

JOSÉ DE OLIVEIRA PINTO

**CINÉTICA BIOMOLECULAR DE FATORES DE CRESCIMENTO E
COLÁGENO ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DE PELE TRATADA COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS POBRE EM LEUCÓCITOS: MODELO
EXPERIMENTAL EM EQUINOS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P659c
2016
Pinto, José de Oliveira Pinto, 1963-
Cinética biomolecular de fatores de crescimento e
colágeno envolvidos na cicatrização de pele tratada com
plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos : modelo
experimental em equinos / José de Oliveira Pinto Pinto. -
Viçosa, MG, 2016.
xi, 87f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maria Verônica de Souza.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Dermatologia veterinária. 2. Cavalos - Cicatrização de
ferimentos. 3. Colágeno. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação
em Medicina Veterinária. II. Título.

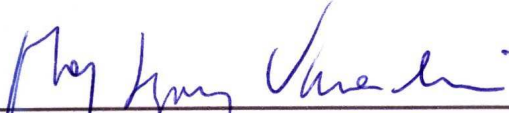
CDD 22. ed. 636.08965

JOSÉ DE OLIVEIRA PINTO

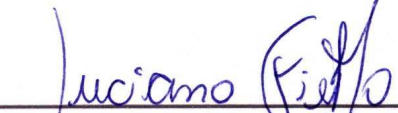
**CINÉTICA BIOMOLECULAR DE FATORES DE CRESCIMENTO E
COLÁGENO ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DE PELE TRATADA COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS POBRE EM LEUCÓCITOS: MODELO
EXPERIMENTAL EM EQUINOS**

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

APROVADA: 26 de abril de 2016.



Mary Suzan Varaschin



Luciano Gomes Fietto



Brunna Patricia A. da Fonseca



Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)



Maria Verônica de Souza
(Orientadora)

Dedico,

Aos meus pais, Henrique de Oliveira Pinto e Onofra de Paula Oliveira (*in memória*). Eles sempre me incentivaram a seguir em frente.

À minha querida esposa Lucimar Nogueira de Oliveira e a meus filhos Lucas Henrique e Shara Nogueira, pois nesta fase de construção de tese, fiz-me ausente em vários momentos marcantes da vida deles

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre colocar as pessoas do bem no meu caminho. Sempre apareceram anjos para me ajudar em tudo que eu não sabia ou não daria conta de fazer sozinho. Pela comunhão, proteção e cuidados diários, claro, pela imensa misericórdia para conosco, eu sei que é obra DELE, o CRIADOR. Aquele que está em tudo, em todos os lugares e é dono de tudo. Tudo se move por Ele, o TODO PODEROSO.

À Universidade Federal de Viçosa, na verdade, um Grandioso Hotel Cinco Estrelas do Conhecimento e da Razão, onde eu me alojei desde os tempos do COLUNI (1982) e agora completando 21 anos (05/01/2016) de atuação profissional como Médico Veterinário na Clínica e Cirurgia de Grandes Animais/DVT/UFV. “Aqui se aprende. Aqui se pratica!”

À todos os professores do Departamento de Veterinária, principalmente aqueles atuantes no Setor de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais, que de uma forma ou de outra contribuiu para o andamento deste trabalho, tirando dúvidas, colaborando em alguma disciplina da pós-graduação ou mesmo, ajudando cuidar dos animais.

À minha orientadora, professora Maria Verônica de Souza, pela paciência e tolerância com os erros repetidos durante todos estes 3,5 anos de doutoramento. Obrigado por tudo mesmo! Eu sei que não é fácil ORIENTAR!!!

Silvinha Dantas, pensou que iria esquecer de você??? De maneira alguma, você dividia comigo a carga dos fardos, durante o café da tarde no DCE. Inesquecíveis conversas amiga e como tudo chegava nos eixos...

Julimara de Oliveira, Cristian Silva (o cúmulo da competência em pessoa, sabe tudo!), Priscila Fernandes e Hugo (o quarteto que me ajudou em vários sábados e domingos pela manhã). Meu Deus, como sou grato a vocês. Vivemos bons momentos...

Às minhas amigas Fernanda Sales (Porto Firme) e Patrícia Pereira (Santo Antônio do Grama) pela ajuda na coleta de dados. Vocês tornavam nos momentos de correria e tensão em leveza e brincadeiras. Como era bom tê-las por perto!

Aos amigos do Laboratório Clínico Aécio, Lucinda, Luiz Márcio e Aloízio pela ajuda na execução nos hemogramas. Vocês são maravilhosos.

À minha grande amiga, parceira de todas as horas que me auxiliou no início da pesquisa durante congelamento das amostras e me introduziu na parte básica da técnica de RT-qPCR, HANNA FERREIRA. Muito obrigado amiga! Devo muito a você!!!

Às minhas grandes amigas Eliziária e Marcela por terem ajudado todo tempo durante a quantificação dos Fatores de Crescimento (ELISA). Dois anjos que o Senhor mandou para me manter animado, persistir nas horas difíceis e nunca desistir de lutar. Obrigado, amigas. Sem vocês, “nada do que foi seria”...

Ao amigo Júlio Crepaldi por todos os seus feitos naquele “mar de morfometria”. Meu Deus! Vários meses navegando sem terra firme à vista. Só por Deus, amigo. E você nos ajudou vencer todas aquelas turbulências Hematoxilínicas e Tricrômicas...

Aos professores Leandro Licursi e Luciano Fietto, por terem cedido o Laboratório de vocês para execução de parte do projeto. Sem esta parceria não seria possível a publicação de dois artigos científicos. Fico imensamente agradecido pela cooperação. Um agradecimento especial ao Murilo Alves que foi quem realmente acompanhou, auxiliou, supervisionou e participou ativamente na técnica RT-qPCR.

Ao meu grande amigo, mestre dos mestres, o Grande Médico Patologista José do Carmo Lopes Moreira, obrigado pelas leituras, releituras... e outras releituras... meu Deus, o que seria desta tese sem o vosso parecer, sem esta paciência de Jó que Deus lhe deu, amigo? Graças a Deus que pessoas gente-finas como você existem!

De todos os funcionários do DVT, existe sempre aquele, que normalmente é único, que consegue ser realmente ANJO, PROTETOR, SALVADOR, RESGATADOR nas tempestades. Mas se não bastasse a tamanha competência, faz todas as tarefas diárias em EXCELENTE estado de humor, sorrindo, brincando... De quem estou falando? Da nossa Rose (Rosineia Aparecida da Cunha Andrade). Rose faz muitos anos que você comprou uma “fazenda” aqui dentro do meu coração e nunca me arrependi de ter lhe dado a Escritura Registrada do Terreno. Que Deus lhe mantenha sempre, sempre assim. Nem pense em aposentar, tá! Este não é um discurso novo. Todo aluno da pós no DVT se não o fez, gostaria de fazer esta declaração!

A todos os funcionários do DVT que ajudaram limpando baias (Vantuil Cardoso), puxando capim (Cláudio Fialho e Causinho), casqueando animais (Celinho). Sem vocês todo esforço poderia vir a perder! E a você Aline, nossa “Personal Style”, obrigado minha amiga! Tantos desabafos ouvidos. Precisamos muito de você, querida!

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya e toda sua equipe do laboratório Micorryza (Marliane, Gente feníssima, super educada, Camila “Simpatia”, José Maria o “Auxiliador”, Tomaz “Pronto”, “Da hora”) que por intermédio da minha orientadora abriu as portas para realização das fotografias.

Aos nossos parceiros, calados, companheiros, sem mentiras ou falsidades que humildemente aceitam nossas IMPOSIÇÕES como se “realmente” fôssemos “donos de suas vidas”... OS CAVALOS. Como o mundo seria INCOMPLETO sem eles!

BIOGRAFIA

JOSÉ DE OLIVEIRA PINTO, filho de Henrique de Oliveira Pinto e Onofra de Paula Oliveira, nasceu em 01 de fevereiro de 1963, em Mantena, MG.

Gradou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa em dezembro de 1990. Tornou-se especialista em Clínica e Cirurgia de Grandes Animais em novembro de 1997 pela Universidade Federal de Viçosa. O título de Magister Scientiae também foi obtido na Universidade Federal de Viçosa em dezembro de 2007.

Ingressou mais vez no programa de Pós-Graduação do Departamento de Medicina Veterinária, no curso de doutorado, área de Clínica Veterinária em agosto de 2012.

Exerce o cargo de Técnico de Nível Superior na Clínica e Cirurgia de Grandes Animais desde janeiro de 1995, onde atua como Médico Veterinário auxiliando nas atividades dos alunos de Residência, gerenciamento de funcionários e terceirizados, supervisão de gastos e animais internados, além de zelar pela saúde financeira do convênio 857-DVT/PDPL.

CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
1. CAPÍTULO 1 – INFORMAÇÕES GERAIS	1
2. INTRODUÇÃO	1
3. REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1. Cicatrização cutânea por segunda intenção	3
3.2. PRP: plaquetas e fatores de crescimentos	3
3.3. Métodos de obtenção e tipos de componentes ricos em plaquetas.....	7
3.4. Estudos em lesões cutâneas de equinos, efeitos contraditórios e colaterais.....	9
4. REFERÊNCIAS GERAIS	14
5. CAPÍTULO 2: Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas	25
6. CAPÍTULO 3: Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas	34
7. CAPÍTULO 4: Avaliação macroscópica e histomorfométrica de diferentes etapas do processo de cicatrização de ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos	49
8. CONCLUSÃO GERAL	87

RESUMO

PINTO, José de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril, 2016. **Cinética biomolecular de fatores de crescimento e colágeno envolvidos na cicatrização de pele tratada com plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos: modelo experimental em equinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

A pele é um dos órgãos mais importantes do corpo. Embora haja controvérsias, o plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos (PRP-PL), fonte de fatores de crescimento, é considerado eficaz em acelerar o processo de cicatrização de diversos tecidos. O objetivo desse estudo foi avaliar o processo de cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas de equinos tratadas (T) ou não (NT) com dose única de PRP-PL, 12 horas após indução cirúrgica da lesão. Foram utilizados oito equinos com idade entre 16 a 17 anos. Três feridas com 6,25 cm² foram produzidas na região glútea direita e esquerda de todos os animais, nomeadas A, B e C, respectivamente. Doze horas após indução das lesões, 0,5 mL de PRP-PL autólogo, foram administrados em cada extremidade das feridas. Cinco biópsias de pele foram obtidas com Punch de 6-mm. A primeira amostra foi obtida com bisturi, no momento de indução da lesão (T0). As amostras obtidas com um (T1) e dois dias (T2), assim como com uma (T3) e duas (T4) semanas foram realizadas a partir das feridas A e B. A última biópsia (T5), realizada aproximadamente aos 37 dias, foi realizada na lesão C, após completo fechamento macroscópico da pele. Exsudação, presença de crosta e de tecido de granulação, assim como a evolução do fechamento da ferida foram diariamente verificados. Os retalhos de tecido cutâneo foram obtidos para determinação da expressão dos colágenos tipo I e III por qRT-PCR e quantificação dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB na pele, PRP e plasma sanguíneo por ELISA. Também foram obtidas amostras para histomorfometria, coloração hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson. Várias análises estatísticas foram realizadas, sendo adotado um nível de significância de 5%. Não houve alterações entre grupos nas variáveis estudadas durante avaliação física e laboratorial. Não houve diferença entre grupos no tempo para fechamento das feridas, embora tenha sido discretamente mais rápido nas lesões não tratadas. Diferenças ($p < 0,05$) entre grupos foram observadas para a expressão dos colágenos tipos I e III no T1 e T4, sendo maior nas feridas tratadas. O pico de expressão dos colágenos tipos I e III ocorreu aos 37 dias, para ambos os grupos, mas a maior expressão foi diferente

($p < 0,05$) da observada no T0, a partir de uma semana. Nas lesões tratadas a expressão dos colágenos começou a estabilizar na avaliação final, enquanto que nas NT os valores permaneceram elevados ($p > 0,05$). Não houve diferença entre os grupos, nos valores dos dois fatores de crescimento mensurados na pele, nos diferentes tempos. Também não houve correlação entre a quantidade dos fatores de crescimento presentes na pele e no plasma. Por outro lado, correlação positiva foi observada entre PRP-PL e a pele na lesão tratada, para os fatores de crescimento TGF- β 1 ($r = 0,31$) e PDGF-BB ($r = 0,38$), bem como entre ambos os fatores de crescimento presentes no PRP-PL ($r = 0,81$). Considerando as concentrações dos fatores de crescimento no T0, maiores valores cutâneos ($p < 0,05$) do TGF- β 1, em ambos os grupos, ocorreram com uma semana e na avaliação final. Valores mais elevados ($p < 0,05$) do PDGF-BB foram com duas semanas (T) e quando a ferida estava macroscopicamente fechada (NT). No plasma não houve alteração nas concentrações desses fatores em relação ao T0, o que sugere que o PRP-PL não ocasiona efeito sistêmico, quando os procedimentos adotados no presente estudo são utilizados. Avaliação histológica revelou diferença entre grupos na contagem dos leucócitos totais ($p = 0,0179$) e fibrócitos ($p = 0,023$), que foi maior e menor no grupo tratado, nos tempos 14 e 7 dias depois de produzida a lesão cirúrgica, respectivamente. A morfofometria revelou que com duas semanas havia maior quantidade de vasos sanguíneos ($p = 0,034$) nas feridas tratadas. Na sequência os valores se aproximaram dos observados nas feridas não tratadas. Administração local dose única de PRP-PL, aplicada 12 horas após indução cirúrgica de ferida realizada na região glútea de equinos, não altera o fechamento macroscópico da ferida; ocasiona importante aumento da expressão gênica dos colágenos tipos I e III; não aumenta a expressão local de TGF- β 1 e PDGF-BB durante diferentes fases do processo de cicatrização. Também não altera a concentração no plasma sanguíneo desses fatores de crescimento 1, 2, 7, 14 e 37 dias após administração. Além disso, durante as fases de migração e proliferação, assim como a de contração e remodelação se observa maiores concentrações desses fatores de crescimento, quando comparadas com as fases de hemostasia e inflamatória; aumenta a infiltração de neutrófilos na fase inflamatória; acarreta elevação da angiogênese duas semanas após tratamento, sem interferência microscópica na fase final do processo cicatricial e, finalmente, promove, percentualmente, cicatrização de melhor qualidade, no momento em que as feridas se encontram macroscopicamente fechadas.

ABSTRACT

PINTO, José de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2016.
Molecular kinetics of growth factors and collagen involved in the healing of skin treated with leukocyte-poor platelet-rich plasma: an experimental model in horses.
Advisor: Maria Verônica de Souza. Co-advisor: Leandro Licursi de Oliveira.

The skin is one of the most important organs of the body. Although there is controversy, leukocyte-poor platelet-rich plasma (LP-PRP), a source of growth factors, is considered effective in accelerating the healing process of various tissues. The aim of this study was to evaluate the process of healing by secondary intention of horse skin wounds treated (T) or untreated (UT) with a single dose of LP-PRP 12 hours after surgical induction of injury. Eight horses with ages between 16-17 years were used. Three wounds measuring 6.25 cm² were produced in the right and left gluteal regions and craniocaudal direction of all animals, named A, B, and C, respectively. Twelve hours after injury induction, 0.5 mL of autologous LP-PRP was administered to each edge of wounds. Five skin biopsies were obtained with a 6-mm Punch. The first sample was obtained with a scalpel at injury induction (T0). Samples obtained at one (T1) and two days (T2) and at one (T3) and two (T4) weeks were taken from wounds A and B. The last biopsy (T5), performed approximately at 37 days, was done in wound C, after complete macroscopic skin closure. Secretion, clot formation, presence of crust, and granulation tissue, as well as the evolution of wound closure were checked daily. Cutaneous tissue fragments were obtained for determination of the expression of types I and III collagens by RT-qPCR and quantification of growth factors TGF- β 1 and PDGF-BB on skin, PRP, and blood plasma by ELISA. Samples were also taken for histomorphometry, processed as routine, and stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. Several tests were used to statistical analysis. The significance level adopted was 5%. The physical and laboratory evaluation did not indicate significant changes. There was no difference between groups for the time of wound closure development, although it was slightly faster in UT wounds. Differences ($p < 0.05$) between groups were observed for the expression of types I and III collagen at T1 and T4, but higher in treated wounds. The peak expression of types I and III collagen occurred at 37 days for both groups, but the highest expression was significantly different ($p < 0.05$) from that observed at T0, after one week. In treated

wounds, the expression of collagens began to stabilize in the final assessment, whereas in UT, values remained elevated ($p>0.05$). There was no difference between groups for the values of the two growth factors measured in the skin at different times. There was also no correlation between the amount of the growth factors present in skin and plasma. On the other hand, a positive correlation was observed between LP-PRP and skin in the treated wound for growth factors TGF- β 1 ($r=0.31$) and PDGF-BB ($r=0.38$) and between both growth factors present in LP-PRP ($r=0.81$). Regarding the concentrations of growth factors at T0, greater skin values ($p<0.05$) of TGF- β 1 in both groups occurred at one week in the final assessment. Higher ($p<0.05$) PDGF-BB values occurred at two weeks (T) and when the wound was macroscopically closed (UT). In the plasma, there was no change in concentrations of these factors in relation to T0, which suggests that LP-PRP does not cause any systemic effect when the procedures adopted in the present study are employed. Histological evaluation revealed differences between the groups for the count of total leukocytes ($p=0.0179$) and fibrocytes ($p=0.023$), which was higher and lower in the treated group at 14 and 7 days after the surgical injury was produced, respectively. Morphometric analysis revealed that at two weeks there was a greater amount of blood vessels ($p=0.034$) in treated wounds. Subsequently, the values approached those presented in UT wounds. Local administration single dose of PRP-PL, applied 12 hours after surgical induction of wound made in the gluteal region of horses, does not alter the macroscopic wound closure; it causes important increase in gene expression of collagen types I and III; it does not increase the local expression of TGF- β 1 and PDGF-BB during different phases of the healing process. In addition, does not change in the blood and plasma concentration of these growth factors at 1, 2, 7, 14 and 37 (approximately) days after administration. Moreover, during the phases of migration and proliferation, as well as of contraction and remodeling cause greater concentrations of these growth factors TGF- β 1 and PDGF-BB when compared with the stages of hemostasis and inflammation; increased neutrophil infiltration in inflammatory phase; results in increase of angiogenesis two weeks after treatment, with no microscopic interference in the final phase of the healing process, and finally away promotes, in percentage, better quality of healing when the wounds are closed macroscopically.

