997)], inclusive criados em Viçosa (MG) e microrregião (SOUZA et al., 2004), os valores máximos em quatro animais excederam os padrões fisiológicos, particularmente nas duas primeiras semanas após o tratamento. Isso se deveu, possivelmente, ao foco inflamatório desenvolvido depois do tratamento, conforme mencionado na literatura (MARXEN et al., 2004). A elevação dessa variável coincidiu com a redução nos valores dos neutrófilos segmentados, considerados as primeiras células a deixarem os vasos sanguíneos e migrarem para o sítio da inflamação (PEREIRA, 2006).

5.3. Avaliação ultra-sonográfica

O quadro clínico apresentado pelos animais após a indução da tendinite e o tratamento com PRP não impossibilitou a avaliação ultra-sonográfica, já que durante o exame todos os animais permaneceram com os membros apoiados no solo, reduzindo a possibilidade de alteração no tamanho, na forma e na ecogenicidade dos tendões, bem como na produção de artefatos, conforme mencionado por outros autores (GENOVESE & RANTANEN, 1998; REEF, 1998).

O uso do distanciador para a avaliação ultra-sonográfica da região metacarpiana, permitiu boa delimitação e individualização do TFDS nos sonogramas obtidos. Segundo BILLER & MYER (1988), este acessório é importante no estudo de estruturas superficiais, até mesmo quando se utilizam transdutores de alta frequência, já que reduz ou impede a ocorrência de artefatos do tipo reverberação na imagem ultra-sonográfica.

As alterações ultra-sonográficas (edema peritendíneo e perda da ecogenicidade e do paralelismo linear das fibras colágenas) observadas até o 12^o dia de indução da tendinite, foram atribuídas à ação catabólica da colagenase sobre o tecido tendíneo. Esses achados corroboram com os de outros autores (FOLAND et al., 1992; ALVES et al., 2001, 2002; FERNANDES et al., 2003, MARXEN et al., 2004), que também observaram modificações nos sonogramas do TFDS após administração da enzima.

O edema peritendíneo intenso observado nos sonogramas 48 horas após indução da tendinite foi compatível com o aumento de volume observado na região metacárpica

durante as avaliações físicas. Segundo REEF (1998), esse achado pode desaparecer quando o processo inflamatório cessa, mas a evidência de tecido peritendíneo ecogênico é indicativo de inflamação persistente do tecido subcutâneo, com possibilidade de progressão para fibrose e desenvolvimento de aderências entre o tendão e as estruturas adjacentes, conforme constatado em 66,6% dos membros do GC (N = 4) e em 33,3% dos membros do GT (N = 2) durante a biópsia.

A perda da ecogenicidade (padrão hipocóico a anecóico) em lesões agudas do TFDS corresponde à presença de hemorragia, fibrinólise ou tecido de granulação inicial (MARR et al., 1993). Entretanto, a correlação de achados ultra-sonográficos associados a variação de tonalidade da cor cinza (ecogenicidade) com alterações histopatológicas foi questionada por CRASS et al. (1992), que encontraram imagens ultra-sonográficas que permaneceram alteradas ainda que a histopatologia demonstrasse realinhamento fibrilar adequado e completa cicatrização da lesão. Este achado foi posteriormente confirmado por van SCHIE et al. (1998) ao realizarem estudo quantificando os efeitos de variáveis associadas ao aparelho ultra-sonográfico, como configuração do ganho, posição e deslocamento do transdutor. Essas informações revelam alguns dos possíveis equívocos que o exame ultra-sonográfico pode ocasionar.

A área transversal da lesão (ATL) determinada mediante a alteração da ecogenicidade, somente foi possível de ser mensurada a partir do sétimo dia da indução da tendinite, conforme observado por ALVES et al. (2002) e MARXEN et al. (2004) em estudos com tendinite provocada pela colagenase em eqüinos. Entretanto, FERNANDES et al. (2003) e FOLAND et al. (1992) determinaram a lesão com 48 e 72 horas, respectivamente, de induzida a tendinite. GAUGHAN et al. (1995), constataram discreta perda da ecogenicidade em imagens obtidas no plano transversal e longitudinal do TFDS, após 48 horas da indução da tendinite. Esses estudos revelam que o tempo necessário para a delimitação das alterações no TFDS com tendinite provocada pela colagenase é variável. No presente estudo, embora a lesão tenha sido constatada no sétimo dia, a mensuração foi mais fácil no 12^o dia e nas avaliações subseqüentes.

A redução da ATL em membros tratados com PRP, conforme observado neste estudo entre o 14^o e o 42^o dias, também foi recentemente relatada por ARGUELES et al. (2008) em dois eqüinos com tendinite aguda do TFDS, submetidos a três tratamentos com

PRP a intervalos de duas semanas. Entretanto, o mesmo comportamento foi observado no GC, embora com maior ($P < 0,05$) área transversal da lesão em comparação com o GT.

A ocorrência de menor ($P < 0,05$) área da lesão no grupo tratado, conforme constatado no presente estudo, também foi observado por REDDING et al. (1999), estudando oito eqüinos da raça Puro Sangue Inglês com tendinite, que foram tratados ($N = 4$) com glicosaminoglicanos polissulfatados e avaliados durante oito semanas. A menor ATL observada no grupo tratado foi interpretada pelos autores como um significativo efeito do tratamento. Segundo REEF (1998), a diminuição dessa variável ultra-sonográfica é indicativa de cicatrização e remodelação.

Em um estudo com eqüinos ($N = 6$) tratados com hialuronato de sódio após 48 horas da indução da tendinite e a intervalos semanais até o 42º dia de iniciado o experimento, GAUGHAN et al. (1995) não observaram diferenças ($P > 0,05$) nos sonogramas das variáveis avaliadas (ATT, ATL e arquitetura da lesão) entre os grupos tratados e controle (solução salina). Adicionalmente, em outros estudos com o mesmo fármaco utilizando-se uma (SPURLOCK et al., 1989b) ou duas aplicações (FOLAND et al., 1992) intratendíneas, também não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nas variáveis ultra-sonográficas durante as seis semanas de avaliação.

A área transversal do tendão (ATT) pode revelar aumento ou diminuição no tamanho, dependendo do nível de treinamento e da raça do eqüino (HILLS, 1996), sendo o aumento de aproximadamente 20% sobre os valores de referência da raça, suficiente para suspeitar da presença de lesão (SMITH & WEBBON, 1994). No presente estudo, a ATT aumentou no MTD (GT) e reduziu no MTE (GC) após aplicação da collagenase, mas depois do tratamento não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) em relação ao tamanho dessa variável entre o GC e o GT, bem como alterações ($P > 0,05$) em função do tempo. FERNANDES (2001), estudando 18 eqüinos acometidos com tendinite induzida por collagenase, atribuiu o aumento da ATT observado em 88,88% dos animais à pressão intratendínea exercida pelo edema, que promove a separação dos feixes de fibras colágenas. Entretanto, nos animais que não apresentam aumento da ATT, o autor observou marcado edema peritendíneo, que foi atribuído ao extravasamento da collagenase a partir do TFDS, resultando em menor edema intratendíneo.

A não observação do paralelismo perfeito das fibras colágenas em ambos os grupos ao término do experimento foi atribuída ao período de avaliação ultra-sonográfica adotado no presente estudo para acompanhar a remodelação tendínea, que, segundo DAHLGREN (2007) se inicia seis semanas após a lesão e estende-se por seis a 12 meses ou mais, caracterizando-se pelo melhor alinhamento das fibras colágenas ao longo da linha de tensão e pela formação de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno, proporcionando importante resistência à tração. Nesse sentido, é possível que melhores resultados com relação ao paralelismo das fibras pudessem ser obtidos se os animais fossem avaliados por um período mais longo do que os 48 dias adotados neste estudo.

REEF et al. (1997), estudando 99 eqüinos com tendinite espontânea do TFDS com um a quatro meses de evolução, tratados com cinco aplicações de fumarato β -aminopropionitrila (doses de 3, 5, 7 ou 8 mg) por via intralesional, constataram melhora ($P < 0,05$) no alinhamento das fibras colágenas após 16 semanas de efetuado o tratamento utilizando as maiores doses do fármaco. Esses resultados reafirmam a necessidade de maior período de avaliação para a obtenção de melhores informações ultra-sonográficas sobre o paralelismo das fibras. Entretanto, o período de estudo adotado no presente experimento foi semelhante ao utilizado por outros autores (GAUGHAN et al., 1995; SPURLOCK et al., 1989b; MACHADO et al., 2000; FERNANDES et al., 2003 BARREIRA, 2005). Adicionalmente, foi objetivo desta pesquisa realizar avaliação histopatológica na fase de reparação da tendinite. Portanto, os animais tiveram que ser submetidos à biópsia.

5.4. Avaliações macroscópica e histopatológica

A ausência de sinais macroscópicos de infecção no local e regiões adjacentes à indução da tendinite demonstra a eficácia da anti-sepsia realizada durante as etapas prévias à biópsia tendínea.

As aderências peritendíneas observadas durante a biópsia (48 dias após o início do experimento) também foram relatadas em pôneis aos 60 dias após a indução da tendinite do TFDS (WILLIAMS et al., 1984). Em eqüinos também há relatos aos 84 (FOLAND et al., 1992) e aos 150 (ALVES, 1998; MARXEN et al., 2004) dias após a indução da lesão.

Segundo WILLIAMS et al. (1984), a ocorrência de aderências peritendíneas pode ser resultante da expansão do tecido cicatricial para os tecidos peritendíneos. Portanto, baseado nas informações desses autores, a menor evidência de aderências no GT em relação ao GC pode ser atribuída a uma reparação tecidual mais uniforme e organizada nos animais tratados com PRP.

No exame histopatológico, as colorações utilizadas para a avaliação do processo de cicatrização do tendão permitiram a análise satisfatória das variáveis. Os cortes histológicos corados por HE foram importantes na caracterização celular e avaliação da organização da matriz tendínea. As lâminas coradas com Picrosirius Red complementaram a análise qualitativa, particularmente em relação à avaliação das fibras colágenas.