1. CAPÍTULO - 1

INFORMAÇÕES GERAIS

PINTO, José de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril, 2016. **Cinética biomolecular de fatores de crescimento e colágeno envolvidos na cicatrização de pele tratada com plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos: modelo experimental em equinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

2. INTRODUÇÃO

Os equinos são frequentemente acometidos por lesões traumáticas. A reparação de feridas é geralmente lenta e complicada em comparação com o que ocorre em outras espécies, o que resulta em importantes perdas devido ao considerável número de animais, que ficam impossibilitados de continuarem suas funções atléticas, em decorrência de claudicações, aumentos de volume ou mesmo cicatrizes extensas. Embora a reparação por primeira intenção seja considerada ideal, é frequente a ocorrência de deiscência parcial ou total da sutura, sendo nesse caso necessária a cicatrização por segunda intenção. Além disso, quando a ferida encontra-se muito contaminada, com perda excessiva ou grave comprometimento tecidual e vascular, a reparação por segunda intenção é muitas vezes a única opção. Nesse processo, o ferimento é preenchido com tecido de granulação, e a pele lesionada restabelece a continuidade pela contração e reepitelização da lesão. Por outro lado, a cicatrização por segunda intenção é prolongada, e as complicações como infecção e formação de tecido de granulação exuberante ou cicatriz hipertrófica são frequentes. A cicatrização envolve intercâmbios intrínsecos entre múltiplos tipos celulares, citocinas e moléculas da matriz extracelular, agindo no local e em paralelo com numerosos fatores sistêmicos, como as plaquetas, a cascata de coagulação e componentes celulares e humorais do sistema imune. Nesse sentido, a cada dia surgem novos tratamentos com a finalidade de melhorar a qualidade do tecido e reduzir o período de reparação tecidual. Dentre eles, um dos mais recentemente estudados nos equinos é a utilização do plasma rico em plaqueta (PRP), uma terapia que fornece uma variedade de fatores de crescimento, com destaque para o transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), derivado de plaquetas (PDGF), fibroblástico básico (bFGF) e o endotelial vascular (VEGF), considerados fundamentais ao processo de reparação tecidual.

Apesar da importância do PRP como uma opção terapêutica, ainda faltam pesquisas bem delineadas com número razoável de animais avaliando diferentes momentos do processo cicatricial que confirmem a sua eficácia no tratamento de feridas cutâneas. Experimentos realizados em tendão de equinos estão sinalizando que possa ser uma terapia promissora, mas a realização de estudos controlados em diferentes fases do processo de reparação de outros tecidos é escassa. Mais raros ainda são as pesquisas avaliando a resposta terapêutica utilizando técnicas com alta especificidade e sensibilidade como ELISA e a qRT-PCR que permitem caracterizar genes específicos que regulam as diferentes fases do processo de reparação da pele, que seguramente podem fornecer valiosas informações a respeito do processo de cicatrização cutânea. Por outro lado, a avaliação macroscópica diária da evolução das feridas associada aos achados histomorfométricos nos permite caracterizar tipos celulares mais predominantes em cada etapa da cicatrização. Portanto, investigação como a proposta neste projeto é inédita e necessária para validação e maior conhecimento da eficácia do plasma rico em plaquetas.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar macroscopicamente e histomorfometricamente o processo de cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas de equinos tratadas ou não com dose única de PRP pobre em leucócitos (PRP-PL), aplicada doze horas após indução cirúrgica da lesão, assim como avaliar a expressão dos genes dos colágenos tipos I e III e quantificar e comparar a concentração dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB no PRP-PL, plasma sanguíneo e pele, durante diferentes fases do processo de cicatrização cutânea.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Em um ser vivo saudável, o organismo encontra-se capacitado em se proteger contra agressões mediante a utilização de mecanismos fisiológicos. Dentre estes, o processo inflamatório é o mecanismo de defesa mais importante frente a agentes patogênicos, bem como a traumas acidentais ou cirúrgicos.

Nos equinos são frequentes as feridas cutâneas, cuja cicatrização é um processo biológico que ocorre mediante uma complexa interação entre numerosos tipos de células, suas citocinas ou mediadores com a matriz extracelular. O processo de cicatrização da pele é dividido em quatro fases bem definidas que se sobrepõem,

incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e, por último, remodelação (ENOCH & LEAPER, 2007; YOUNG & McNAUGHT, 2011). SCHULTZ et al. (2011) subdivide a terceira fase em migração e proliferação, e a quarta em contração e remodelação.

3.1. Cicatrização cutânea por segunda intenção

Considera-se como mais adequada a cicatrização de uma ferida cutânea por primeira intenção (RUSZCZAK, 2003; THEORET et al., 2013), ou seja, mediante sutura cirúrgica, o que deve ser realizado o mais rápido possível depois de ocorrida a lesão. Esse procedimento é limitado às feridas localizadas em regiões anatômicas que permitam excisão e adaptação das suas bordas (RUSZCZAK, 2003). Feridas amplas e profundas normalmente não possibilitam o fechamento primário, devendo ocorrer a cicatrização por segunda intenção, onde participam ativamente dois processos que são independentes, a contração e a reepitelização (ENOCH & LEAPER, 2007). Por outro lado, a cicatrização por segunda intenção ocorre de forma lenta, sendo susceptível a complicações como infecção e formação de tecido de granulação exuberante. Devido à frequência de lesões cutâneas em equinos, a cada dia surgem novos tratamentos com a finalidade de reduzir o período máximo de cicatrização de lesões cutâneas, e que resulte na formação de um tecido que seja o mais semelhante possível ao sadio, sendo o PRP uma dessas terapias.

3.2. PRP: plaquetas e fatores de crescimentos

O PRP é uma fonte autógena e econômica de fatores de crescimento obtida a partir do próprio animal. É derivado do sangue total, contendo cinco vezes mais plaquetas (aproximadamente 1.000.000/ μ L) do que os níveis fisiológicos (MARX et al., 1998). Entretanto, ANITUA et al. (2004) ressaltaram que concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L são suficientes para o preparo do PRP. Já outros autores, sugerem que o PRP deve ser preparado com concentrações de plaquetas de três a cinco vezes maiores do que os níveis fisiológicos (GONSHOR, 2002; KEVY & JACOBSON, 2004), que podem variar entre 100.000 a 350.000 plaquetas/ μ L para equinos (SCHALM et al., 1975). SCHANABEL et al. (2007), em estudo in vitro com fragmentos do tendão do músculo flexor digital superficial TFDS de equinos, demonstraram eficiência do PRP utilizando concentração média de 395.000 plaquetas/ μ L. Segundo BARBOSA et al. (2006) a quantidade 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. Nesse sentido, a presença de trombocitopenia é um fator limitante para a adequada concentração de plaquetas no PRP.

O PRP foi introduzido em 1980 para tratamento de úlceras cutâneas em humanos (MARGOLIS et al., 2001), visando promover uma rápida cicatrização. Entretanto, resultados obtidos a partir de estudos controlados são contraditórios. Entre os fatores bioativos presentes no PRP com importante potencial terapêutico destacam-se o transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), derivado de plaquetas (PDGF), fibroblástico básico (bFGF) e o endotelial vascular (VEGF), por serem considerados fundamentais no processo de reparação tecidual (TAKEHARA, 2000; ENGBRETSSEN et al., 2010; MEI-DAN et al., 2010; BOSWELL et al., 2012; FANTINI, 2014). Esses fatores de crescimento estão relacionados com a angiogênese, secreção da collagenase e estímulo à síntese dos colágenos tipos I e III (BAMES et al. 1999; SCHWARTZ et al., 2002; MARSOLAIS & FRENETTE, 2005), que são os principais componentes estruturais do tecido cicatricial maduro, sendo sintetizados por fibroblastos (SCHULTZ et al., 2005). Em condições fisiológicas, o processo de reparação requer a ativação e/ou supressão de muitos genes, de forma que, uma alteração na expressão gênica pode resultar em uma cicatrização anormal da ferida cutânea (WASTERLAIN et al., 2012).

As plaquetas são corpúsculos anucleados, com a forma de disco, medindo cerca de 2 a 4 μm de diâmetro, derivados de células gigantes e poliplóides da medula óssea, os megacariócitos. Esses corpúsculos apresentam importante função no processo de coagulação do sangue e persistem por aproximadamente 10 dias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Estruturalmente, as plaquetas apresentam microtúbulos contendo actina e miosina, glicogênio, lisossomos e os grânulos alfa (α -grânulos) e densos, localizados no citoplasma. Os grânulos densos contêm adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio, enquanto que os α -grânulos possuem fatores de coagulação, de crescimento e outras proteínas (EVERTS et al., 2006). Os α -grânulos são exemplos de organelas secretoras que apresentam compartimentalização e conteúdo protéico adquirido por dois mecanismos distintos: biosíntese a partir dos megacariócitos (1) e endocitose e pinocitose (2) (HARRISON & CRAMER, 1993).

Os fatores de crescimento são polipeptídeos sinalizadores que regulam o metabolismo celular mediante interação com um complexo organizado de receptores de superfície celular, vias de sinalização intracelular e, finalmente, pelo aumento da transcrição de fatores e produção de proteínas (DAHLGREN et al., 2001) que resultam

na proliferação e diferenciação celular, assim como quimiotaxia, o que induz a migração de diferentes células para o local da lesão (DAHLGREN et al., 2001; ANITUA et al., 2006), bem como aumento na produção da matriz extracelular (DAHLGREN et al., 2001). Esses peptídeos liberados na matriz extracelular se ligam 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 cicatrização ou reparação tecidual (ANTONIADES & WILLIAMS, 1983; SCHULTZ, 2005).

O TGF- β pode ser originado das plaquetas, matriz óssea e cartilaginosa, linfócitos T helper (Th1) ativados, célula natural killer, macrófagos, monócitos e neutrófilos (MONTESANO & ORCI, 1988; ARRIETA, 2001). Estimula a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; regula a mitogênese endotelial, fibroblástica e osteoblástica; regula a síntese de colágeno, secreção de collagenase, regula o efeito mitogênico de outros fatores de crescimento; estimula a quimiotaxia endotelial e angiogênese e inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos (BAMES et al., 1999; MARSOLAIS & FRENETTE, 2005; MAIA & SOUZA, 2009). Adicionalmente, inibe a formação de osteoclastos e a proliferação de células epiteliais em presença de outros fatores (BECA et al., 2007). Este fator de crescimento apresenta um efeito bifásico sobre a angiogênese. Estudo in vitro revelou que baixas concentrações de TGF- β 1 aumentam sinergicamente a invasão vascular em cultura de células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos, como o VEGF ou bFGF. Já altas concentrações desse fator de crescimento diminuem esses efeitos (GAJDUSEK et al., 1993; PEPPER et al., 1993). Embora o TGF- β 1 pareça estimular a neovascularização in vivo, a atividade estimuladora pode ser causada por um efeito indireto sobre o recrutamento de células inflamatórias (ROBERTS & SPORN, 1989).

O tecido de granulação exuberante, uma complicação frequente em feridas de membros de equinos, pode produzir mais TGF β 1 e uma população maior de fibroblastos traduz em um número aumentado de receptores para TGF β 1 estimulando a formação de uma super matriz extracelular (MEC). Nos membros, a acumulação excessiva de MEC pode ocorrer em consequência de uma oclusão microvascular (bandagem, por exemplo), associada a um apoptose deficiente. A hipóxia estimularia a produção excessiva de componentes da MEC por fibroblastos através de uma super-regulação angiogênica e

fibrogênica de fatores como o TGF β 1. A diminuição da apoptose e persistência de um número excessivo de fibroblastos compõem um desequilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno levando a formação do tecido de granulação. Há sugestões que o tecido de granulação se torna exuberante por uma fibroplasia desregulada o que consequentemente inibe a contração da ferida por interferir na habilidade contrátil dos miofibroblastos (WILMINK & van WEEREN, 2005).

Segundo van den BOOM et al. (2002), os níveis de TGF- β 1 são significativamente mais elevados no início do processo de granulação tecidual em feridas de pôneis em comparação com os equinos. De acordo com DESMOULIÈRE et al. (1993), o TGF- β 1 estimula a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, o que segundo WILMINK & van WEEREN (2005) pode explicar a rápida organização dos miofibroblastos e, mais rápida contração de feridas extensas em pôneis. Ao estimular a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e induzir as α -actinas da musculatura lisa, α 1 β 2 integrinas, colágeno e fibronectina, o TGF- β 1 agrega fatores necessários à contração da ferida (IGNOTZ et al., 1989).

O fator de crescimento PDGF é encontrado em elevadas concentrações nas plaquetas, nos macrófagos e nas células endoteliais vasculares (CARRASCO et al., 2009), estando presente também nos osteoblastos, monócitos e células musculares lisas (PIERCE et al., 1991; FRIESEL & MACIAG, 1995; ARRIETA, 2001).

O PDGF é um componente essencial do aspirado da medula óssea e do plasma rico em plaquetas (ANITUA et al., 2005). A principal função desse fator de crescimento é promover quimiotaxia de macrófagos, neutrófilos, células da glia e células da musculatura lisa (PIERCE et al., 1991; FRIESEL & MACIAG, 1995; ARRIETA, 2001; CARRASCO et al., 2009). Também promove a formação de tecido de granulação (PIERCE et al., 1991; FRIESEL & MACIAG, 1995; ARRIETA, 2001), assim como estimula a mitose de fibroblastos e aumenta a produção de matriz extracelular pelo fibroblasto. Essa proteína é mitogênica para células mesenquimais e osteoblastos e regula a síntese de colágeno do tipo I e secreção de collagenase (PIERCE et al., 1991; FRIESEL & MACIAG, 1995; BECA et al., 2007). A angiogênese é promovida indiretamente pelos macrófagos, pelo mecanismo de quimiotaxia (BECA et al., 2007).

O PDGF é um polipeptídeo dimérico que existe em três isoformas. A isoforma PDGF-BB tem maior potencial para estimular a proliferação celular do que as isoformas AA e AB (LEPISTÖ et al., 1992; WROBLEWSKI & EDWALL, 1992; TAN et al.,

1995). In vivo a proteína PDGF é estocada nos α -grânulos das plaquetas e liberados após dano celular (CARMONA et al., 2011). Após lesão tecidual e degranulação das plaquetas, os α -grânulos liberam seus conteúdos [incluindo proteínas adesivas, proteínas plasmáticas, mitógenos celulares, primariamente fatores de crescimento, fatores de coagulação e inibidores de proteases] dentro da ferida (HARRINSON & CRAMER, 1993).

A síntese do PDGF é favorecida em resposta à estímulos externos, baixa tensão de oxigênio, trombina ou por estímulo relacionado com outros fatores de crescimento (CARRASCO et al., 2009). De acordo com McCARREL & FORTIER (2009), a redução da concentração do PDGF no PRP ocorre mais rapidamente do que a do TGF- β 1. Na opinião dos autores, uma possível explicação para isso, é a diferença na meia-vida entre os fatores de crescimento. O TGF- β 1 é liberado em um estado inativo ligado a proteína, com uma meia-vida de 90 minutos, sendo rapidamente eliminado após ativação, enquanto o PDGF é liberado das plaquetas na forma ativa, e tem uma meia-vida biológica inferior a 2 minutos quando injetado intravenosamente, conforme mencionado por LEE (2000). Por outro lado, na opinião de McCARREL & FORTIER (2009), deve-se ter cautela quando se extrapola dados obtidos in vitro, para um estudo in vivo.

3.3. Métodos de obtenção e tipos dos componentes ricos em plaquetas

Em termos gerais o PRP pode ser definido como um volume de fração plasmática tendo o sangue autólogo um concentrado de plaquetas acima da linha de base (ENGEBRETSEN et al., 2010). Considerando a concentração de plaquetas, leucócitos e hemácias em um determinado volume de plasma, existem pelo menos três métodos para a preparação do PRP: aférese (automático), que possibilita a captura dessas células pela utilização de filtro descartável; buffy-coat (semi-automático), que permite a separação por centrifugação utilizando kits comerciais (sistemas ACP, GPS II, GPS III, SmartPReP2, etc), e a técnica manual, resultante da centrifugação do sangue total armazenado em tubos contendo anticoagulante. Os custos variam bastante; kits comerciais produzem concentrados de PRP a um valor elevado, e a técnica manual com dupla centrifugação, além de resultar em menor custo, é de fácil realização (MAFFULLI & del BUONO, 2012).

Embora se considere 8 horas como o tempo máximo para a aplicação do PRP após sua obtenção, que é quando pode ocorrer perda da sua estabilidade (MARX 2001, 2004) e deficiência na expressão das proteínas secretoras (PIETRZAK & EPPLEY 2005), segundo VAVKEN et al. (2006), o PRP não deve ser armazenado. Na realidade, não há um consenso em relação ao momento trans ou pós-cirúrgico de aplicação do PRP como sugestivo de maior ou menor eficiência. A lógica para a utilização do PRP reside na inversão da proporção de células vermelhas, as quais são menos úteis no processo de reparação, e na elevação da quantidade de plaquetas, fundamentais no estímulo da reparação tecidual (MARX 2004; SÁNCHEZ et al., 2009).

Considerando a quantidade de plaquetas e leucócitos, os concentrados de plaquetas podem ser classificados em diferentes categorias. Existe o PRP puro (PRP-P), onde as células brancas são propositalmente removidas, e o PRP com leucócitos (PRP-L) (EHRENFEST et al., 2009; ANDIA et al., 2012). Também existem os componentes ricos em fibrinas (PRF) (CARMONA et al., 2013; LANA et al., 2014) que, diferentemente dos outros concentrados, não necessitam do uso de anticoagulantes para obtenção (EHRENFEST et al., 2012). O PRP-L deve conter entre 5x e 8x o número de plaquetas no sangue (EHRENFEST et al., 2009; CARMONA et al., 2013), e 3x ou mais a quantidade de leucócitos (CARMONA et al., 2013) do que no sangue total.

Quando o concentrado rico em plaquetas é ativado por agentes farmacológicos formam polímeros de fibrina, conhecido como gel de plaquetas (GP). Portanto, o GP obtido a partir de um PRP-P é chamado de PRG-P, e quando originado a partir de um PRP-L, é chamado de PRG-L. Para finalizar, levando em consideração as definições básicas, existe também o PRP pobre em leucócitos (PRP-PL), que pode ocasionar menor resposta inflamatória aguda, menor celularidade e neovascularização, quando comparado com o PRP com elevada quantidade de células brancas (PRP-RL) (DRAGOO et al., 2012).

Conforme mencionado previamente, existe controvérsia sobre a quantidade ideal de plaquetas no PRP. Alguns autores mencionam que deve ser de pelo menos 1 milhão de plaquetas/ μ L ou 3 a 6 vezes mais do que a encontrada no sangue total (MARX, 2001; WEIBRICH et al., 2002; ALSOUSOU et al., 2009), que varia de 100.000 a 350.000 plaquetas/ μ L (FELDMAN et al., 2000; MARX, 2001). No presente estudo, a concentração foi de 320.000 a 390.000 plaquetas/ μ L, sendo, portanto acima da considerada como apropriada por ANITUA et al. (2004) de 300.000 plaquetas/ μ L, e

semelhante à obtida em estudos realizados em equinos hígidos mestiços (MAIA et al., 2009b; VENDRUSCOLO et al., 2012; ZANDIM et al., 2013). SUTTER et al. (2004) obtiveram valores médios mais elevados (855.000 plaquetas/ μ L) mediante utilização de metodologia automática com equipamento que permite a separação (aférese) dos constituintes do sangue total, o que resulta em maiores contagens de plaquetas. Entretanto, na prática clínica, esses aparelhos são pouco utilizados devido ao custo e por não estarem disponíveis em algumas clínicas veterinárias sendo, portanto, mais apropriado o uso de centrífugas convencionais quando se deseja reduzir gastos.

Estudo in vitro realizado por GRAZIANI et al. (2006) demonstrou que preparações de PRP exercem um efeito dose-específica na proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Efeitos ótimos foram observados quando a contagem plaquetária foi 2,5x mais alta do que a presente no sangue total. Por outro lado, quantidades mais elevadas (5,5x) resultaram em efeitos indesejáveis, como a redução da proliferação fibroblástica, e da função dos osteoblastos. De acordo com os autores, diferentes concentrações de plaquetas no PRP podem ocasionar resultados distintos quando estudos in vivo são realizados. Aumento moderado da quantidade de plaquetas no PRP com relação à contagem no sangue total possibilita um ambiente mais adequado para a cicatrização de feridas devido a um melhor equilíbrio entre proliferação e diferenciação celular. Portanto, como a quantidade de plaquetas no PRP preparado no presente estudo foi em média de 2,8x a presente no sangue total, acredita-se que essa quantidade deveria ter sido suficiente para que a terapia resultasse em um fechamento mais rápido da ferida. ROMAGNOLI et al. (2015), observaram correlação negativa entre a concentração de plaquetas e tempo para o retorno à atividade esportiva em vinte equinos após lesão espontânea unilateral do ligamento suspensório tratado com PRP contendo de seis a vinte vezes mais plaquetas do que os valores fisiológicos da espécie. HUTCHINS & GRABSCH (2009) mencionaram que o PRP deve conter moderado número de plaquetas, as quais devem possuir de 1,5x a 2,5x a encontrada no sangue total.

3.4. Estudos em lesões cutâneas de equinos, efeitos contraditórios e colaterais

Existem alguns estudos com PRP na pele de equinos (CARTER et al., 2003; De ROSSI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; MACIEL et al., 2012), mas com resultados contraditórios. Enquanto algumas pesquisas relatam eficácia do tratamento

em acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas nos equinos (CARTER et al., 2003; MACIEL et al., 2012), outros não demonstraram esse efeito (MONTEIRO et al., 2009; SOUZA et al., 2014a), embora se observe uma tendência a uma melhor resposta em alguns constituintes da pele tratada com o componente rico em plaquetas com relação ao grupo controle (SOUZA et al., 2014b), assim como uma melhor qualidade cicatricial (SOUZA et al., 2015). Portanto, apesar da importância do PRP como opção terapêutica, não há suficiente evidência que confirme a sua eficácia no tratamento de feridas cutâneas.

MONTEIRO et al. (2009) constataram que a concentração do TGF- β 1 and PDGF-BB são significativamente maiores no PRP do que em outros componentes sanguíneos. A quantidade de TGF- β 1 foi em média 1,55 vezes maior no PRP comparado com a medula óssea, e no mínimo 2 vezes maior no PRP comparado com o plasma, sangue total e plasma pobre em plaquetas. Entretanto, não houve diferença entre os demais componentes sanguíneos avaliados, ou seja, sangue total, plasma, plasma pobre em plaquetas e medula óssea. Adicionalmente, as feridas não tratadas fecharam mais rapidamente do que as tratadas.

SOUZA et al. (2014b) estudaram os fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB em feridas cutâneas tratadas com PRP-PL, e não encontraram diferença entre feridas tratadas 12 horas após indução da lesão e as não tratadas. Não houve correlação entre a quantidade desses fatores de crescimento na pele e no plasma. Por outro lado, os autores relatam correlação positiva entre o PRP-PL e a presença dos fatores de crescimento na pele. Os valores mais altos do TGF- β 1 com relação a pele sadia ocorreu com uma semana e no momento em que a pele se encontrava macroscopicamente fechada. Já para o PDGF-BB essa maior quantidade ocorreu com duas semanas e também quando houve fechamento da lesão. Embora não houve diferença entre grupos, da mesma forma que relatado no trabalho de MONTEIRO et al. (2019), a pele não tratada fechou mais rapidamente do que a tratada, porém de acordo com SOUZA et al. (2015), o mais rápido fechamento da pele não significa um melhor tecido cicatricial microscopicamente.

Na realidade não existem evidências suficientes que confirmem a eficácia da utilização do PRP como opção terapêutica no tratamento de feridas cutâneas. Isso se deve, em parte, a região do corpo submetida ao tratamento, a forma de obtenção e composição do PRP (considerando a quantidade de plaquetas e leucócitos), forma de apresentação (líquido; gel), via e frequência de aplicação, volume e momento em que é

administrado durante o processo de cicatrização da pele, entre outros aspectos (SOUZA et al., 2015). Adicionalmente, são raras as pesquisas avaliando a resposta à terapia utilizando estudos randomizados e controlados, e técnica com alta especificidade e sensibilidade como algumas utilizadas no presente estudo.

Até o ano de 2012 apenas BANFI et al. (2006) haviam relatado um possível efeito sistêmico decorrente da administração local do PRP. Os autores mediram as concentrações séricas dos fatores de crescimento EGF e VEGF em quatro pacientes humanos portadores de tendinopatia patelar, e em um com tendinose próxima à articulação úmero-rádio-ulnar. A quantificação foi realizada pela técnica ELISA antes e 30 min após administração da terapia, assim como com 3 e 24 h depois do tratamento. O efeito foi atribuído pela diminuição significativa na concentração sérica do EGF já após 30 min da aplicação intratendínea do PRP obtido pelo sistema GPS II, ou seja, método semiautomático. Por outro lado, o efeito permaneceu apenas até a avaliação realizada 3 horas após o tratamento. Entretanto, o mesmo não foi observado para o VEGF, o que foi atribuído à alta variabilidade interindividual.

WASTERLAIN et al. (2013) pesquisaram o efeito sistêmico de várias proteínas, entre elas os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), bFGF, VEGF e PDGF-BB no soro de 25 pacientes humanos submetidos a tratamento intratendíneo com PRP obtido pelo método semi-automático. Os fatores de crescimentos foram quantificados pela técnica ELISA antes do tratamento, 15 min após realização do mesmo, assim como com 3, 24, 48, 72 e 96h. Efeito sistêmico ($p < 0,05$) foi observado para os fatores de crescimento IGF-1 (aumento com 24 e 48 horas), bFGF (elevação com 72 e 96 horas), e VEGF (aumento já na avaliação realizada com 3 horas, que permaneceu até a avaliação realizada com 96 horas). Os autores comentam que provavelmente existem efeitos sistêmicos para alguns fatores de crescimento, mas não para outros, e o momento em que foram expressas as alterações séricas variou com a proteína estudada. Adicionalmente, o referido efeito foi antagônico. Enquanto em um estudo ocorreu redução (BANFI et al., 2006), no outro foi observado aumento (WASTERLAIN et al., 2013) do fator de crescimento. Portanto, nesses casos, o efeito sistêmico pode ser considerado uma alteração para mais ou para menos na concentração de fatores de crescimento no soro/plasma/sangue em comparação com valores basais previamente mensurados antes da aplicação local do PRP, de forma a comprovar que o tratamento agiu em todo o organismo e não apenas no sítio de aplicação.

Apesar de SCHIPPINGER et al. (2011) considerarem uma possível elevação plasmática de IGF-1 como efeito ergogênico, os autores não encontraram alteração na quantidade do fator de crescimento após uma única aplicação intramuscular de PRP em humanos saudáveis, sendo, portanto, considerado pelos pesquisadores um tratamento seguro, pelo menos no que refere a um possível efeito ergogênico. A técnica de obtenção do PRP também foi semi-automática, sendo o fator de crescimento quantificado no soro pela técnica ELISA antes da aplicação do PRP, assim como após 0, 5, 3 e 24 h. É importante ressaltar que tanto BANFI et al. (2006) como WASTERLAIN et al. (2013) realizaram o estudo com pacientes apresentando lesão tendínea de ocorrência natural, presentes em diferentes locais, com evolução e severidade não padronizadas. Os autores mencionam inclusive como limitação do estudo a falta de grupo controle. Adicionalmente, a quantificação dos fatores de crescimento em ambos os casos foi realizada no soro, que dependendo da proteína é encontrada em maior quantidade do que no plasma, como é o caso do VEGF (KRAUS et al., 2004). Outro aspecto a ser considerado é a forma de obtenção do PRP, que em ambos os estudos foi pelo método semi-automático que, em geral, origina um PRP-L, ou seja, rico em leucócitos (EHRENFEST et al., 2012).

Recentemente HESSEL et al. (2014) divulgaram resultados de uma pesquisa onde foram comparadas a concentração de plaquetas e dos leucócitos, assim como do TGF- β 1 e PDGF-BB em concentrados autólogos de plaquetas obtidos pelo método manual e por quatro diferentes sistemas (Angel, ACP, E-PET e GPS III) utilizados como métodos semi-automáticos. O estudo revelou importante variação na composição do PRP. Os métodos E-PET e GPS III apresentaram maiores ($p < 0,001$) valores de plaquetas com relação aos níveis basais, porém também de leucócitos (GPS III, $p < 0,001$). A exceção do sistema ACP (Arthrex®), ocorreu elevação ($p < 0,001$) do PDGF-BB nos métodos semiautomáticos E-PET e GPS III, assim como no método manual. O TGF- β 1 aumentou em todos os produtos avaliados, a exceção do sistema ACP. Valores mais elevados ($p < 0,001$) foram observados com o kit comercial E-PET e pela técnica manual. De acordo com os autores essas discrepâncias de resultados podem influenciar a bioatividade dos componentes ricos em plaquetas e, consequentemente, influenciar na qualidade da regeneração tecidual.

Apesar dos resultados obtidos por WASTERLAIN et al. (2013), os próprios autores acreditam que o aumento obtido para o IGF-I não esteja relacionado com a

presença desse fator de crescimento no PRP, já que a quantidade sérica foi mais elevada do que no componente rico em plaquetas. Na opinião dos autores, a elevação se deve, provavelmente, à ativação do hGH-IGF-1, que é um dos principais hormônios relacionados com a produção do IGF-1. No estudo desses pesquisadores ocorreu uma importante elevação desse hormônio nas primeiras 24 h, embora não tenha sido significativa. Adicionalmente, os autores comentam que essa dissociação pode ser reforçada pela ausência de elevação ($p>0,05$) do PDGF-BB no seu estudo, apesar do seu aumento no PRP. Portanto, se os fatores de crescimentos contidos no PRP fossem os únicos responsáveis pelo aumento dos seus níveis circulantes, também seria esperado alteração sistêmica na quantidade do PDGF-BB.

Finalmente, merece destaque o comentário dos autores de que o método utilizado para a preparação do PRP e a técnica de ativação pode afetar a magnitude do efeito sistêmico. Na realidade, eles não utilizaram apenas um PRP-L, mas sim, um PRP-RL, que pode provocar a liberação não apenas de fatores de crescimentos anabólicos, mas também catabólicos, o que pode resultar em diferenciada elevação sistêmica de fatores de crescimentos anabólicos. Estudo *in vitro* recentemente publicado por BOSWELL et al. (2014), com cultura de tendão de equinos tratada com PRP contendo diferentes proporções de leucócitos e plaquetas, revelou que o grupo que recebeu a maior quantidade de plaquetas apresentou redução da expressão do colágeno tipo I. Por outro lado, o tendão tratado com quantidades mais baixas de leucócitos apresentou menor sinalização catabólica. Na opinião desses pesquisadores, os resultados sugerem que o menor efeito catabólico ocasionado pela baixa concentração de células brancas seja, provavelmente, mais importante do que a alta quantidade de plaquetas, cuja finalidade é maximizar o feito anabólico nos tecidos.

SOUZA et al. (2014b) estudaram os fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB em feridas cutâneas tratadas com PRP-PL e controle nos tempos 24 e 48 horas, assim como com uma e duas semanas. Finalmente, uma última avaliação ocorreu quando a lesão estava macroscopicamente cicatrizada. Esses fatores foram quantificados na pele e no plasma, exatamente nos mesmos tempos. Não houve nem elevação nem redução dos fatores de crescimentos no plasma, o que sugere a ausência de efeito colateral em feridas tratadas ou não com PRP-PL, 12 horas após indução da lesão.

É conhecido o efeito positivo dos leucócitos na inflamação, imunidade e sinalização celular (BOSWELL et al., 2012), assim como na liberação de fatores de

crescimento. Entretanto, aos leucócitos também são atribuídos efeitos indesejáveis, já que ao atuar como sinalizadores de células pró-inflamatórias podem provocar catabolismo tecidual (JACOBSEN et al., 2008). Além disso, existe relato de que a aplicação de concentrado de plaquetas com leucócitos, para tratamento de paciente com tendinopatia pode aumentar a dor local (MISHRA & PAVELKO, 2006). Portanto, tanto efeitos positivos como negativos são associados à presença dessas células no PRP. Considerando a relação antagônica entre plaquetas e leucócitos, e os fatores de crescimento e citocinas que são gerados, WASTERLAIN et al. (2012) sugeriram que o PRP ideal para preparações ortopédicas deve conter uma proporção elevada de plaquetas em relação aos leucócitos, de forma a promover uma ação mais anabólica do que catabólica. Por outro lado, BOSWELL et al. (2012) consideram que em feridas infectadas pode ser necessária e eficiente uma maior quantidade de leucócitos.

Esta linha de pesquisa com PRP com a equipe que colaborou para a realização da presente tese iniciou em 2007 com o tratamento do tendão flexor digital superficial (TFDS) de equinos após lesão por collagenase (MAIA et al., 2009b; ZANDIM et al., 2012, 2013). Na continuidade como forma de terapia para lesões cutâneas induzidas cirurgicamente (Souza et al., 2014a,b; Souza et al., 2015).

4. REFERÊNCIAS GERAIS

- ANDIA, I.; SÁNCHEZ, M.; MAFFULLI, N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. **Expert opinion on biological therapy**, v.12, n.1, p.7-22, 2012.
- 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.
- ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M.; AZOFRA, J.; del MAR ZALDUENDO, M.; de la FUENTE, M.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. **Journal of Orthopaedic Research**, v.23, n.2, p.281-286, 2005.
- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; NURDEN, P.; ORIVE, G.; ANDÍA, I. 2006. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in biotechnology**, v.24, n.5, p.227-234, 2006.

- ANTONIADES, H.N.; WILLIAMS, L.T. Human platelet-derived growth factor; structure and functions. **Federation Proceedings**, v.42, n.9, p.2630-2634, 1983.
- ALSOUSOU, J.; THOMPSON, M.; HULLEY, P.; NOBLE, A.; WILLETT, K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery A REVIEW OF THE LITERATURE. **Journal of Bone & Joint Surgery**, v.91, n.8, p.987-996, 2009.
- ARRIETA, L.F.A. **Efeito de alguns fármacos no processo de reparação de feridas cutâneas em cães**. 2001. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.
- 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.
- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A.; TURNER, D.R. **Theory and Practice of Histological Techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1996. 741p.
- BANFI, G.; CORSI, M.M.; VOLPI, P. Could platelet rich plasma have effects on systemic circulating growth factors and cytokine release in orthopaedic applications? **British journal of sports medicine**, v.40, n.10, p.816-816, 2006.
- BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R.J.; GOMES, B.N.; DEL CARLO, 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.
- BECA, T.; HERNÁNDEZ, G.; MORANTE, S.; BASCONE, A. Plasma rico em plaquetas. Uma revisão bibliográfica. **Avances en Periodoncia e Implantología Oral**, v.19, n.1, p.39-52, 2007.
- BOSWELL, S.G; COLE, B.J.; SUNDMAN, E.A.; KARAS, V.; FORTIER, L.A. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v.28, n.3, p.429-439, 2012.
- BOSWELL, S.G; SCHNABEL, L.V; MOHAMMED, O.H.; SUNDMAN, E.A.; MINAS, T.; FORTIER, L.A. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. **The American Journal of Sports Medicine**, v.42, n.1, p.42-49, 2014.

- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; GIRALDO, C.E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. **Archivos de medicina veterinaria**, v.43, n.1, p.1-10, 2011.
- CARRASCO, J.; BONETE, D.; GOMAR, F. Plasma rico em plaquetas vs. Plasma rico em factores de crecimiento. **Revista Española de Cirugía Osteoarticular**, v.46, n.239, p.127-140, 2009.
- 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.
- 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.
- DESCHENE, K.; CÉLESTE, C.; BOERBOOM, D.; THEORET, C.L. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. **Wound Repair and Regeneration**, v.19, n.2, p.250-259, 2011.
- DeROSSI, R.; COELHO, A.C.A.O.; MELLO, G.S.; FRAZÍLIO, F.O.; LEAL, C.R.B.; FACCO, G.G.; BRUM, K.B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.4, p.276-281, 2009.
- DESMOULIÈRE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescence and growing cultured fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v.122, p.103-111, 1993.
- DRAGOO, J.L.; BRAUN, H.J.; DURHAM, J.L.; RIDLEY, B.A.; ODEGAARD, J.I.; LUONG, R.; ARNOCK, S.P. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. **American Journal of Sports Medicine**, v.40, n.6, p.1274-1280, 2012.
- EHRENFEST, D.M.D.; BIELECKI, T.; MISHRA, A.; BORZINI, P.; INCHINGOLO, F.; SAMMARTINO, G.; RASMUSSEN, L.; EVERTS, P.A. In search of a consensus, terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and

- leukocytes. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.13, n.7, p.1131-1137, 2012.
- EHRENFEST, D.M.D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v.27, n.3, p.158-167, 2009.
- ENGEBRETSEN, L.; STEFFEN, K.; ALSOUSOU, J.; ANITUA, E.; BACHL, N.; DEVILLE, R.; EVERTS, P.; HAMILTON, B.; HUARD, J.; JENOURE, P.; KELBERINE, F. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. **British Journal of Sports Medicine**, v.44, n.15, p.1072-1081, 2010.
- ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v.26, n.2, p.31-37, 2007.
- 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.
- FANTINI, P. **Plasma rico em plaquetas: padronização em equídeos, criopreservação e efeito terapêutico na desmiste do ligamento supraespinhoso de equinos**. 2014. 80f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G. ; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000. 1344p.
- FERREIRA, J.C.; SOUZA, M.V.; VILÓRIA, M.I.V.; FONSECA, E.F.; VIANNA, M.W.S.; COSTA, J.C.M. Efeitos da monofenilbutazona na cicatrização por segunda intenção em equinos. **Revista Ceres**, v.54, n.313, p.263-270, 2007.
- 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.
- GAJDUSEK, C.M., LUO, Z., MAYBERG, M.R. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1: synergistic mediators of angiogenesis in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v.157, n.1, p.133-144, 1993.
- 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.

- GRAZIANI, F.; IVANOVSKI, S.; CEI, S.; DUCCI, F.; TONETTI, M.; GABRIELE, M.
The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts.
Clinical Oral Implants Research, v.17, n.2, p.212-219, 2006.
- HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha-granules. **Blood Review**, v.7, n.1,
p.52-62, 1993.
- HESSEL L.N.; BOSCH G.; VAN WEEREN P.R.; IONITA J.C. Equine autologous
platelet concentrates: a comparative study between different available systems.
Equine Veterinary Journal, v.47, n.3, p.319-325. 2014.
- HUTCHINS, G.G.; GRABSCH, H.I. Molecular pathology: the future? **The Surgeon**,
v.7, n.6, 366-377, 2009.
- IGNOTZ, R.A.; HEINO, J.; MASSAGUÉ, J. Regulation of cell adhesion receptors by
transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a
common beta 1 subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.1, p.389-392,
1989.
- JACOBSEN L.C.; SORENSEN O.E.; COWLAND J.B.; BORREGAARD N.;
THEILGAARDMÖNCH K. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and
the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize
in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils.
Journal of Leukocyte Biology, v.83, n.5, p.1155-1164, 2008.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora
Guanabara Koogan, 1999. 427p.
- 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.
- LANA, J.F.S.D.; SANTANA, M.H.A.; BELANGERO, W.D.; LUZO, A.C.M. **Platelet-
rich plasma**. New York: Springer Heidelberg, 2014, 360p.
- LEE, S.J. Cytokine delivery and tissue engineering. **Yonsei Medical Journal**, v.41,
n.6, p.704-719, 2000.
- LEPAULT, E.; CÉLESTE, C.; DORÉ, M.; THEORET, C.L. Comparative study on
microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse.
Wound Repair and Regeneration, v.13, n.5, p.520-529, 2005.
- LEPISTÖ, J.; LAATO, M.; NIINIKOSKI, J.; LUNDBERG, C.; GERDIN, B.;
HELDIN, C.H. Effects of homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor

- (PDGF-AA and PDGFBB) on wound healing in rat. **Journal of Surgical Research**, v.53, n.6, p.596-601, 1992.
- MACIEL, F.B.; DeROSSI R.; MÓDOLO, T.J.C.; PAGLIOSA, R.C.; LEAL, C.R.J.; DELBEN A.A.S.T. Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. **Burns**, v.38, n.7, p.1058-1065, 2012.
- MAFFULLI, N.; DEL BUONO, A. Platelet plasma rich products in musculoskeletal medicine: Any evidence? **The surgeon**, v.10, n.3, p.148-150, 2012.
- MAIA, L.; SOUZA, M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteo-articulares em animais. *Ciência Rural*, v.39, n.4, p.1279-1286, 2009.
- MAIA, L.; DE SOUZA, M.V.; JÚNIOR, J.I.R.; DE OLIVEIRA, A.C.; ALVES, G.E.S.; DOS ANJOS BENJAMIN, L.; SILVA, Y.F.R.S.; ZANDIM, B.M.; MOREIRA, J.D.C.L. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. **Journal of equine veterinary science**, v.29, n.8, p.618-626, 2009b.
- MARGOLIS, D.J., KANTOR, J., SANTANNA, J., STROM, B.L.; BERLIN, J.A. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. **Diabetes care**, v.24, n.3, p.483-488, 2001.
- MARSOLAIS, D.; FRENETT, J. Inflammation and tendon healing. **Médecine Sciences**, v.21, n.2, p.180-186, 2005.
- MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EISCHSTAEDT, R.M.; 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.
- MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant dentistry**, v.10, n.4, p.225-228, 2001.
- MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v.62, n.4, p.489-496, 2004.
- McCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **Journal of Orthopaedic Research**, v.27, n.8, p.1033-1042, 2009.

- MEI-DAN, O.; MANN, G.; MAFFULLI, N. Platelet-rich plasma: any substance into it? **British Journal of Sports Medicine**, v.44, n.9, p.618-19, 2010.
- 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.
- MONTEIRO, S.O.; LEPAGE, O.M.; THEORET, C.L. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, n.2, p.277-282, 2009.
- MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.85, n.13, p.4894-4897, 1988.
- PEPPER, M.S.; VASSALLI, J.D.; ORCI, L.; MONTESANO, R. Biphasic effect of transforming growth factor- β 1 on in vitro angiogenesis. **Experimental cell research**, v.204, n.2, p.356-363, 1993.
- PIERCE, G.F.; MUSTOE, T.A.; ALTROCK, B.W.; DEUEL, T.F.; THOMASON, A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. **Journal of cellular biochemistry**, v.45 n.4, p.319-326, 1991.
- PIETRZAK, W.S.; EPPLEY, B.L. Platelet rich plasma: biology and new technology. **Journal of Craniofacial Surgery**, v.16, n.6, p.1043-1054, 2005.
- REES, H.M.; ECKER, E.E. An improved method for counting blood platelets. **Journal of the American Medical Association**, v.80, n.9, p.621-622, 1923.
- ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. **American Review of Respiratory Disease**, v.140, n.4, p.1126-1128, 1989.
- ROMAGNOLI, N.; RINNOVATI, R.; RICCIARDI, G.; LAMBERTINI, C.; SPINELLA, G.; SPADARI, A. 2015. Clinical evaluation of intralesional injection of platelet-rich plasma for the treatment of proximal suspensory ligament desmitis in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.35, n.2, p.141-146, 2015.
- RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, v.55, n. 12, p.1595-1611, 2003.
- SAMPSON, S.; GERHARDT, M.; MANDELBAUM, B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. **Current Reviews Musculoskeletal Medicine**, v.1, n.3-4, p.165-174, 2008.

- SÁNCHEZ, M.; ANITUA, E.; ORIVE, G.; MUJICA, I.; ANDIA, I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. **Sports Medicine**, v.39, n.5, p.345-354, 2009.
- SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROLL, E.J. **Veterinary hematology** (No. 3rd edition). Lea & Febiger, 1975. 807p.
- SCHANABEL, L.V.; MOHAMMED, H.O.; MILLER, B.J.; MCDERMOTT, W.G.; JACOBSON, M.S.; SANTANGELO, K.S.; FORTIER, L.A. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, n.2, p.230-240, 2007.
- SCHIPPINGER G.; OETTL K.; FRANKHAUSER F.; SPIRK S.; DOMEJ W.; HOFMANN P. Influence of intramuscular application of autologous conditioned plasma on systemic circulating IGF-1. **Journal Sports Science and Medicine**, v.10, p.439- 444, 2011.
- SCHULTZ, G.S.; DAVIDSON, J.M.; KIRSNER, R.S.; BORNSTEIN, P.; HERMAN, I.M. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v.19, n.2, p.134-148, 2011.
- SCHULTZ G.S.; LADWIG G.; WYSOCKI, A. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. **World wide wounds**, p.1-12, Aug, 2005.
- SCHWARTZ, A.J.; WILSON, D.A.; KEEGAN, K.G.; GANJAM, V.K.; SUN, Y.; WEBER, K.T.; ZHANG, J. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.11, p.1564-1570, 2002.
- SOUZA, M.V.; PINTO, J.O.; COSTA, M.B.M; ALVES, M.S.; SILVA, M.O.; MARTINHO, K.O.; FIETTO, L.G. Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.3, p.233-240, 2014a.
- SOUZA, M.V.; PINTO, J.O.; COSTA, M.M.; SANTOS, E.C.; GARCIA, S.L.R.; OLIVEIRA, L.L. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.6, p.599-612, 2014b.
- SOUZA, M.V.; SILVA, M.B.; PINTO, J.O.; LIMA, M.B.S.; CREPALDI, J.; LOPES, G.F.M.; SANTOS, H.B.; RIBEIRO, R.I.M.A.; THOMÉ, R.G.

- Immunohistochemical expression of collagens in the skin of horses treated with leukocyte-poor platelet-rich plasma. **BioMed Research International**, p.1-2, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/aa/893485/>> Online. Acesso: 16 Jun 2015.
- 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 of Veterinary Research**, v.65, n.7, p.924-930, 2004.
- TAKEHARA, K. Growth regulation of skin fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v.24, s.1, p.70-77, 2000.
- TAN, E.M.; QIN, H.; KENNEDY, S.H.; ROUDA, S.; FOX, J.W.; MOORE, J.H. Platelet-derived growth factors-AA and -BB regulate collagen and collagenase gene expression differentially in human fibroblasts. **Biochemical Journal**, v.310, n.pt2, p.585-588, 1995.
- TEXTOR, J.A.; NORRIS, J.W.; TABLIN, F. Effects of preparation method, shear force and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, n.2, p.271-278, 2011.
- THEORET, C.L.; BARBER, S.M., MOYANA, T.N.; GORDON, J.R. Expression of transforming growth factor β 1, β 3, and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. **Veterinary Surgery**, v.30, n.3, p.269-277, 2001.
- THEORET, C.L.; WILMINK, J.M. Aberrant wound healing in the horse: naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. **Wound Repair and Regeneration**, v.21, n.3, p.365-371, 2013.
- THRALL, M.A. Diagnóstico dos distúrbios hemorrágicos, p.170-187. In: Ibid. (Ed.), **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Roca, São Paulo. Cap.5, 2007. p.170-187.
- TURCK, C.; DOHLMAN, J.G.; GOETZL, E. Immunological mediators of wound healing and fibrosis. **Journal of Cellular Physiology**, v.133, n.S5, p.89-93, 1987.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT - A software for plant disease severity assessment. Christchurch, USA, 2003. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8, 2003,

- Christchurch. **Meeting ... International Congress of Plant Pathology**, 2003, vol.8,p.105.
- van den BOOM, R.; WILMINK, J.M.; O’KANE, S., WOOD, J.; FERGUSON, M.W. Transforming growth factor- β levels during second intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Repair and Regeneration*, v.10, n.3, p.188-194, 2002.
- VAVKEN, P.; KOTZ, R.; DOROTKA, R., 2006. [Minimally invasive hip replacement-a meta-analysis]. *Zeitschrift fur Orthopadie und Unfallchirurgie*, v.145, n.2, p.152-156, 2006.
- VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F.; MAIA, L.; QUEIROZ, D.L. WATANABE, M.J. YAMADA, A.L. M.; ALVES, A. L. G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.2, p.106-110, 2012.
- WASTERLAIN, A.S.; BRAUN, H.J.; DRAGOO, J.L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics*, v.22, n.1, p.33-42, 2012.
- WASTERLAIN, A.S.; BRAUN, H.J.; HARRIS, A.H.S.; KIM, H-J.; DRAGOO, J.L. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. *The American Journal of Sports Medicine*, v.41, n.1, p.186-193, 2013.
- WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.; HAFNER, G.; HITZLER, W.E. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v.30, n.2, p.97-102, 2002.
- WILMINK, J.M.; van WEEREN, P.R. Second-Intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.21, n.1, p.15-32, 2005.
- WROBLEWSKI, J.; EDWALL, C. PDGF BB stimulates proliferation and differentiation in cultured chondrocytes from rat rib growth plate. *Cell Biology International Reports*, v.16, n.2, p.33-144, 1992.
- YOUNG A.; McNAUGHT, C-E. The physiology of wound healing. *Surgery*, v.29, n.10, p.475-479, 2011.
- ZANDIM, B.M.; SOUZA, M.V.; MAGALHÃES, P.C.; BENJAMIN, L.D.A.; MAIA, L.; OLIVEIRA, A.C.D.; PINTO, J.D.O.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Platelet activation:

ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.83-92, 2012.

ZANDIM, B.M.; SOUZA, M.V.; FRASSY, L. M.; VILÓRIA, M. I. V.; MAIA, L.; FONSECA, C. C.; MAGALHÃES, P. C. Immunohistochemistry of fator VIII, histology and morphometry in equine tendon treated with platelet-rich plasma. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.2, p.169-184, 2013.

5. CAPÍTULO - 2

Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas

PINTO, José de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril, 2016. **Cinética biomolecular de fatores de crescimento e colágeno envolvidos na cicatrização de pele tratada com plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos: modelo experimental em equinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas¹

Maria V. de Souza^{2*}, José de O. Pinto³, Marcela B.M. da Costa⁴, Murilo S. Alves⁵,
Micheline O. da Silva⁶, Karina O. Martinho⁷ e Luciano G. Fietto⁸

ABSTRACT. Souza M.V., Pinto J.O., Costa M.B.M., Alves M.S., Silva M.O., Martinho K.O. & Fietto L.G. 2014. [Collagen gene expression in skin wound of horses treated with platelet-rich plasma.] Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(3):233-240. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000, Brazil. E-mail: msouza@ufv.br

Platelet-rich plasma (PRP) is a product derived from total blood centrifugation, whose use is focused on improving the healing of different tissues, as a result of the growth factors it contains. However, the clinical benefits of this therapy have not been fully established. The objective of this study was to evaluate type I and III collagen gene expression during different phases of the healing process of PRP-treated skin. Eight healthy crossbred geldings, aged 16 and 17 years (16.37 ± 0.52) were used. Three quadrangular-shaped lesions (6.25 cm^2) were surgically induced in the right and left gluteal regions of all the animals. Twelve hours after induction of the lesions, 0.5 mL of PRP was administered in each of the four edges of the wounds (T=treated group) in one of the gluteal regions, randomly chosen. The contralateral region was used as control (NT=non-treated group). The wounds were submitted to daily cleaning with Milli-Q water, and the samples were obtained with a 6 mm diameter biopsy Punch. Six skin biopsies were obtained, with the first being performed on the day the lesions were induced (T0), and the others 1 (T1), 2 (T2), 7 (T3), and 14 (T4) days, after the wound was induced. The sixth biopsy (T5) was performed after fully healed of the skin. Evaluation of type I and III collagen gene expression was carried out by the qRT-PCR technique. The data were analyzed by the Bonferroni test, Student t-test, paired t-test, and regression analysis ($p < 0.05$). Difference ($p < 0.05$) between groups were observed for both collagen gene expressions from T1 to T4, being higher in the animals of group T. The peak for type I and III collagen gene expressions occurred in T5 for both groups, but the highest expression was different ($p < 0.05$) from zero time, starting in T3. In the animals of treated group, collagen expression started to establish at T5, while in the horses of NT group, the values remained increased. Local administration of a single PRP dose in cutaneous wound of the gluteal region of horses results in a higher local gene expression of type I and III collagens. However, this expression does not alter the maximum time of macroscopic healing of the wound.

INDEX TERMS: Horses, platelet-rich concentrate, dermatopathy, collagen synthesis, qRT-PCR.

¹ Recebido em 19 de novembro de 2013.

Aceito para publicação em 25 de março de 2014.

² Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Universitário, Avenida Peter Henry Rolfs s/n, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. *Autor para correspondência: msouza@ufv.br

³ Doutorando do Departamento de Veterinária, UFV, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: jolip2004@yahoo.com.br

⁴ Graduanda do Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG 36570-000. Bolsista PIBIC-CNPq. E-mail: marcela.martins@ufv.br

⁵ Doutorando do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV, Campus Universitário, Avenida Peter Henry Rolfs s/n, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. E-mail: murilobqi@yahoo.com.br

⁶ Mestranda do Departamento de Veterinária, UFV, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: micheline.silva@ufv.br

⁷ Doutoranda do Departamento de Nutrição e Saúde, UFV, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: kkmartinho@yahoo.com.br

⁸ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: lgfietto@ufv.br

RESUMO. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado da centrifugação do sangue total, cuja utilização concentra-se em melhorar a reparação de diferentes tecidos, tendo em vista os fatores de crescimento nele contido. Entretanto, os benefícios da terapia no contexto clínico ainda não estão totalmente esclarecidos. Objetivou-se avaliar a expressão dos genes dos colágenos tipos I e III durante diferentes fases do processo de cicatrização da pele tratada com PRP. Foram utilizados oito equinos machos castrados, mestiços, hípidos, com idade entre 16 e 17 (16,37±0,52) anos. Três feridas em formato quadrangular (6,25cm²) foram confeccionadas nas regiões glúteas direita e esquerda de todos os animais. Doze horas após indução das lesões, 0,5mL do PRP foi administrado em cada uma das quatro extremidades das feridas (T=grupo tratado), de uma das regiões glúteas, escolhida aleatoriamente. A região contralateral foi utilizada como controle (NT=grupo não tratado). As feridas foram submetidas à limpeza diária com água Milli Q, e amostras foram obtidas com biópsias utilizando-se Punch de 6mm de diâmetro. Seis biópsias de pele foram obtidas a primeira no dia de indução das lesões (T0), e as demais com 1 (T1) 2 (T2) 7 (T3) e 14 (T4) dias após a realização das feridas. A sexta biópsia (T5) foi realizada após o completo fechamento da pele. A avaliação da expressão dos genes dos colágenos tipos I e III foi realizada pela técnica qRT-PCR e os dados analisados pelo teste de Bonferroni, t de Student, t pareado e análise de regressão (p<0,05). Diferenças (p<0,05), entre grupos, foram observadas para a expressão de ambos os colágenos nos T1 a T4, sendo maior nos animais do grupo T. O pico de expressão dos colágenos tipos I e III ocorreu no T5 para ambos os grupos, mas a maior expressão foi diferente (p<0,05) do tempo zero a partir do T3. Nos animais do grupo tratado a expressão dos colágenos começou a estabilizar no T5, enquanto que nos equinos do NT os valores permaneceram elevados. A administração local de uma única dose do PRP em ferida cutânea na região glútea de equinos, resulta em maior expressão gênica local dos colágenos tipos I e III. Entretanto, essa expressão não altera o tempo máximo de fechamento macroscópico da ferida.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cavalos, concentrado rico em plaquetas, dermatopatia, síntese de colágeno, qRT-PCR.

INTRODUÇÃO

Feridas cutâneas acarretam importante impacto financeiro na indústria equina (Theoret et al. 2013). O processo de cicatrização de feridas envolve uma complexa interação entre diferentes tipos celulares, citocinas, e moléculas da matriz extracelular, que atuam no local, e em conjunto com numerosos fatores sistêmicos como as plaquetas, a cascata de coagulação e componentes celulares e humorais do sistema imune (Soo et al. 2002).

A melhor forma de cicatrização de uma ferida cutânea é por primeira intenção (Ruszczak 2003, Theoret et al. 2013) mediante sutura cirúrgica, o que deve ser realizado o mais rápido possível depois de ocorrida a lesão. Esse procedimento é limitado às feridas localizadas em regiões anatômicas que permitam excisão e adaptação das suas bordas (Ruszczak 2003). Feridas amplas e profundas normalmen-

te não possibilitam o fechamento primário, devendo ocorrer a cicatrização por segunda intenção, onde participam ativamente dois processos que são independentes, a contração e a reepitelização (Enoch & Leaper 2007). Por outro lado, a cicatrização por segunda intenção ocorre de forma lenta, sendo susceptível a complicações como infecção e formação de tecido de granulação exuberante. Nesse contexto, a cada dia surgem novas terapias com a finalidade de reduzir o período máximo de cicatrização das feridas cutâneas, e que resulte na formação de um tecido que seja o mais semelhante possível ao sadio.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado da centrifugação do sangue total, rico em uma variedade de fatores de crescimento, que participam ativamente no processo de cicatrização de feridas cutâneas, como o transformante beta (TGF-β) e o derivado das plaquetas (PDGF), já que estão relacionados com a secreção da colagenase e estímulo à síntese do colágeno (Bames et al. 1999, Schwartz et al. 2002, Marsolais & Frenette 2005), tanto do tipo I como do tipo III, que são os principais componentes estruturais do tecido cicatricial maduro, sendo sintetizado por fibroblastos (Czubryt 2012, Yang et al. 2013). Em condições fisiológicas, o processo de reparação requer a ativação e/ou supressão de muitos genes, de forma que, uma alteração na expressão gênica pode resultar em uma cicatrização anormal da ferida cutânea.

Apesar da importância do PRP como opção terapêutica, não há suficiente evidência que confirme a sua eficácia no tratamento de feridas cutâneas. Existem alguns estudos com PRP na pele de equinos (Carter et al. 2003, De Rossi et al. 2009, Monteiro et al. 2009, Maciel et al. 2012), mas com resultados contraditórios. São poucas as pesquisas avaliando a resposta terapêutica utilizando técnicas com alta especificidade e sensibilidade como a qRT-PCR, e que avaliaram o perfil de expressão gênica do colágeno. Adicionalmente, a maioria dos resultados utilizando técnicas altamente sensíveis foi obtida a partir de estudos realizados com culturas de células, e pesquisas *in vivo* sobre o monitoramento da síntese do colágeno são limitadas. O estudo da expressão de genes específicos *in vivo*, em diferentes fases da cicatrização da pele tratada com PRP, pode fornecer informações valiosas sobre parte desse complexo processo. Além disso, os resultados obtidos serão utilizados para validar ou não a eficácia do PRP na cicatrização de feridas cutâneas, testando a hipótese de que o PRP possui efeito anabólico sobre a expressão gênica da matriz. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão dos genes dos colágenos tipos I e III durante diferentes fases do processo de cicatrização da pele tratada com PRP.

MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob o número de protocolo 96/2011. Os procedimentos foram realizados de acordo com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Departamento de Veterinária (DVT/UFV), o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, os princípios éticos para pesquisa animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Legislação Brasileira vigente.

Foram utilizados oito equinos mestiços hígidos, machos castrados, com idade entre 16 e 17 ($16,37 \pm 0,52$) anos. Apenas animais aparentemente saudáveis e sem afecção dermatológica foram incluídos no estudo. Uma vez selecionados, os equinos foram colocados em baias individuais de 20m², quinze dias antes do início do experimento, onde foram alimentados com feno de tifton 85 e capim elefante picado (*Pennisetum purpureum*), além de ração farelada própria para equinos. Sal mineral e água foram deixados *ad libitum*. Esse manejo foi mantido durante todo o ensaio. No período de adaptação os animais foram pesados, pulverizados com solução carrapaticida contendo deltametrina, e vermifugados por via oral com moxidectina (0,2mg/kg/oral).

Três lesões de pele em formato quadrangular foram confeccionadas na região glútea direita e esquerda de todos os animais, conforme descrito por Ferreira et al. (2007). Para isso, o local foi submetido a tricotomia e preparado assepticamente com digluconato clorexidina degermante a 2% e alcoólico a 0,5%. Os animais foram sedados com xilazina a 2% (0,8mg/kg/IV), e em seguida foi realizado bloqueio anestésico subcutâneo com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, ao redor do local a ser incidido.

Bisturi com lâmina nº23, e um molde de plástico em formato quadrangular com 2,5cm de lado (6,25cm²) foram utilizados para a confecção da lesão cutânea (epiderme, derme e tecido subcutâneo). As feridas foram identificadas em A, B e C, craniocaudalmente em ambas as garupas. Amostras de pele foram congeladas a -80°C para posterior avaliação da expressão gênica do colágeno (T0). As feridas foram deixadas para cicatrizar por segunda intenção, e monitoradas até completo fechamento (ferida C). Todos os animais receberam soro antitetânico no dia de confecção da lesão de pele. A dor foi reduzida utilizando dose única de tartarato de butorfanol (0,08mg/kg/IV). Não foram utilizadas fármacos anti-inflamatórios e antibióticos.

A obtenção do PRP foi baseada no protocolo descrito por Argüelles et al. (2006). Após antisepsia local com álcool-iodado, 144mL de sangue foram obtidos com agulhas vacutainer por venipunção jugular, e acondicionados em 36 tubos com capacidade para 4,5mL, contendo citrato de sódio a 3,2%. Também foram obtidas amostras de sangue com EDTA para quantificação das plaquetas e leucócitos totais.

As amostras de sangue para a obtenção do PRP foram homogeneizadas e centrifugadas a 120xg por 10 min. Após centrifugação, foi descartado de cada tubo, 50% do plasma sanguíneo presente na superfície e o restante foi transferido para quatro tubos de polipropileno sem anticoagulante com capacidade para 10mL, sendo o botão leucocitário e as hemácias sedimentadas descartados. Em seguida, o plasma foi novamente centrifugado a 240xg por 10 min. Após essa segunda centrifugação o plasma foi dividido em duas frações: o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) e a fração remanescente denominada plasma rico em plaquetas. Um volume de 75% do plasma obtido, presente na superfície de cada tubo foi descartado e o PRP contendo o botão de plaquetas, reservado.

A concentração das plaquetas e dos leucócitos foi determinada manualmente (método Rees & Ecker 1923) no PRP e no sangue obtido com EDTA. A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer utilizando líquido de Türk para contagem dos leucócitos e de Brecher para contagem das plaquetas (Thrall 2007).

Todos os animais foram submetidos a tratamento local com PRP 12h após realização das lesões. Após tricotomia e sedação com xilazina (0,8mg/kg/IV), uma das regiões glúteas, escolhidas ao acaso, foi assepticamente preparada para a administração do PRP (grupo T). As feridas da região glútea contralateral (grupo NT) não receberam qualquer infiltração, mas apenas limpeza local com água Milli-Q, sendo o mesmo realizado nas feridas tratadas.

O PRP foi preparado imediatamente antes da sua aplicação, que foi realizada utilizando-se agulha de 24G. Cada extremidade

das três feridas recebeu 0,5mL do componente rico em plaquetas, totalizando 2mL por lesão e 6mL por região glútea (esquerda ou direita). Após tratamento, os animais foram mantidos em baias, sendo soltos por um período diário de 2h, e monitorados durante todo o experimento.

Amostras de pele, em toda a sua superfície lesionada, foram obtidas para a expressão gênica do colágeno, conforme metodologia descrita por Monteiro et al. (2009) e Deschene et al. (2011). A obtenção foi realizada com Punch de 6mm de diâmetro um (T1) e dois (T2) dias após realização da lesão, assim como sete (T3) e 14 (T4) dias do procedimento cirúrgico. Adicionalmente, uma nova coleta foi realizada ao término do fechamento da ferida "C" (T5).

Para as biópsias, os animais foram submetidos a protocolo anestésico similar ao utilizado para a confecção das lesões, descrito anteriormente. A exceção da última coleta que foi realizada no centro da área cicatrizada (que ainda se mostrava despigmentada), as amostras foram retiradas da periferia das lesões. Foram obtidas duas amostras de pele em cada tempo. Após obtenção dos fragmentos cutâneos, o excesso de sangue foi retirado de forma asséptica com NaCl a 0,9%. Ato contínuo, foram colocados em criotubos e imersos em nitrogênio líquido a -196°C por alguns segundos e estocados em freezer a -80°C. Próximo a realização das análises, os fragmentos foram liofilizados e pesados em balança de precisão. As feridas não tratadas foram submetidas ao mesmo protocolo de avaliação.

Para a determinação do modelo da expressão gênica dos colágenos tipos I e III, as amostras liofilizadas foram descongeladas em temperatura ambiente, e 10mg foram utilizadas para extração do RNA total usando o reagente Trizol (Life Technologies, Itapevi, São Paulo, Brasil).

Para a síntese dos cDNAs, 4µg de RNA total foram tratados com DNase (RQ1 DNase – 1µL/2µg de RNA) (Invitrogen, Life Technologies) e utilizados para a síntese de cDNA com a enzima transcriptase reversa MMLV (Invitrogen, Life Technologies).

Após a obtenção dos cDNAs, quantidades equivalentes foram reunidas em quatro amostras contendo cada uma cDNAs provenientes de duas repetições biológicas, totalizando quatro amostras representativas dos oito animais incluídos no experimento.

As análises de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas utilizando o aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Life Technologies) de acordo com as recomendações descritas no manual da Applied Biosystems. As reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços. Cada reação continha um volume final de 10µL, sendo 5µL de GoTaq qRT-PCR Master Mix (Promega, Lab-Research do Brasil, São Paulo, Brasil), 4µL dos oligonucleotídeos correspondentes na concentração de 2,5µM e 1µL do cDNA. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min e 40 ciclos de 94°C por 15 s, e a 60°C por 1 min. Após 40 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação (*melting*) para atestar a especificidade das amplificações.

A quantificação da expressão dos genes alvo para o colágeno do tipo I - COL1A2 (AB070840.1) e o colágeno do tipo III - COL3A1 (XM_001917620.2) foram baseadas nos valores de Ct (*Cycle threshold*). Inicialmente foi realizado um ensaio para a determinação da eficiência da reação para cada gene. Para tanto foram realizadas diluições seriadas de 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ do cDNA extraído da última coleta, ou seja, quando ocorreu o fechamento da ferida. As diluições foram utilizadas em reações de qRT-PCR como descrito anteriormente. Para o cálculo da eficiência foi utilizado o coeficiente de correlação obtido pela regressão linear dos valores de Ct das diluições seriadas. Todos os primers utilizados apresentaram eficiência próxima a 100%.

Para a quantificação relativa foi utilizado o método comparativo de 2^{-ΔΔCt}. Como controle endógeno para normalização dos

dados foi utilizado a expressão do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH-AF157626.1). Os oligonucleotídeos específicos utilizados nos experimentos foram: GAPDH-equus F1: GGC AAG TTC CAT GGC ACA GT; GAPDH-equus R1: CAC AAC ATA TTC AGC ACC AGC AT; COL1A2-equus F2: TAT ACT GTG ATT TCT CTA CTG GCG; COL1A2-equus R2: TTG ACC TTG GAG TTT CTG TAC C; COL3A1-equus F1: CTA TGG CAA TCC TGA CCT TCC; COL3A1-equus R1: GCT TGA TCC ATG TAC GCA ATG.

Os dados foram analisados através do software Stata, versão 9.1 *Stata Corp., College Station, USA*. A análise descritiva das variáveis foi apresentada por meio da média/mediana e desvios padrão. Para avaliação da normalidade da distribuição das variáveis foi utilizado o teste de Shapiro-wilk. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas em log. O teste t de Student para amostras independentes foi utilizado para comparar os grupos tratado e não tratado em cada tempo (T1, T2, T3, T4 e T5) para cada tipo de colágeno, assim como para comparar os valores médios de contagem de plaquetas e de leucócitos no sangue e PRP, e a média do tempo de cicatrização da ferida nos grupos. Para a comparação dos diferentes tempos em ambos os grupos foi utilizado análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. A comparação entre os valores médios de expressão de cada tipo de colágeno em cada grupo foi realizada pelo teste de Bonferroni. Análise de regressão foi realizada para verificar a associação dos tipos de colágeno com o decorrer do tempo (0, 1, 2, 7, 14 e 37 dias). A comparação entre os tipos de colágenos em cada tempo no mesmo grupo foi realizada através do teste t pareado. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O período de tempo para fechamento de uma ferida depende de vários fatores, dentre eles a extensão e localização anatômica da lesão, e a presença de infecção local. O processo de cicatrização das feridas nos equinos é muito semelhante ao dos humanos (Theoret et al. 2013), o que se dá por reepitelização da superfície cutânea, com a derme cicatrizando por granulação do estroma, migração de miofibroblastos e contração da ferida (Greenwood 2010). De forma clássica, o processo de cicatrização da pele é dividido em quatro fases bem definidas que se sobrepõem, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e, por último, remodelação (Enoch & Leaper 2007, Young & McNaught 2011). Schultz et al. (2011) subdivide a terceira fase em migração e proliferação, e a quarta em contração e remodelação.

No presente estudo o tempo máximo necessário para cicatrização das lesões foi de 47 dias em ambos os grupos de animais, sendo os valores médios de $36,87 \pm 7,45$ dias nas feridas não tratadas com PRP, e de $38,75 \pm 6,47$ dias nas tratadas, entretanto não houve diferença ($p=0,59$) entre grupos. Esse tempo médio de cicatrização está próximo ao encontrado em feridas não contaminadas, localizadas na região torácica, que é de aproximadamente quatro semanas (Schwartz et al. 2007), assim como de feridas realizadas da mesma forma e na mesma região que a descrita no presente estudo ($38,5 \pm 3,9$ dias; Ferreira et al. 2007). Os resultados obtidos se assemelham aos descritos por Monteiro et al. (2009), que também observaram que o período máximo de fechamento de feridas tratadas com PRP foi maior do que nas não tratadas, o que sugere que a terapia não tem efeito positivo no tempo máximo de cicatrização macroscópica da lesão de pele.