Segundo MONTES & JUNQUEIRA (1991), o método de coloração Picrosirius Red promove o aumento da birrefringência, sendo assim específico para estruturas colagenosas compostas de moléculas agregadas e orientadas, além de possibilitar a identificação seletiva de diferentes tipos de colágeno pelo padrão de coloração. A identificação de fibras colágenas do tipo I em coloração amarela ou vermelha e as do tipo III em coloração verde em ambos os grupos sob luz polarizada está de acordo com o padrão de coloração mencionado pelos autores anteriores. O uso da microscopia de polarização tem sido relatado em trabalhos científicos com tendões de eqüinos (STRÖMBERG, 1977; GAUGHAN et al., 1995; ALVES, 1998; BIRCH et al., 1998; FERNANDES, 2001), embora o emprego da imunofluorescência também tenha sido descrito (WILLIAMS et al., 1980; WATKINS et al. 1985). Em estudo realizado com 20 eqüinos da raça Árabe, acometidos por lesões criadas cirurgicamente, WATKINS et al. (1985) observaram, aos 30 dias após tenectomia, presença de fibras colágenas dos tipos I e III dispostas aleatoriamente, além de colágenos dos tipos IV e V, com máxima intensidade de reação mediante observação pela técnica de imunofluorescência. Embora os colágenos dos tipos IV e V não tenham sido evidenciados no presente estudo, MONTES & JUNQUEIRA (1991) mencionam que o colágeno tipo IV pode apresentar característica amorfa e fracamente birrefringente na lâmina basal quando se utiliza a coloração de Picrosirius Red.

Em estudo recente *in vitro*, com fragmentos do TFDS de eqüinos, SCHNABEL et al. (2007) demonstraram que amostras cultivadas com 100% de PRP por um período de três

dias apresentaram, mediante realização da técnica de Reação Polimerásica em Cadeia (PCR) em tempo real, aumento da expressão de colágenos dos tipos I e III sem elevação concomitantemente da expressão de moléculas catabólicas, como as metaloproteinases dos tipos III e XIII.

A coloração pelo Tricrômico de Masson proporcionou boa individualização das fibras, permitindo fácil observação da neovascularização em ambos os grupos, conforme observado por PRADO et al. (2000) estudando a densidade vascular de tendões (N = 80) de cadáveres humanos. Embora as colorações tricrômicas promovam marcada coloração das fibras colágenas, outras estruturas que contenham colágeno, como as fibras reticulares e membranas basais, não são seletivamente coradas, sendo a intensidade da cor produzida insuficientemente para dar resolução a essas estruturas (HORTON, 1984).

A neovascularização observada em ambos os grupos, principalmente nos septos conjuntivos adjacentes, e as regiões de atividade fibroblástica são importante na reparação tendínea, tendo em vista a necessidade de infiltração de células provenientes da circulação para a cicatrização da lesão (FENWICK et al., 2002). Essa infiltração reduz com o passar do tempo. Em pesquisa recente, KAJIKAWA et al. (2008) demonstraram em ratos com lesão do tendão patelar, tratados com PRP, aumento ($P < 0,05$) de células derivadas da circulação após três a sete dias da lesão, quando comparado com o grupo controle. Esses resultados sugerem rápida ação do PRP nos primeiros dias após aplicação, demonstrando assim a necessidade de avaliação desta terapia em diferentes fases do processo de cicatrização.

A proliferação fibroblástica observada em ambos os grupos também foi relatada em pesquisas com tendinite induzida e tratadas com hialuronato de sódio (FOLAND et al., 1992), ultra-som terapêutico (FERNANDES et al., 2003), laserterapia (MACHADO et al., 2000) e *splitting* (ALVES et al., 2002). Entretanto, diferenças ($P < 0,05$) com relação ao número de fibroblastos, após comparação do grupo tratado com o controle somente foram observadas no estudo com *splitting* durante a biópsia realizada ao 60º dia, no qual foi constatado um menor número de fibroblastos no TFDS dos eqüinos tratados. Neste mesmo estudo, não foram observadas diferenças entre grupos ($P > 0,05$) nos animais biopsiados no 30º dia do experimento. De acordo com REDDING et al. (1999), a lesão no tendão cursa inicialmente com edema, hemorragia e acúmulo de exsudato, que, em pouco

tempo, é invadida por tecido de granulação e fibroblastos secretores de colágeno e matriz. Em detrimento dessa proliferação inicial, o tendão lesionado apresenta elevada proporção de células na matriz durante as etapas iniciais da cicatrização, mas com decréscimo do número de células nas fases de remodelação e maturação. Nesse sentido, a redução do número de fibroblastos durante o processo de cicatrização do tendão sugere maturidade do tecido cicatricial. No presente estudo, embora a avaliação qualitativa tenha revelado menor ($P < 0,05$) número de fibroblastos (atividade fibroblástica) no GT em relação ao GC, esse achado não foi confirmado durante a avaliação morfométrica (quantitativa), já que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos.