No sangue total e PRP os valores de plaquetas variaram de 100.000 a 150.000 plaquetas/ μL , e de 320.000 a 390.000 plaquetas/ μL , respectivamente. Já os valores de leucócitos variaram respectivamente de 5.600 a 10.900 células/ μL e de 50 a 900 células/ μL no sangue total e PRP. O valor médio da contagem de plaquetas encontradas no sangue foi menor ($p=0,000$) do que no PRP. O oposto ($p=0,000$) ocorreu com o valor médio de contagem dos leucócitos.

A concentração de plaquetas no PRP foi considerada como adequada, já que foi acima da referida como apropriada por Anitua et al. (2004), e semelhante à obtida em pesquisas realizadas em equinos hígidos mestiços (Maia et al. 2009, Vendruscolo et al. 2012, Zandim et al. 2013). Adicionalmente, estudo *in vitro* realizado por Graziani et al. (2006) demonstrou que preparações de PRP exercem um efeito dose-específico na proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Efeitos ótimos foram observados quando a contagem plaquetária foi 2,5x mais alta do que a presente no sangue total. Por outro lado, quantidades mais elevadas (5,5x) resultaram em efeitos indesejáveis, como a redução da proliferação fibroblástica, e da função dos osteoblastos. Na opinião dos autores, diferentes concentrações de plaquetas no PRP também podem ocasionar resultados distintos quando estudos *in vivo* são realizados. Aumento em quantidade moderada da concentração de plaquetas no PRP com relação à contagem no sangue total pode possibilitar um ambiente mais adequado para a cicatrização de feridas devido a um melhor equilíbrio entre proliferação e diferenciação celular. Nesse sentido, como a quantidade de plaquetas no PRP preparado foi em média de 2,8x a presente no sangue total, acredita-se que essa quantidade deveria ter sido suficiente para que a terapia resultasse em efeito positivo na cicatrização da ferida, no que se refere a um fechamento mais rápido. Entretanto, o fechamento macroscópico da lesão não necessariamente reflete a qualidade do tecido cicatricial. Dados preliminares obtidos em pesquisa em andamento têm revelado que fragmentos obtidos na fase final do processo de cicatrização de feridas tratadas com PRP, apresentam-se microscopicamente com melhor organização dos feixes de fibras colágenas em comparação com as lesões não tratadas. Adicionalmente, avaliação descritiva sobre a organização e densidade das fibras de colágeno realizada por Maciel et al. (2012), mediante microscopia eletrônica de varredura, revelou que feridas de equinos tratadas com uma ou duas aplicações tópicas de PRP em gel apresentaram melhor característica ultraestrutural do que as do grupo controle (tratadas com solução salina) na biópsia realizada 25 dias após tratamento. Por outro lado, na avaliação realizada aos 40 dias, as feridas que receberam particularmente duas aplicações do componente rico em plaquetas demonstraram maior densidade tecidual da matriz extracelular, o que de acordo com os autores é indicativo de fibrose. Apesar desse achado, clinicamente a reparação da ferida ocorreu com pouco tecido cicatricial.

Considerando os resultados obtidos no estudo de Maciel et al. (2012), pode-se inferir que uma única aplicação do PRP, conforme ocorreu no presente estudo é uma prática adequada, já que reduz a possibilidade de se aplicar e estimular no local grandes quantidades de fatores

de crescimento que são conhecidamente associados a cicatriz hipertrófica. Adicionalmente, a concentração média de plaquetas utilizadas por esses autores que foi de 723.000 ± 50.000 plaquetas/ μL , ou seja, de três a cinco vezes a quantidade presente no sangue total, pode ter atuado estimulado a maior densidade tecidual observada. É importante ressaltar que, apesar de vários pesquisadores considerarem que elevada concentração de plaquetas seja fundamental para a eficácia da terapia, conforme previamente mencionado, pesquisa *in vitro* sinalizou que quantidades mais baixas como, por exemplo, 2,5x a presente no sangue total, pode resultar em melhores resultados. Essa afirmativa é reforçada com estudo *in vitro* realizado por Boswell et al. (2014), onde cultura de tendão de equinos que recebeu PRP contendo diferentes proporções de leucócitos e plaquetas, revelou que o grupo que recebeu maior quantidade de plaquetas apresentou redução na expressão do colágeno tipo I. Por outro lado, o tendão tratado com quantidades mais baixas de leucócitos apresentou menor sinalização catabólica. Na opinião dos autores, os resultados sugerem que o menor efeito catabólico ocasionado pela baixa concentração de células brancas seja, provavelmente, mais importante do que a alta quantidade de plaquetas, cuja finalidade é maximizar o efeito anabólico nos tecidos.

A quantidade de leucócitos (50-900 células/ μL) presente no PRP também foi considerada como adequada, pois foi mais baixa do que a obtida por Vendruscolo et al. (2012) (2.460 ± 763 células/ μL), quando utilizaram força de centrifugação relativa (*g*) e tempo igual ao usado no presente estudo. É indiscutível o efeito positivo dos leucócitos na inflamação, imunidade e sinalização celular (Boswell et al. 2012), assim como na liberação de fatores de crescimento. Por outro lado, aos leucócitos também são atribuídos efeitos indesejáveis, já que ao atuar como sinalizadores de células pró-inflamatórias podem provocar catabolismo tecidual (Jacobsen et al. 2008). Adicionalmente, há relato de que a aplicação de concentrado de plaquetas com leucócitos, para tratamento de paciente com tendinopatia pode aumentar a dor local (Mishra & Pavelko 2006). Portanto, tanto efeitos positivos como negativos são associados à presença dessas células no PRP. A utilização de um PRP com pequena quantidade de leucócitos, conforme ocorreu no presente estudo, é considerada adequada quando se pretende promover uma ação mais anabólica do que catabólica (Wasterlain et al. 2012), já que as feridas não estavam contaminadas.

A matriz extracelular é uma complexa rede de ligações cruzadas de proteínas e outras macromoléculas, das quais o colágeno é o principal componente estrutural, sendo fundamental para a resistência e integridade de todos os tecidos, possuindo função vital na cicatrização das feridas (Enoch & Leaper 2007). Considera-se que a síntese de colágeno inicia-se pelo menos a partir do terceiro dia após uma lesão cutânea. Os valores médios e desvios padrão da expressão dos genes dos colágenos tipos I e III na pele tratada e não tratada com PRP são apresentados na Fig.1. A exceção do tempo referente à avaliação final (T5), houve diferença ($p < 0,05$) entre grupos tanto para o colágeno tipo I como para o colágeno tipo III, sendo os valores médios mais elevados nos grupos tratados. Esses resultados demonstram a

eficácia do PRP em induzir a expressão dos colágenos durante a fase inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização cutânea. Sabe-se que as feridas adquirem aproximadamente 20% da sua resistência mecânica à tração ao final das três primeiras semanas do início do processo de cicatrização, que é durante o período em que os colágenos fibrilares se acumulam de forma relativamente rápida. Depois desse período a melhora na resistência se torna lenta, particularmente devido ao início da remodelação dos colágenos, que começam a formar grandes feixes de fibras, assim como pelo aumento no número de ligações cruzadas intermoleculares (Bailey et al. 1975), que começam a ocorrer durante a fase de remodelação.

Tanto nas feridas tratadas como não tratadas, a expressão do gene do colágeno tipo I foi mais elevada ($p < 0,05$) com relação ao tempo zero, a partir da primeira semana (T3), com valores máximos no tempo final ($p = 0,000$). Lefebvre-Lavoie et al. (2005) utilizaram supressão subtrativa

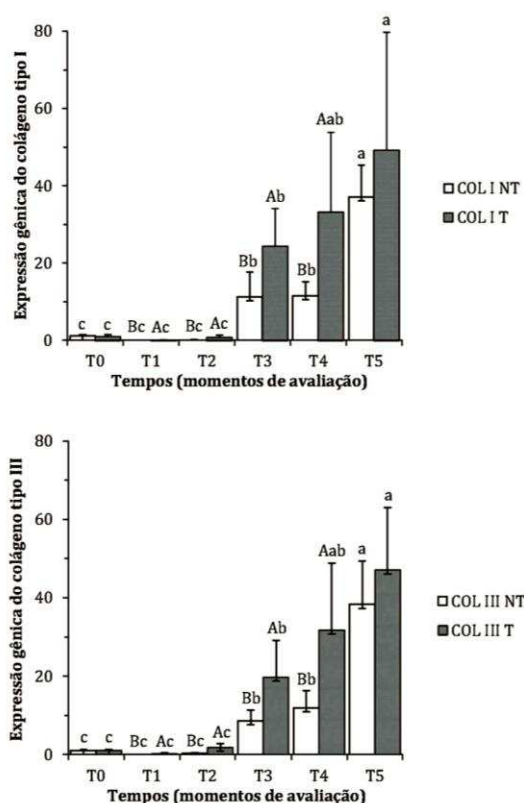


Fig.1. Médias e desvios padrão para a expressão dos genes colágenos tipos I (COL I) e tipo III (COL III), em diferentes tempos do processo de cicatrização, tanto no grupo não tratado (NT) como no grupo tratado (T) com PRP. Médias seguidas por letras maiúsculas e minúsculas diferentes diferem entre si nos grupos e nos tempos pelos testes t de Student e de Bonferroni, respectivamente.

por hibridização e RT-PCR semi-quantitativa para identificar a expressão gênica do colágeno tipo I tanto na pele sadia como na margem de feridas cutâneas induzidas no hemitorax de equinos. A avaliação foi efetuada após uma semana de realização da lesão, com aumento significativo da expressão do colágeno tipo I nas amostras obtidas a partir das feridas, em comparação com a pele íntegra, em ambas as técnicas utilizadas. Deste modo, tanto em condições fisiológicas, como em feridas tratadas com PRP, existe aumento da expressão do colágeno tipo I já após uma semana que, de acordo com Schultz et al. (2005), corresponde 80 a 85% da matriz extracelular cutânea.

Da mesma forma que ocorreu com o colágeno tipo I, a expressão do gene do colágeno tipo III foi significativa ($p < 0,05$) a partir da primeira semana de indução das lesões nos animais de ambos os grupos. Esse colágeno corresponde de 8 a 11% da matriz extracelular cutânea (Schultz et al. 2005), devendo ser produzido em maior quantidade durante a fase final da formação da matriz extracelular. Na sequência deve ser gradualmente degradado e substituído pelo colágeno tipo I, que é fundamental para aumentar a força do tecido em cicatrização (Mutsaers et al. 1997, Liu et al. 2005, Czubryt 2012), que é reforçada pelas ligações cruzadas dos colágenos (Czubryt 2012).

De acordo com Schwartz et al. (2002) a elevação do colágeno tipo I é progressiva, permanecendo por pelo menos quatro semanas, que foi o período máximo de tempo em que os autores avaliaram esse colágeno utilizando a técnica histoquímica do Picrosirius Red, em feridas de equinos localizadas no tórax e região distal dos membros torácicos, cicatrizadas por segunda intenção. Na realidade, Mignatti et al. (1996) mencionam que a elevada taxa de síntese do colágeno dentro da ferida pode demorar de 6 a 12 meses para retornar aos níveis fisiológicos, o que significa que independentemente se a ferida cutânea é tratada ou não com PRP, a quantidade de colágeno tipo I ainda pode estar elevada no momento do fechamento da lesão.

A análise de regressão revelou que, com o decorrer dos dias, há um aumento de 0,99x e 1,04x na expressão gênica dos colágenos tipos I ($IC_{95\%}$; 0,88-1,1) e III ($IC_{95\%}$; 0,91-1,15) respectivamente, no grupo não tratado. No grupo tratado esse aumento é de respectivamente 1,34x ($IC_{95\%}$; 0,96-1,73) e 1,29x ($IC_{95\%}$; 1,01-1,56) (Fig.2). A análise revela que no grupo que recebeu o PRP há uma estabilização da expressão dos colágenos tipos I e III com aproximadamente 31 e 32 dias, respectivamente. De acordo com Czubryt (2012), durante as fases de proliferação e remodelação da cicatrização, a síntese da matriz extracelular inicialmente supera a degradação. No entanto, eventualmente um estado estacionário ocorre entre esses processos, o que coincide com a maturação da cicatriz. Por outro lado a cicatrização excessiva ocorre quando a síntese da matriz permanece elevada por mais tempo que o considerado como normal o que resulta em excesso na produção de colágenos e de outros componentes. Portanto, embora os colágenos sejam essenciais para a integridade estrutural e resistência mecânica dos tecidos, o seu acúmulo anormal pode ocasionar fibrose (Lefebvre-Lavoie et al. 2005, Young & McNaught 2011). A maior expressão dos genes desses colágenos no grupo

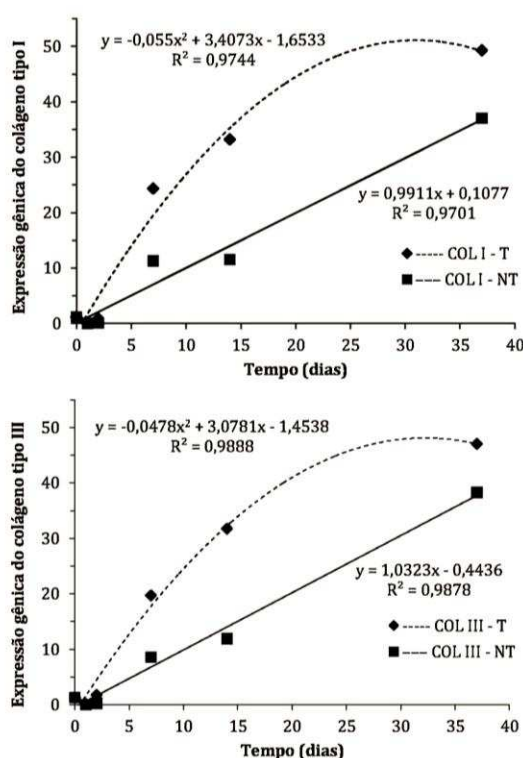


Fig.2. Estimativa da expressão gênica dos colágenos tipos I (COL I) e III (COL III) nos grupos não tratado (NT) e tratado (T), em função do tempo.

tratado pode estar relacionada à presença dos fatores de crescimentos TGF- β e PDGF, que são alguns dos considerados como mais importantes no PRP, e que estão associados à produção dos colágenos (Schwartz et al. 2002). Nesse contexto, a tendência de estabilização na expressão dos colágenos no grupo tratado é um aspecto positivo do PRP. É importante ressaltar que esses fatores de crescimentos são encontrados em condições naturais no processo de cicatrização, sendo possivelmente responsáveis pela importante expressão dos colágenos no grupo controle.

A comparação da expressão dos colágenos (I ou III) por grupo revelou que tanto no tratado como no controle, o tipo III foi mais expresso ($p < 0,05$) em relação ao tipo I 48 h após indução da lesão. Nos demais tempos a expressão não diferenciou. Essa comparação foi possível porque os oligos utilizados para o gene COLIII (COL3 1) apresentaram eficiência de reação ($R^2 = 0,9912$) similar aos oligos utilizados para o gene COLI (COL1 2; $R^2 = 0,9635$). Esse resultado era esperado, pois no estágio inicial do processo de cicatrização ocorre excessiva deposição do colágeno do tipo III, e posteriormente predomina o do tipo I.

A permanência elevada, particularmente do colágeno tipo III na avaliação final, sugere que a ferida ainda se

encontrava na fase caracterizada por Schultz et al. (2011) como de contração e remodelação, apesar de se mostrarem macroscopicamente cicatrizadas. Essa fase é caracterizada pela diminuição no número de fibroblastos e equilíbrio entre a produção e lise do colágeno. A produção do colágeno deve se manter elevada, mas com predomínio das fibras colágenas funcionalmente orientadas sobre as não funcionais e sem que ocorra aumento no tamanho da cicatriz (Theoret 2008). Por outro lado, de acordo com Schultz et al. (2005), 40 dias após lesão ainda não existe organização suficiente das fibras colágenas. Nesse contexto, a macroscopia não necessariamente corresponde à microscopia nem a expressão de genes de colágenos, pois a natureza dos componentes da matriz da ferida altera ao longo do tempo. Na realidade, durante um período de vários meses ocorrem mudanças na organização do colágeno no tecido em processo de reparação, o que irá aumentar lentamente a resistência do tecido à tração, e que chegará a aproximadamente 80% da correspondente ao tecido normal (Schultz et al. 2005, Enoch & Leaper 2007, Young & McNaught 2011).

Yamauchi & Mechanic (1988) definem esse estágio do processo de cicatrização após fechamento clínico como intermediário. De acordo com estes autores, embora a ferida se mostre aparentemente cicatrizada, existem alterações químicas e estruturais ainda em andamento. Nessa etapa, as fibrilas de colágeno se mostram agrupadas e estabilizadas pela formação de ligações cruzadas inter e intra-moleculares. Portanto, essa elevada expressão do gene do colágeno ainda nessa etapa intermediária pode ser devido ao fato de que a síntese do colágeno ainda exceda a sua degradação extracelular, de modo que continua aumentando durante a fase de formação da cicatriz (Mutsaers et al. 1997). Mais especificamente, Young & McNaught (2011) mencionam até dois anos para a maturação do tecido cicatricial, de forma que uma ferida possa adquirir um epitélio o mais próximo possível ao sadio. Nessa fase deve haver equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno por colagenases oriundas dos fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, que quebram a molécula em pequenos fragmentos, que por sua vez se desnaturam e são digeridos por outras proteases. Conforme mencionado anteriormente, nos resultados apresentados nota-se que existe uma tendência a estabilizar a expressão dos colágenos no grupo tratado com PRP, o que é adequado. Para comprovação ou não desse achado será necessária, em pesquisa futura, avaliar a expressão gênica do colágeno em momentos (tempos) posteriores à cicatrização clínica.