A observação de focos hemorrágicos no exame histopatológico do TFDS também foi relatada por outros autores (GAUGHAN et al., 1995; FERNANDES, 2001; BARREIRA, 2005) em período similar ao deste estudo. MARR et al. (1993), estudando 20 eqüinos, sendo 14 com tendinite bilateral do TFDS e seis hígidos da raça Puro Sangue Inglês, evidenciaram a presença de hemorragias recentes em tendões com dois, três e sete meses após a lesão, sendo esse achado atribuído à imaturidade e menor força tênsil do tecido cicatricial.

Segundo HATANAKA & CURI (2007), o tecido de granulação inicial é edematoso e caracterizado por muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exsudativos. Com base nas informações dos autores, a ocorrência de focos hemorrágicos em cinco tendões do GC (83,3%), pode ser sugestiva de imaturidade e fragilidade dos mesmos, tendo em vista que o tendão contralateral (GT) foi submetido às mesmas condições e estímulos. Adicionalmente, hemorragia foi constatada em apenas dois tendões (33,3%) do GT.

A melhor organização tecidual ($P < 0,05$) observada no GT também foi relatada precocemente em ratos ($N = 296$) tratados com uma única aplicação de PRP seis horas após remoção de fragmento (3 mm) do tendão calcâneo comum (ASPENBERG & VIRCHENKO, 2004). Nesse estudo os autores observaram que, no 21^o dia após a aplicação do PRP, o tecido cicatricial estava mais maduro ($P = 0,02$), com melhor organização e alinhamento das fibras colágenas, quando comparado com o grupo controle. Adicionalmente, testes mecânicos revelaram boa resistência do tecido neoformado, confirmando a maturidade tecidual revelada na histopatologia. Esses achados são

importantes e corroboram com os do presente estudo, pois demonstram a possibilidade de melhor organização tecidual proporcionada pela administração intratendínea de PRP.

Septos conjuntivos hipertrofiados observados em ambos os grupos deste estudo são compatíveis com a fase de reparação, que, na opinião de DAHLGREN (2007), são decorrentes do acúmulo de elementos celulares e vasculares, onde a vascularização pode funcionar como fonte de células progenitoras que migram para o local da lesão em resposta à liberação de fatores quimiotáticos. A presença de infiltrado inflamatório perivascular de intensidade discreta a moderada pode ser atribuída à permanência de células remanescentes que migraram para o tendão após a inflamação desenvolvida pela colagenase, bem como após o novo foco de inflamação gerado com administração intratendínea do PRP e da solução salina.

A presença de infiltrado perivascular no 48^o dia após indução da lesão corrobora os achados de SPURLOCK et al. (1989a) e GAUGHAM et al. (1995) no 42^o e 44^o dias após a administração da colagenase, respectivamente.

Alterações na morfologia dos fibroblastos de aspecto fusiforme para uma forma mais arredondada estão relacionadas com a regulação do metabolismo dessas células para produção da matriz extracelular (DAHLGREN, 2007). WILLIAMS et al. (1984), estudando a patogenia da tendinite em pôneis (N = 16) em período compreendido entre 24 horas e 14 meses após a indução da lesão, observaram a presença de fibroblastos com morfologia arredondada após uma semana e início do alongamento do seu núcleo após a 12^o semana. A partir das informações desses autores, pode-se supor uma possível aceleração do processo cicatricial no grupo tratado com PRP do presente estudo em comparação com o GC, tendo vista que no 48^o dia foi observada maior quantidade de fibroblastos alongados. Esse alongamento no núcleo de tipos celulares do tendão é indicativo de maturidade (WEBBON, 1978).

A metaplasia condrocítica observada no grupo controle (GC) do animal III também foi verificada em estudos com TFDS sadios (WEBBON, 1978) e lesionados (MARXEN et al., 2003). WEBBON (1978) observou essas alterações em animais velhos, o que explicaria, em parte, a ocorrência desse achado no animal III (12 anos). Entretanto, a morfologia dos condrócitos observados caracteriza um processo recente, não possibilitando assim descartar alguma participação dessas células na patogênese da

tendinite. Entretanto, mais estudos são necessários, até mesmo porque ALBERTS et al. (2006) mencionam a possibilidade de interconversão entre células do tecido conjuntivo.

6. CONCLUSÕES

1. A administração de 2,5 mL de PRP, em dose única, a uma concentração de 320.000 a 500.000 plaquetas. μL^{-1} , proporciona menor intensidade de variáveis clínicas (edema e dor à palpação) e, portanto, maior conforto e bem estar para o animal durante o período de recuperação da tendinite.
2. A exceção do fibrinogênio, variáveis hematológicas (hematócrito, proteína plasmática total, leucócitos totais e plaquetas) se mantêm dentro dos padrões de referência em eqüinos tratados com PRP.
3. O PRP promove maior redução da área da lesão, mensurada por ultra-sonografia.
4. Biópsia tendínea realizada 36 dias após aplicação do PRP revela reparação tecidual uniforme e organizada.
5. Variáveis clínicas (edema, dor à palpação, temperatura local e grau de claudicação) medidas no grupo controle também sofrem melhora ao longo do tempo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEDA, K.; AN, H.S.; PICHKA, R.; ATTAWIA, M.; THONAR, E.J.; LENZ, M.E.; UCHIDA, A.; MASUDA, K. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. **Spine**, v.31, n.9, p.959-966, 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 740p.