A comparação dos resultados obtidos na presente pesquisa com outras realizadas em pele de equino é praticamente impossível, pois são raros os estudos que avaliaram a expressão gênica dos colágenos na pele tratada com PRP utilizando a técnica de qRT-PCR. A comparação com estudos que utilizaram outras metodologias para avaliar o comportamento dos colágenos durante o processo de cicatrização também é difícil, pois os estudos controlados e *in vivo* são escassos e, em geral, objetivam avaliar de forma muito pontual um tempo específico nas diferentes fases do processo de cicatrização cutânea. Adicionalmente, a maioria dos experimentos foi realizada com culturas de células

de tendão ou ligamento. Até a presente data, apenas Monteiro et al. (2009) estudaram a expressão gênica dos colágenos tipos I e III por PCR em feridas de equinos tratadas com PRP, entretanto essa avaliação ocorreu apenas após completa cicatrização das lesões. Os autores compararam a proporção média para a expressão do mRNA para o colágeno tipo I em relação ao III, mas não encontraram diferença ($p>0,05$) entre grupos tratados e não tratados nos valores médios, que foram de $0,502\pm0,155$ e $0,542\pm0,118$, respectivamente. Carvalho et al. (2013) avaliaram a expressão gênica dos colágenos tipos I e III em tendinopatia tratada com células tronco mesenquimais associada a concentrado de plaquetas. Os autores também não encontraram diferenças entre os grupos tratado e controle (que recebeu tampão fosfato salino) na avaliação realizada 16 semanas após o tratamento, ou seja, na fase de remodelação do processo de reparação tendínea.

Apesar dos resultados obtidos não poderem ser comparados com os de outros estudos, os dados apresentados são inéditos e valiosos para a medicina veterinária. Avaliar alterações em componentes da matriz extracelular é uma forma adequada de monitorar a reparação de tecidos. O colágeno, por ser o componente mais abundante do tecido conjuntivo, é fundamental durante a restauração da funcionalidade da pele, e reflete a qualidade da matriz. O presente estudo demonstrou a importância do PRP na expressão de colágenos em diferentes fases do processo de cicatrização cutânea em equinos, o que confirma o seu efeito anabólico. O ensaio experimental executado em diferentes momentos possibilitou acompanhar a dinâmica do processo cicatricial. A técnica utilizada, a qRT-PCR, é altamente sensível, confiável e facilmente executada, sendo de escolha para pesquisa sobre a expressão gênica em diferentes componentes biológicos. Por outro lado, ainda que os raros estudos possuam dados valiosos sobre densidade, quantificação e/ou expressão gênica dos colágenos na pele de equinos, o perfil dessa expressão na ferida tratada com PRP ainda deve ser mais bem caracterizado. Obtenção de amostras de pele para avaliação de componentes da matriz extracelular, a partir de diferentes períodos após cicatrização macroscópica da lesão, poderá fornecer informações inéditas, e comprovar ou não uma tendência já sinalizada no presente estudo, que é a estabilização mais precoce dos colágenos em feridas tratadas com uma única aplicação do componente rico em plaquetas.

CONCLUSÃO

A administração local de PRP 12h após indução cirúrgica de lesão cutânea na região glútea de equinos resulta em importante aumento da expressão gênica dos colágenos tipos I e III. Entretanto, essa maior expressão não resulta em fechamento mais rápido da ferida cirúrgica.

Agradecimentos. Os autores agradecem à FAPEMIG, à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurdin P. & Nurdin A.T. 2004. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91:4-15.

- Argüelles D., Carmona J.U., Pastor J., Iborra A., Vinals L., Martínez P., Bach E. & Prades M. 2006. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res. Vet. Sci.* 81:237-245.
- Bames G.L., Kostelnik P.J., Gerstenfeld L.C. & Einhorn T.A. 1999. Growth factor regulation of fracture repair. *J. Bone Miner. Res.* 14:1805-1815.
- Bailey A.J., Bazin S., Sims T.J., Le Lous M., Nicholetis C. & Delaunay A. 1975. Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. *Biochim. Biophys. Acta.* 405:412-421.
- Boswell S.G., Cole B.J., Sundman E.A., Karas V. & Fortier L.A. 2012. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28:429-439.
- Boswell S.G., Schnabel L.V., Mohammed H.O., Sundman E.A., Minas T. & Fortier L.A. 2014. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am. J. Sports Med.* 42:42-49.
- Carter C.A., Jolly D.G., Worden C.E., Hendren D.G. & Kane C.J.M. 2003. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.* 74:244-255.
- Carvalho A.M., Badial P.R., Álvarez L.E.C., Yamada A.L.M., Borges A.S., Deffune E., Hussni C.A. & Alves A.L.G. 2013. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res. Ther.* 4:1-13.
- Czubryt M.P. 2012. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5:1-11.
- De Rossi R., Coelho A.C.A.O., Mello G.S., Frazilio F.O., Leal R.B., Facco G.G. & Brum K.B. 2009. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horse. *Acta Cir. Bras.* 24:276-281.
- Deschene K., Céleste C., Boerboom D. & Theoret C.L. 2011. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. *Wound Repair Regen.* 19:250-259.
- Enoch S. & Leaper D.J. 2007. Basic science of wound healing. *Surg.* 26:31-37.
- Ferreira J.C., Souza M.V., Vilória M.I.V., Fonseca E.F., Vianna M.W.S. & Costa J.C.M. 2007. Efeitos da monofenilbutazona na cicatrização por segunda intenção em equinos. *Ceres* 54:263-270.
- Graziani F., Ivanovski S., Cei S., Ducci F., Tonetti M. & Gabriele M. 2006. The *in vitro* effect of diferente PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin. Oral Implants Res.* 17:212-219.
- Greenwood J.E. 2010. Function of the panniculus carnosus - a hypothesis. *Vet. Rec.* 167:760.
- Jacobsen L.C., Sorensen O.E., Cowland J.B., Borregaard N. & Theilgaard-Mönch K. 2008. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 83:1155-1164.
- Lefebvre-Lavoie J., Lussier J.G. & Theoret C.L. 2005. Profiling of differentially expressed genes in wound margin biopsies of horses using suppression subtractive hybridization. *Physiol. Genomics* 22:157-170.
- Liu S.H., Yang R.S., al-Shaikh R. & Lane J.M. 1995. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 318:265-278.
- Maia L., Souza M.V., Ribeiro Júnior J.I., Oliveira A.C., Alves G.E.S., Anjos L.B., Silva Y.F.R.S., Zandim B.M. & Moreira J.D.C.L. 2009. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J. Equine Vet. Sci.* 29:618-626.
- Maciel F.B., DeRossi R., Módio T.J.C., Pagliosa R.C., Leal C.R.J. & Delben A.A.S.T. 2012. Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. *Burns* 38:1058-1065.
- Marsolais D. & Frenett J. 2005. Inflammation and tendon healing. *Med. Sci.* 21:180-186.
- Mignatti P., Rifkin D.B., Welgus H.G. & Parks W.C. 1996. Proteinases and tissue remodeling. p.427-474. In: Clark R.A.F. (Ed.), *The Molecular Biology of Wound Repair*. 2nd ed. Plenum Press, New York.
- Mishra A. & Pavelko T. 2006. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am. J. Sports Med.* 34:1774-1778.
- Monteiro S.O., Lepage O.M. & Theoret C.L. 2009. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am. J. Vet. Res.* 70:277-282.
- Mutsaers S.E., Bishop J.E., McGrouther G. & Laurent G.J. 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Znt. J. Biochem. Cell Biol.* 29:5-17.
- Rees H.M. & Ecker E.E. 1923. An improved method for counting blood platelets. *J. Am. Med. Assoc.* 80:621-622.
- Ruszczak Z. 2003. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28:1595-611.
- Schwartz A.J., Wilson D.A., Keegan K.G., Ganjam V.L., Sun Y., Weber K.T. & Zhang J. 2002. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am. J. Vet. Res.* 63:1564-1570.
- Schultz G.S., Davidson J.M., Kirsner R.S., Bornstein P. & Herman H. 2011. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen.* 19:134-148.
- Schultz G.S., Ladwig G. & Wysocki A. 2005. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. *World Wide Wounds*. Disponível em <<http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrac-Matric-Acute-Chronic-Wounds.html>> Acessado em 29 out. 2013.
- Soo C., Sayah D.N., Zhang X., Beanes S.R., Nishimura I., Dang C., Freymiller E. & Ting K. 2002. The identification of novel wound-healing genes through differential display. *Plast. Reconstr. Surg.* 110:787-797.
- Theoret C.L. 2008. Wound healing. p.5-27. In: Stashak T.D. & Theoret C.L. (Eds), *Equine Wound Management*. 2nd ed. Blackwell Publishing, Iowa.
- Theoret C.L., Olutoye O.O., Parnell L.K.S. & Hicks J. 2013. Equine exuberant granulation tissue and human keloids: a comparative histopathologic study. *Vet. Surg.* 42:783-789.
- Thrall M.A. 2007. Diagnóstico dos distúrbios hemorrágicos, p.170-187. In: *Ibid.* (Ed.), *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Roca, São Paulo.
- Vendruscolo C.P., Carvalho A.M., Moraes L.F., Maia L., Queiroz D.L., Watanabe M.J., Yamada A.L.M. & Aves A.L. 2012. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. *Pesq. Vet. Bras.* 32:106-110.
- Wasterlain A.S., Braun H.J. & Dragoo J.L. 2012. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper. Tech. Orthop.* 22:33-42.
- Yamauchi M. & Mechanic G.L. 1988. Cross-linking of collagen, p.35-92. In: Nimni M.E. (Ed.), *Collagen*. Vol.1. CRC Press, Florida.
- Yang L., Witten T.M. & Pidaparti R.M.A. A biomechanical model of wound contraction and scar formation. *J. Theor. Biol.* 332:228-248.
- Young A. & McNaught C.E. 2011. The physiology of wound healing. *Surgery* 29:475-479.
- Zandim B.M., Souza M.V., Frassy L.M., Vilória M.I.V., Maia L., Fonseca C.C., Valente F.V., Moreira J.C.L. & Magalhães P.C. 2013. Immunohistochemistry of factor VIII, histology and morphometry in equine tendon treated with platelet-rich plasma. *Revta Bras. Med. Vet.* 35:169-184.

6. CAPÍTULO - 3

Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas

PINTO, José de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril, 2016. **Cinética biomolecular de fatores de crescimento e colágeno envolvidos na cicatrização de pele tratada com plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos: modelo experimental em equinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas¹

Maria V. de Souza^{2*}, José de O. Pinto³, Marcela M. da Costa⁴, Eliziária C. dos Santos⁵,
Silvana L.R. Garcia⁶ e Leandro L. de Oliveira⁷

ABSTRACT.- Souza M.V., Pinto J.O., Costa M.M., Santos E.C., Garcia S.L.R. & Oliveira L.L. 2014. [Quantification of growth factors in horse skin treated with platelet-rich plasma.] Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(6):599-612. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000, Brazil. E-mail: msouza@ufv.br

Platelet-rich plasma (PRP) is a product derived from total blood centrifugation, rich in bioactive factors, such as growth factors. Despite largely used in healing processes, there is a controversy whether the therapy is effective in promoting skin healing. The objective of this study was to quantify and compare the concentrations of the factors TGF- β 1 and PDGF-BB in PRP, blood plasma and skin, at different phases of the healing process of skin treated or not with PRP. Seven healthy crossbred 16 to 17-year-old geldings (16.14 ± 0.63) were used. Three quadrangular-shaped lesions (6.25cm^2) were surgically induced into the right and left gluteal regions of all animals. Twelve hours after induction of the wounds, 0.5mL of the PRP was administered in each of the four edges of the wound in one of the gluteal regions (Treated group = TG) randomly chosen. The contralateral region was used as control (CG). The wounds were submitted to daily cleaning with Milli-Q water, and samples were obtained with a 6mm diameter biopsy Punch. Six skin biopsies were obtained, the first carried out immediately after the production of the wound (T0), and the others 1 (T1), 2 (T2), 7 (T3), and 14 (T4) days after the lesion was induced. The sixth biopsy (T5) was obtained after complete healing of the skin, which occurred at about day 37 (36.85 ± 7.45 , CG; 38.85 ± 6.46 , TG). EDTA blood samples were also obtained, at all the times mentioned. Quantification of TGF- β 1 and PDGF-BB growth factors on the skin, PRP, and blood plasma was carried out by the ELISA technique. Data were statistically analyzed by the t test, Pearson correlation and regression, at a significance level of 5%. No difference was found between the groups in the values of the two growth factors measured on the skin, at the different times. Also, no correlation was found between the amount of growth factors present in the skin and plasma. On the other hand, a positive correlation was observed between PRP and skin in the treated group, for the growth factors TGF- β 1 ($r=0.31$) and PDGF-BB ($r=0.38$), as well as between both growth factors present in PRP ($r=0.81$). Considering the growth factor concentrations at T0, the highest skin values ($p<0.05$) of TGF- β 1, in both groups, occurred at T3 and T5. Higher values ($p<0.05$) of PDGF-BB occurred at T4 (TG) and T5 (CG). No plasma changes occurred at the concentration of these factors in relation to T0, suggest-

¹ Recebido em 5 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 5 de junho de 2014.

² Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Universitário, Avenida Peter Henry Rolfs s/n, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. *Autor para correspondência: msouza@ufv.br

³ Doutorado do Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Avenida Peter Henry Rolfs s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: jolip2004@yahoo.com.br

⁴ Graduanda do Departamento de Veterinária, Universidade Federal de

Viçosa, Campus Universitário, Avenida Peter Henry Rolfs s/n, Viçosa, MG 36570-000. Bolsista PIBIC-CNPq. E-mail: marcela.martins@ufv.br

⁵ Doutorado do Departamento de Biologia Geral, UFV, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: lisacardoso2000@yahoo.com.br

⁶ Instituto Viçosense de Ensino e Pesquisa, Faculdade de Viçosa (FDV), Rua Dr. Milton Bandeira 380, Centro, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: garciaslr@yahoo.com.br

⁷ Departamento de Biologia Geral, UFV, Campus Universitário s/n, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: leandro.licursi@ufv.br

ing that PRP does not cause a systemic effect when the procedures adopted in this research are used. Local administration of PRP in the volume studied, 12 h after surgical induction of cutaneous wound gluteal equine does not cause higher concentrations of the growth factors TGF- β 1 and PDGF-BB in the plasma and skin during the healing process.

INDEX TERMS: Horses, platelet-rich concentrate, dermatopathy, systemic effect, ELISA.

RESUMO. - O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado da centrifugação do sangue total, sendo rico em fatores bioativos, como os de crescimento. Apesar da ampla utilização em processos cicatrícios, há controvérsia sobre a eficácia da terapia na cicatrização cutânea. O objetivo desse estudo foi quantificar e comparar a concentração dos fatores TGF- β 1 e PDGF-BB no PRP, plasma sanguíneo e pele, durante diferentes fases do processo de cicatrização da pele tratada ou não com PRP. Foram utilizados sete equinos machos castrados, mestiços, hígidos, com idade entre 16 e 17 ($16,14 \pm 0,63$) anos. Três lesões em formato quadrangular ($6,25\text{cm}^2$) foram produzidas cirurgicamente nas regiões glúteas direita e esquerda de todos os animais. Doze horas após indução das feridas, 0,5mL do PRP foi administrado em cada uma das quatro extremidades das feridas de uma das regiões glúteas (Grupo tratado = GT), escolhida aleatoriamente. A região contralateral foi utilizada como controle (GC). As feridas foram submetidas à limpeza diária com água Milli Q, e amostras foram obtidas mediante biópsias realizadas com Punch de 6mm. Foram obtidas seis biópsias de pele, sendo a primeira realizada logo após a produção da ferida (T0), e as demais com 1 (T1) 2 (T2) 7 (T3) e 14 (T4) dias após a indução da lesão. A sexta biópsia (T5) foi obtida após completo fechamento da pele, que ocorreu aproximadamente aos 37 dias ($36,85 \pm 7,45$, GC; $38,85 \pm 6,46$, GT). Também foram obtidas amostras de sangue com EDTA em todos os tempos mencionados. A quantificação dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB na pele, PRP e plasma sanguíneo foi realizada pela técnica ELISA. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t, correlação de Pearson e regressão, utilizando nível de significância de 5%. Não houve diferença entre os grupos, nos valores dos dois fatores de crescimento mensurados na pele, nos diferentes tempos. Também não houve correlação entre a quantidade dos fatores de crescimento presentes na pele e no plasma. Por outro lado, correlação positiva foi observada entre PRP e pele no grupo tratado, para os fatores de crescimento TGF- β 1 ($r=0,31$) e PDGF-BB ($r=0,38$), bem como entre ambos os fatores de crescimento presentes no PRP ($r=0,81$). Considerando as concentrações dos fatores de crescimento no T0, os maiores valores cutâneos ($p<0,05$) do TGF- β 1, em ambos os grupos, ocorreram nos tempos T3 e T5. Valores mais elevados ($p<0,05$) do PDGF-BB ocorreram no T4 (GT) e T5 (GC). No plasma não houve alteração nas concentrações desses fatores em relação ao T0, o que sugere que o PRP não acarreta efeito sistêmico, quando os procedimentos adotados na presente pesquisa são utilizados. A administração local de PRP no volume estudado, 12 h após indução cirúrgica de ferida cutânea na região glútea de equinos não ocasiona maiores concentrações dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB no plasma sanguíneo e pele, durante o processo de cicatrização.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cavalos, concentrado rico em plaquetas, dermatopatia, efeito sistêmico, ELISA.

INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado da centrifugação do sangue total, sendo rico em fatores de crescimento e proteínas estruturais. A concentração das plaquetas depende do sistema utilizado para processamento e dos valores apresentados pelo paciente no momento da coleta do sangue (Boswell et al. 2012). Apesar do seu uso ser considerado uma terapia relativamente antiga, a sua utilização na espécie equina é mais recente, com relatos para tratamento de feridas cutâneas (Carter et al. 2003, De Rossi et al. 2009, Monteiro et al. 2009), tendinopatias (Argüelles et al. 2008, Maia et al. 2009a,b, Bosch et al. 2011, Zandim et al. 2013), desmopatias (Waselau et al. 2008), lesões articulares (Carmona et al. 2007, Yamada et al. 2012), fraturas (Carmona & López 2011) e, inclusive, laminite (Carmona et al. 2013a). Também já foi utilizado associado a células mesenquimatosas do estroma da medula óssea para tratamento de tendinopatias e desmopatias (Renzi et al. 2013).