ALBERTS, B.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1463p.

ALVES, A.L.G. **Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada a atividade física na reparação tendínea de eqüinos após agressão pela collagenase na cicatrização tendínea eqüina. Avaliação ultra-sonográfica e morfológica**. Botucatu, SP: UNESP, 1998. 92p. Tese (Doutorado em Patologia) – Curso de Pós-graduação em Patologia, Universidade Estadual Paulista.

ALVES, A.L.G.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J. Tratamento cirúrgico *splitting* nas tendinites agudas experimentais em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.45-51, 2002

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; BORGES, A.S.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C.A. Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea eqüina. Avaliação clínica e ultra-sonográfica. **Revista de Educação Continuada. CRMV-SP**, v.4, n.1, p.19-27, 2001.

ANDRADE, M.G.S.; BRANDÃO, C.J.S.; SÁ, C.N.; BITTENCOURT.; T.C.B.S.C.; SADIGURSKY, M. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.105, n.1, p.5-12, 2008.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, n.1, p.4-15, 2004.

ANTONIADES, H.N.; WILLIAMS, L.T. Human platelet-derived growth factor; structure and functions. **Federation Proceedings**, v.42, n.9, p.2630-2634, 1983.

ARGUELLES, D.; CARMONA, J.U.; CLIMENT, F.; MUNÓZ, E.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, v.162, n.7, p.208-211, 2008.

ARGUELLES, D.; CARMONA, J.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Clinical experiences with platelet-rich plasma as a treatment of tendon and ligament injuries in the horse. **Proceedings**, European College of Veterinary Surgeons, 2005. p.217-222.

ARISTIZABAL.; F.A.M.; SOUZA, M.V.; ARANZALES.; J.R.M.; RIBEIRO JUNIOR, J.I. Valores biométricos obtidos por ultra-sonografia dos tendões flexores e ligamentos acessório inferior e suspensório da região metacárpica palmar de cavalos Mangalarga Marchador. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.156-162, 2005.

ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v.75, n.1, p.93-99, 2004.

BAMES, G.L.; KOSTELNUIK, P.J.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A. Growth factor regulation of fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, n.11, p.1805-1815, 1999.

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

BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R.J.; GOMES, B.N.; MONTEIRO, B.S. 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 mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica**. Botucatu, SP: UNESP, 2005. 86p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

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

BILLER, D.S.; MYER, W. Ultrasound scanning of superficial structures using an ultrasound standoff pad. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.29, n.3, p.138-142, 1988.

BIRCH, H.L.; BAILEY, A.J.; GOODSHIP, A.E. Macroscopic “degeneration” of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. **Equine Veterinary Journal**, v.30, n.6, p.534-539, 1998.

BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet activation. **Blood Reviews**, v.9, n.3, p.143-156, 1995.

CAETANO, V.M. **Tendinite dos tendões dos músculos flexores dos membros torácicos dos eqüinos (revisão de literatura)**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 60p. (Monografia) Universidade Federal de Viçosa.

CANALIS, E.; McCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, v.140, n.3, p.530-537, 1989.

CARMONA, J.U. **Use de autologous platelet concentrates for the treatment of muculoskeletal injuries in the horse**. Barcelona, SPA: UAB, 2006. 91p. Thesis (PhD) - Doctorado en Medicina y Sanidad Animales, Universitat Autonoma de Barcelona.

CARMONA, J.U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, p.167-170, 2007.

CARTER, C.A.; JOLLY, D.G.; WORDEN, C.E.; HENDREN, D.G.; KANE, C.J.M. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, n.3, p.244-255, 2003.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1984. 566p.

CRASS, J.R.; GENOVESE, R.L.; RENDER, J.A.; BELLON, E.M. Magnetic resonance, ultrasound and histopathologic correlation of acute and healing equine tendon injuries. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.33, n.4, p.206-216, 1992.

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

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

DEBUS, E.S.; SCHMIDT, K.; ZIEGLER, U.E.; THIEDE, A. The role of growth factors in wound healing. **Zentralblatt für Chirurgie**, v.125, n.1, p.49-55, 2000.

DECLAIR, V. The importance of growth factors in wound healing. **Ostomy Wound Manage**, v.45, n.4, p.64-68, 1999.

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

DINATO, C.J.; BARRETO, M.A.; MENDONÇA, R.G.; SCARSO, J. **Plasma rico em plaquetas**. In: DINATO C.J.; POLIDO D.W. (Eds). Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p.315-342.

DYSON, S.J. Superficial digital flexor tendonitis: a comparison of treatment methods and rehabilitation programmes. In: CONFERENCE ON EQUINE SPORTS MEDICINE AND SCIENCE, 1998, Córdoba, Spain. **Proceedings...** Córdoba: Universidad de Córdoba, 1998. p.111-117.

DYSON, S.J. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-200). **Equine Veterinary Journal**, v.36, n.5, p.415-419, 2004.

EQUINE SPA. **The treatments, facts and results**, 2004. Capturado em 18 de dezembro de 2006. Online. Disponível no site: <http://equinespa.com>

EVERTS, P.A.M.; KNAPE, J.T.A.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J.P.A.M.; HOFFMANN, J.; PVERDEVEST. E.P.; BOX, H.A.M.; van ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of ExtraCorporeal Technology**, v.38, n.2, p.174-187, 2006.

FACCO, G.G. **Tratamento com glicosaminoglicanos polissulfatados no processo cicatricial tendíneo em eqüinos - Análise morfológica**. Jaboticabal, SP: UNESP, 2003. 45p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

FERNANDES, M.A.L. **Avaliação dos efeitos do ultra-som terapêutico sobre lesões experimentais do tendão flexor digital superficial em eqüinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico**. Belo Horizonte, MG: UFMG, 2001. 67p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.

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

FERRAZ, V.C.M.; FERRIGNO, C.R.A.; SCHAMAEDECKE, A. Concentração do plasma rico em plaquetas de cães obtida por três velocidades de centrifugação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, supl.2, p.1-113, 2006.

FENWICK, S.A.; HAZLEMAN, B.L.; RILEY, G.P. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. **Arthritis Research**, n.4, p.252-260, 2002.

FOLAND, J.W.; TROTTER, G.W.; POWERS, B.E.; WRINGLEY, R.H.; SMITH, F.W. Effect sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendonitis in horses. **American Journal Veterinary Research**, v.53, n.12, p.2371-2376, 1992.

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

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

GAUGHAN, E.M.; GIFT, L.J.; DE BOWES, R.M.; BASARABA, R.; ROUSH, J. The influence of sequential intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horses. **Veterinary Comparative of Orthopaedic Traumatology**, n.8, p.40-45, 1995.

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

GENOVESE, R.L.; RANTANEN, N.W. The superficial digital flexor tendon. In: RANTANEN, N.W.; MCKINNON, A.O. **Equine diagnostic ultrasonography**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. Cap.21, p.289-398.

GENOVESE, R.L.; RANTANEN, N.W.; HAUSER, M.L.; SIMPSON, B.R. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.2, n.1, p.145-226, 1986.

GIFT, L.J.; GAUGHAN, E.M.; DEBOWES, R.M.; DOUGLAS, J.P.; FRANK, R.K.; KLEMM, R.D. The influence of intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horses. **Veterinary Comparative of Orthopaedic Traumatology**, v.5, p.151-157, 1992.

GILLIS, C.; MEAGHER, D.M.; CLONINGER, A.; LOCATELLI, L.; WILITS, N. Ultrasonographic cross-sectional area and mean echogenicity of the superficial and deep digital flexor tendons in 50 trained thoroughbred racehorses. **American Journal Veterinary Research**, v.56, n.10, p.1265-1269, 1995.

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.

GUERRA, P.; MEDEIROS, S.A.F. Estudo mostra que mercado equino gera R\$ 7,3 bilhões por ano. **Revista Gleba – informativo técnico**, ano 51, n.216, 2006.

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

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira Farmacologia**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HENNINGER, R. Treatment of superficial digital flexor tendonitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.10, n.2, p.409-424, 1994.

HILLS, A.C. Comparative ultrasonic study of normal tendinous and ligamentous structures of palmar metacarpus of Standardbred and Thoroughbred horses. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 42, 1996, Denver, Colorado. **Proceedings...** Colorado: American Association Equine Practitioners, 1996. p.272-275.

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. **The Annals of Otology Rhinology Laryngology**, v.101, n.4, p.349-354, 1992.

HORTON, W.A. Histochemistry, a valuable tool in connective tissue research. **Collagen and Related Research**, v.4, n.3, p.231-237. 1984.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. **Human tendons: anatomy, physiology and pathology**. 1. Champaign: Human kinetics, 1997. 574p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KAJIKAWA, Y.; MORIHARA, T.; SAKAMOTO, H.; MATSUDA, K.; OSHIMA, Y.; YOSHIDA, A.; NAGAE, M.; ARAI, Y.; KAWATA, M.; KUBO, T. Platelet rich plasma initial mobilization circulation derived tendon healing. **Journal of Cellular Physiology**, v.215, n.3, p.837-845, 2008.

KANECO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

KASTELIC, J.; GALESKI, A.; BAER, E. The multicomposite structure of tendon. **Connective Tissue Research**, v.6, n.1, p.11-23, 1978.

KESTER, W.O. **Definition and classification of lameness**. In: Kester, W.O (Ed). Guide for veterinary services and judging of equestrian events. 4th ed. Lexington, American Association of Equine Practitioners, 1991. 24p.

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.; KAWATA, K.; YANAGITA.; T.; DOI, H.; KITO, T.; TAKIGAWA, M. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. **Journal of Biochemistry**, v.136, n.3, p.279-282, 2004.

MACHADO, M.V.M.; VULCANO, L.C.; HUSSNI, C.A.; ALVES, A.L.G. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em equinos: estudo histológico e ultra-sonográfico. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.111-115, 2000.

MARR, C.M.; McMILLAN, I., BOYD, J.S.; WRIGHT, N.G.; MURRAY, M. 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.; HOPKINSON-WOOLLEY, J.; McCLUSKY, J. Growth factors and cutaneous wound repair. **Progress in Growth Factor Research**, v.4, n.1, p.25-44, 1992.

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

MARXEN, S.; NETO, J.C.L.; CANOLA, J.C.; MORAES, J.R.E; RIBEIRO, G. 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.

MARXEN, S.; NETO, J.C.L.; MORAES, J.R.E.; RIBEIRO, G.; NETO, A.Q. Efficacy of polysulphated glycosaminoglycan in the intratendinous treatment of experimental equine tendonitis. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v.20, n.1, p.43-46, 2003

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

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

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. **American Journal of Sports Medicine**, v.34, n.11, p.1774-1778, 2006.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picrosirius-polarization method for study of the biophatology of collagen. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, suppl.III, p.1-1, 1991.

NOMINA HISTOLOGICA. 2 ed. Belgium: General Assembly of the World Association of Veterinary Anatomists Gent, 1992. 59p.

NUNES FILHO, D.P.; LUPPINO, F.; YAEDU, R.Y.F.; CARVALHO, P.S.P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implantnews**, v.4, n.3, p.263-269, 2007

OIKAWA, M.; KASASHIMA, Y. The Japanese experience with tendonitis in racehorses. **Journal of Equine Science**, v.13, n.2, p.41-56, 2002.

PAGLIOSA, G.M.; ALVES, G.E.S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.

PALMER, S.E.; GENOVESE, R.; LONGO, K.L.; GOODMAN, N.; DYSON, S. Practical management of superficial digital flexor tendinitis in the performance horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.10, n.2, p.425-481, 1994.

PALUDO, G.R.; McMANAUS, C.; MELO, R.Q.; CARDOSO, A.D.; MELLO, F.P.S.; MOREIRA, M.; FUCK, B.H. Efeitos do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exército brasileiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1130-1142, 2002.

PEREIRA, F.E.L. **Inflamações**. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap.7, p.130-174.

PIERCE G.F.; MUSTOE, T.A.; ALTROCK, B.W.; DEUEL, T.F.; THOMASON, A. Role of platelets-derived growth factoring wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.45, n.4, p.319-326, 1991.

PRADO, M.P.; JUNIOR, A.E.C.; FERNADES, D.T. estudo da densidade vascular do tendão do músculo tibial posterior em cadáveres. **Revista Brasileira Ortopedia**, v.35, n.3, p.53-66, 2000.

REDDING, W.R.; BOOTH, L.C.; POOL, R.R. The effects of polysulphated glicosaminoglican o the healing of collagenase induced tendinitis. **Veterinary Comparative of Orthopaedic Traumatology**, n.12, p.48-55, 1999.

REEF, V.B. **Equine diagnostic ultrasound**. Philadelphia: Saunders, 1998. 560 p.

REEF, V.B. Care of tendons and ligaments. **World Equine Veterinary Review**, v.4, n.3, p.14-17, 1999.

REEF, V.B.; GENOVESE, R.L.; WILLIAM, M.D. Initial long-term results of horses with superficial digital flexor tendonitis treated with intralesional de β -aminopropionitrile Fumarate. In: Annual MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE

PRACTITIONERS, 43, 1997, Phoenix, AZ. **Proceedings...** Phoenix: American Association of Equine Practitioners, 1997. p.301-305.

RHEE, J.S.; BLACK, M.; SCHUBERT, U.; FISHER, S.; MORGENSTERN, E.; HAMMES, H.P.; PREISSNER, K.T. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. **Trombosis Haemostasis**, v.92, n.2, p.394-402, 2004.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular. **Rheumatology**, v.43, n.2, p.131-142, 2004.

RILEY, G. Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutics implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.7, n.5, p.1-25, 2005.

ROONEY, J.R.; GENOVESE, R.L. A survey and analysis of bowed tendon in Thoroughbred racehorses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.1, n.5, p.49-53, 1981.

ROSIER, R.N.; O'KEEFE, R.J.; HICKS, D.G. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. **Clinical Orthopaedics Related Research**, sup.355, p.294-300, 1998.

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 & Wilkins, 1998. Cap.7, p.103-117.

SAWDON, H.; YOVICH, J.V.; BOOTH, T. Superficial digital flexor tendonitis in racehorses: long term follow up of conservatively managed cases. **Australian Equine Veterinary**, v.14, n.1, p.21-25, 1996.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. Normal values in blood morphology with comments of species characteristics in response to disease. In: **Veterinary hematology**. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger.1975. Cap.3, p.82-218

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

SCHNABEL, V.L.; MOHAMMED, O.H.; MILLER, J.B.; MCDERMOTT,G.W.; JACOBSON, S.M.; SANTAGELO, S.K.; FORTIER, A.L. Platelet Rich Plasma (PRP) enhanced anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, n.2, p.230-240, 2007.

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.

SILVA, S.B.; BACCARIN, D.C.B.; MURAMOTO, C.; YAZBEK, K.V.B.; FERRIGNO, C.R.A. Plasma rico em plaquetas e hidroxiapatita em rádio de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, supl.2, p.1-113, 2006.

SILVA, S.B.; FERRIGNO, C.R.A.; STERMAN, F.A.; BACCARIN, D.C.B.; YAZBEK, K.V.B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1045-1051, 2007.

SMITH, R.K.W. A case of superficial digital flexor tendinitis: ultrasonographic examination and treatment with intralesional polysulphated glycosaminoglycans. **Equine Veterinary Education**, v.4, p.280-285, 1992.

SMITH, R.K.W. Assessment and treatment of tendon injury. In BEVA REGIONAL CPD, London. **Meeting...** London: Department of Farm Animal and Equine Medicine and Surgery, The Royal Veterinary College Hawkshead Lane North Mymms. 1998. p.10-14.

SMITH, R.K.W. Pathophysiology of tendon injury. IN: ROSS, M.W.; DYSON, S.J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St Louis: Saunders. 2003. Cap.69, p.619-627.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M. The crosssectional areas of normal equine digital flexor tendons determined ultrasonographically. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n.6, p.460-465, 1994.

SMITH, R.K.; KORDA, M.; BLUNN, G.M.; GOODSHIP, A.E.. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.1, p.99-102, 2003.

SOUZA, M.V.; RODRIGUES, B.L.; SOUZA, P.C.; RIBEIRO-JUNIOR, J.I.; BARBOSA, R.T.; RIBEIRO-FILHO, J.D.; AVANZA, M.F.B. Mensuração do fibrinogênio plasmático por diferentes métodos e valores hematológicos em eqüinos da raça Mangalarga Marchador. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXXI, São Luis, Maranhão. **Anais...** São Luis, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2004. CD-R.

SPEIRS, V.C. O sistema musculoesquelético. In: _____ **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre: Artmed, 1999. Cap.5, p.109-180.

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, 1989a.

SPURLOCK, G.H.; SPURLOCK, S.L.; PARKER, G.A. Evaluation of hialartin V therapy for induced tendonitis in the horse. **Equine Veterinary Science**, v.9, n.5, p.242-243, 1989b.

STEENFOS, H.H. Growth factors and wound healing. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v.28, n.2, p.95-105, 1994.

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

STRYER, L. **Biochemistry**. 3rd ed. New York: Freeman & Co, 1988. 1089p.

STRÖMBERG, B. An experimental study of autologous digital tendon transplants in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.9, n.4, p.231-237, 1977.

SULLIVAN, C.O. **Stem Cells**, 2005. Capturado em 8 de agosto de 2006. Online. Disponível na internet: [www.http://randwickequine.com.au/services/stem_cell_therapy](http://randwickequine.com.au/services/stem_cell_therapy)

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

van SCHIE, H.T.M.; BAKKER, E.M.; MIEKE JONKER, A.; van WEEREN, P.R. Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. **American Journal Veterinary Research**, v.64, n.3, p.366-375, 2003.

van SCHIE, H.T.M.; BAKKER, E.M.; MIEKE JONKER, A.; van WEEREN, P.R. Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. **American Journal Veterinary Research**, v.61, n.2, p.210-219, 2000.

van SCHIE, J.T.M.; BAKKER, E.M.; van WEEREN, P.R. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative *in vitro* study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt and transducer-displacement. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.39, n.5, p.151-160, 1998.

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

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

WEBBON, P.M. A histological study of macroscopically normal equine digital flexor tendons. **Equine Veterinary Journal**, n.10, v.4, p.253-259, 1978.

WEIBRICH, G.; BUCH, R.S.; KLEIS, W.K.; HAFNER, G.; HITZLER, W.E.; WAGNER, W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. **Factor Growth**, v.20, n.2, p.93-97, 2002.

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

WILLIAMS, I.F.; HEATON, A.; McCULLAGH, K.G.A. Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. **Research in Veterinary Science**, v.28, n.3, p.302-310, 1980.

WILLIAMS, I.F.; McCULLAGH, K.G.; GODSHIP, A.E.; SILVER, I.A. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. **Research in Veterinary Science**, v.36, n.3 p. 326-38, 1984.

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

YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G.; HUSNNI, C.A.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; MENARIN, B.C. Avaliação ultra-sonográfica de tendinite do flexor digital superficial, induzida experimentalmente em eqüinos. In: VIII CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ E III CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA FEI/CBH, São Paulo, Brasil. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Eqüídeos – ABRAVEQ, 2007. CD-R.

YOUNG, R.G.; BUTLER, D.L.; WEBER, W.; CAPLAN, A.I.; GORDON, S.L.; FINK, D.J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. **Journal of Orthopedic Research**, v.16, n.4, p.406-413, 1998.

ZUCKER-FRANKLIN, D.; GREAVES, M.F.; GROSSI, C.E.; MARMOUNT, A.M. **Atlas of blood cells: function and pathology**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988. 777p.