Existem vários fatores de crescimento que são liberados a partir dos α -grânulos presentes nas plaquetas, sendo alguns dos principais disponíveis no PRP o transformante beta 1 (TGF- β 1), derivado das plaquetas (PDGF), fibroblástico básico (bFGF), epitelial (EGF) e o endotelial vascular (VEGF) (Anitua et al. 2012, Boswell et al. 2012, Renzi et al. 2013). Considera-se que a liberação dos fatores de crescimento pelas plaquetas contidas no PRP pode favorecer a reparação das lesões, e possibilitar o mais rápido retorno à funcionalidade, possivelmente por estimular a neovascularização, que melhora o suprimento sanguíneo e disponibiliza nutrientes necessários à regeneração tecidual.

Considerando a concentração de plaquetas, leucócitos e hemácias em um determinado volume de plasma, existem pelo menos três métodos para a preparação do PRP: aférese (automático), que possibilita a captura de plaquetas pela utilização de filtro descartável; buffy-coat (semi-automático), que permite a separação das plaquetas por centrifugação utilizando kits comerciais (sistemas ACP, GPS II, GPS III, SmartPreP2, etc), e o manual, resultante da centrifugação do sangue total armazenado em tubos contendo anticoagulante. Os custos variam bastante; kits comerciais produzem concentrados de PRP a um valor elevado, e a técnica manual com dupla centrifugação, além de ter menor custo, é de fácil feitura (Maffulli & del Buono 2012).

O TGF- β é considerado um dos mais importantes fatores de crescimento para o processo de cicatrização cutânea por auxiliar na angiogênese, quimiotaxia e proliferação celular. Adicionalmente, tanto essa proteína como o PDGF estimulam a produção de colágenos, que são os principais compo-

nentes estruturais do tecido cicatricial maduro, sendo sintetizados por fibroblastos (Czubryt 2012, Yang et al. 2013). As isoformas TGF- β 1 e PDGF-BB são as mais frequentemente utilizadas para avaliar a qualidade dos componentes ricos em plaquetas pela técnica imunoenzimática ELISA, e os kits humanos disponíveis possuem comprovada reação cruzada com os anticorpos da espécie equina.

Apesar da utilização do PRP como opção terapêutica em diversas enfermidades, não há evidências suficientes que confirmem a sua eficácia no tratamento de feridas cutâneas. Isso se deve, em parte, a região do corpo submetida ao tratamento, a forma de obtenção e composição do PRP (considerando a quantidade de plaquetas e leucócitos), forma de apresentação (líquido; gel), via e frequência de aplicação, volume e momento em que é administrado durante o processo de cicatrização da pele, entre outros aspectos. Adicionalmente, são raras as pesquisas avaliando a resposta à terapia utilizando técnica com alta especificidade e sensibilidade como a ELISA. Portanto, investigação como essa contribui para validação e maior conhecimento da eficácia do plasma rico em plaquetas. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi quantificar e comparar a concentração dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB no PRP, plasma sanguíneo e pele, durante diferentes fases do processo de cicatrização cutânea.

MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) sob o número de protocolo 96/2011. Os procedimentos foram realizados de acordo com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, os princípios éticos para pesquisa animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Legislação Brasileira vigente.

Foram selecionados sete equinos mestiços hígidos, machos castrados, com idade entre 16 e 17 ($16,14 \pm 0,63$) anos. Apenas animais aparentemente saudáveis durante exame físico geral e sem afecção dermatológica foram incluídos no experimento.

Os equinos foram colocados em baias individuais de 20m², quinze dias antes do início do experimento, onde foram alimentados com feno de tifton 85 e capim elefante picado (*Pennisetum purpureum*), além de ração farelada própria para equinos. Sal mineral e água foram deixados *ad libitum*. Esse manejo foi mantido durante toda etapa experimental.

Os animais foram pesados, pulverizados com solução carpatocida contendo deltametrina e vermífugos com moxidectina (0,2mg/kg/oral), para a eliminação de endo e ectoparasitas. As baias foram limpas duas vezes ao dia para retirada de excretas e reposição da cama.

Três lesões de pele em formato quadrangular foram produzidas nas regiões glúteas direita e esquerda de todos os animais, conforme descrito por Ferreira et al. (2007). Para isso, os locais foram tricotomizados e submetidos à antissepsia local com digluconato clorexidina degermante a 2% e alcoólico a 0,5%. Os animais foram sedados com xilazina a 2% (0,8mg/kg/IV), e em seguida foi realizado bloqueio anestésico subcutâneo com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, ao redor do local a ser incisado, utilizando agulha de 21 G.

Para produção das feridas cirúrgicas foi utilizado bisturi com lâmina nº23, e um molde de plástico em formato quadrangular com 2,5cm de lado (6,25cm² de área), para a remoção dos frag-

mentos de pele (epiderme, derme e tecido subcutâneo). As feridas foram identificadas em A, B e C, de cranial para caudal em ambas as garupas. Amostras de pele foram congeladas a -80°C para posterior quantificação de fatores de crescimento. Essa primeira coleta foi considerada como tempo zero (T0). As feridas cicatrizaram por segunda intenção, e durante todo este período foram monitoradas, e após plena cicatrização foi realizada a última biópsia (ferida C). A ferida cirúrgica foi submetida à limpeza diária, com gaze embebida em água Milli Q. Todos os animais receberam soro antitetânico no dia de confecção da lesão de pele. A dor foi reduzida utilizando dose única de tatarato de butorfanol (0,08mg/kg/IV). Não foi utilizado anti-inflamatório nem antibiótico, pois estes poderiam dificultar ou impossibilitar a avaliação do tratamento com PRP.

A obtenção do PRP foi baseada no protocolo descrito por Argüelles et al. (2006). Para isso, após antissepsia local com álcool-iodado, amostras de 144mL de sangue foram obtidas com agulhas vacutainer por venopunção da veia jugular externa, em 36 tubos com capacidade para 4,5mL, contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,2%. Também foram obtidas amostras de sangue com o anticoagulante EDTA para quantificação de plaquetas e leucócitos totais.

As amostras de sangue foram homogeneizadas e centrifugadas a 120xg por 10 min. Após essa primeira centrifugação, foi descartado de cada tubo 50% do plasma sanguíneo presente na superfície, e o restante foi transferido para quatro tubos de polipropileno de 10mL sem anticoagulante. O botão leucocitário e as hemácias sedimentadas foram descartados. Em seguida, o plasma foi novamente centrifugado a 240xg por 10 min. Após essa segunda centrifugação o plasma foi dividido em duas frações: o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) e a fração remanescente denominada plasma rico em plaquetas. Um volume de 75% do plasma obtido de cada tubo foi descartado e o PRP contendo o botão de plaquetas, reservado.

A concentração das plaquetas e leucócitos foi determinada manualmente (método Rees & Ecker 1923) no PRP e no sangue obtido com EDTA. A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer utilizando líquido de Türk para contagem de leucócitos e líquido de Brecher para contagem de plaquetas (Thrall 2007). Imediatamente após obtenção, 2mL do PRP foram congelados a -80°C em criotubos até o momento de quantificação dos fatores de crescimento (TGF- β 1 e PDGF-BB) pela técnica ELISA.

Todos os animais foram submetidos a tratamento local com PRP 12h depois de realizada a lesão. Após tricotomia e sedação com xilazina (0,8mg/kg/IV), uma das regiões glúteas, escolhidas ao acaso, foi assepticamente preparada para a administração do PRP (grupo tratado=GT). As feridas da região glútea contralateral (grupo controle=GC) não receberam qualquer infiltração, mas apenas limpeza local com água Milli-Q, conforme realizada também nas feridas tratadas.

O PRP foi preparado imediatamente antes da sua aplicação, que foi realizada utilizando-se agulha 24G. Cada extremidade das três feridas (A, B e C) recebeu 0,5mL do PRP, totalizando 2mL por ferida e 6mL para cada lado (esquerdo ou direito) da região glútea. Após tratamento, os animais foram mantidos em baias, sendo soltos e monitorados durante todo o experimento.

Amostras de pele foram obtidas para a quantificação dos fatores de crescimento, conforme metodologia descrita por Monteiro et al. (2009) e Deschene et al. (2011). A pele, em toda a sua espessura, foi obtida com a utilização de Punch de 6mm de diâmetro, auxiliada com bisturi, um (T1) e dois (T2) dias após realização da lesão, assim como sete (T3) e 14 (T4) dias do procedimento cirúrgico. Adicionalmente, uma nova coleta foi realizada ao término do fechamento da ferida C (T5).

Para a realização das biópsias, os animais foram sedados com xilazina a 2% (0,8mg/kg/IV) e, em seguida, foi realizado bloqueio anestésico subcutâneo com cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor, ao redor do local a ser biopsiado, utilizando agulha de 21G. Os dois primeiros tempos de biópsia realizadas nas feridas A e B corresponderam a primeira e segunda fases de cicatrização da ferida, onde predomina a hemostasia e a resposta inflamatória, enquanto as últimas três coletas se referem as fases de migração e proliferação, assim como de contração e remodelação (última coleta), quando ocorre a angiogênese, fibroplasia e epitelização. A definição dessas fases foi baseada na descrição de Schultz et al. (2011).

Com exceção da última coleta que foi realizada no centro da área cicatrizada, as amostras foram retiradas da periferia da lesão, abrangendo tanto pele íntegra como lesionada, incluindo migração ou reepitelização, e tecido de granulação, de acordo com o tempo de coleta. Foram obtidas duas amostras de pele em cada tempo (T1, T2, T3, T4 e T5), sendo uma para o TGF- β 1, e outra para o PDGF-BB. Após obtenção dos fragmentos, o excesso de sangue foi retirado de forma asséptica com NaCl a 0,9%. Na sequência as amostras foram colocadas em criotubos e, em seguida, imersas em nitrogênio líquido a -196°C por alguns segundos, e imediatamente estocadas em freezer a -80°C. Posteriormente, os fragmentos de pele foram liofilizados, pesados e voltaram a ser armazenadas a -80°C até realização da análise. Conforme mencionado anteriormente, as feridas não tratadas também foram submetidas à biópsia exatamente no mesmo dia das infiltradas com PRP.

No plasma sanguíneo, obtido mediante centrifugação do sangue total com EDTA antes do início do experimento, assim como nos mesmos dias em que as biópsias foram realizadas, também foram quantificados os fatores de crescimento. Após obtenção, o plasma foi transferido para eppendorfs e armazenado a -80°C até análise. Para a quantificação dos fatores de crescimento no PRP e plasma sanguíneo, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, e na sequência o TGF- β 1 (Quantikine TGF- β 1 Imunoassay, DB100B, R&D Systems, LGC Scientific Supply, Miami, FL, USA) e PDGF-BB (Quantikine PDGF-BB Imunoassay, DBB00, R&D Systems, LGC Scientific Supply, Miami, FL, USA) foram quantificados utilizando kits humanos que comprovadamente possuem reação cruzada com anticorpos equinos (Theoret et al. 2001, Sutter et al. 2004, McCarrrel & Fortier 2009, Monteiro et al. 2009, Textor et al. 2011). As concentrações foram determinadas em duplicata, seguindo as instruções do fabricante.

Para a quantificação dos fatores de crescimento, as amostras de PRP foram diluídas na proporção 1:24 e 1:48 para PDGF-BB e TGF- β 1, respectivamente. No plasma sanguíneo essa diluição foi respectivamente de 1:20 e 1:40. Conforme recomendação do fabricante, todas as amostras utilizadas para quantificação do TGF- β 1 foram ativadas no dia do procedimento de análise, utilizando HCl 12 N, NaOH 10 N e HEPES, na quantidade recomendada pelo fabricante do kit.

Para extração da proteína as amostras de pele foram descongeladas à temperatura ambiente e colocadas a -4°C durante 12h em eppendorfs contendo 1mL do reagente (M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent, CMS Instrumentos Analíticos Ltda, Cosmópolis, SP). Após esse período, as amostras foram transferidas para eppendorfs e, na sequência, centrifugadas a 7.000xg por 10 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para eppendorfs, para posterior quantificação da proteína total e dos fatores de crescimento.

A dosagem da proteína total foi determinada utilizando o método de BCA, sendo utilizada uma curva padrão com albumina (2mg/mL). As amostras foram diluídas com água destilada na proporção 1:50. Em seguida 10 μ L das amostras e da curva padrão foram colocadas em microplaca, e na sequência foi adicionado

190 μ L do BCA misturado com CuSO₄. A placa foi incubada em estufa a 37°C durante 30 min, sendo a quantificação realizada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de absorvância fixado em 562nm. O resultado foi obtido por meio de curva de regressão linear, sendo normalizados para o peso seco do tecido original. A quantificação dos fatores de crescimento na pele seguiram os procedimentos indicados nos kits de ELISA, sendo as amostras diluídas em 1:4 e 1:2 para TGF- β 1 e PDGF-BB, respectivamente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas, com comprimento de onda de absorvância fixado em 450nm. A leitura foi realizada em duplicata.

A análise estatística foi realizada no software StatSoft 12.0, 2013 (www.statsoft.com). O teste t para amostras independentes foi utilizado para comparar os grupos controle e tratado em cada tempo (T0, T1, T2, T3, T4 e T5), bem como em cada fase de cicatrização (hemostasia e inflamatória, versus migração e proliferação, juntamente com contração e remodelação). Além disso, foram comparados os diferentes tempos com a situação inicial (T0) em ambos os grupos utilizando o teste t para dados pareados. Análise de regressão foi realizada para todos os fatores de crescimento, com a finalidade de verificar o efeito do tempo (T0, T1, T2, T3, T4 e T5, que correspondeu a 1, 2, 7, 14 e 37 dias, respectivamente) na concentração dos mesmos. Correlação de Pearson, testada pelo teste t, foi realizada para avaliar a associação entre a quantidade dos fatores de crescimento nas plaquetas e nos leucócitos com a do PRP, assim como entre PRP, pele e plasma. Também foi avaliada a correlação entre os dois fatores de crescimento no PRP. Todas as análises foram realizadas a 5% de significância.

RESULTADOS

O tempo máximo necessário para cicatrização das lesões foi de 47 dias em ambos os grupos, sendo os valores médios de 36,85 $\pm$ 7,45 dias nas feridas controles, e de 38,85 $\pm$ 6,46 dias nas tratadas.

No sangue total e PRP os valores de plaquetas variaram de 100.000 a 150.000 plaquetas/ μ L, e de 320.000 a 390.000 plaquetas/ μ L, respectivamente. Já os valores médios de leucócitos variaram respectivamente de 5.600 a 10.900 células/ μ L e de 50 a 900 células/ μ L no sangue total e PRP. O PRP utilizado possuía aproximadamente 2,8x mais plaquetas e 17x menos leucócitos do que o sangue total.

Não houve diferença ($p>0,05$) entre grupos tratado e controle com respeito à concentração dos fatores de crescimento na pele, em cada tempo (T1, T2, T3, T4 e T5) avaliado. Análise de regressão revelou que a concentração do PDGF-BB foi influenciada pelo tempo, tanto na pele como no plasma, apenas no grupo controle (Fig.1). Na pele sadia (T0), a concentração de TGF- β 1 e PDGF-BB foi de 0,94 $\pm$ 0,69pg/g e 0,11 $\pm$ 0,19pg/g, respectivamente. A exceção da concentração TGF- β 1 obtida no primeiro tempo avaliado (T1) no grupo controle após indução da lesão, todas as demais amostras apresentaram valores desse fator de crescimento significativamente maiores (Quadro 1) do que a obtida na pele íntegra. No segundo dia após lesão, a concentração do TGF- β 1 na pele elevou em ambos os grupos (GC: $p=0,0009$; GT: $p=0,002$). Esse aumento foi importante ($p=0,0004$) uma semana após indução da ferida (GC: 32,11 $\pm$ 11,80pg/g; GT: 31,66 $\pm$ 14,64pg/g). Na determinação realizada após duas semanas, os valores de TGF- β 1 foram abaixo dos obtidos na primeira semana, mas significativamente maiores (GC: $p=0,004$; GT: $p=0,0009$) do que a quantidade presente na

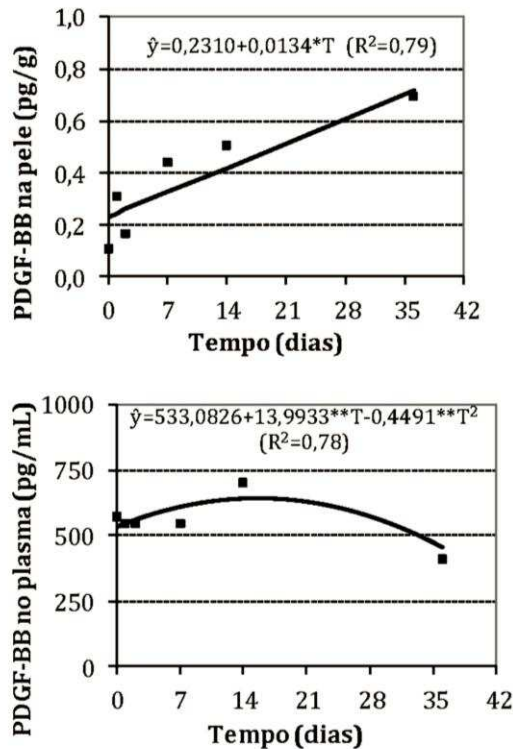


Fig.1. Estimativa do PDGF-BB, em função do tempo, na pele (a) e no plasma sanguíneo (b) dos animais do grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Quadro 1. Valores médios e desvios padrão do TGF- β 1 na pele e plasma sanguíneo dos sete equinos em cada tempo

Tempo (dias)	TGF- β 1 na pele (pg/g)		TGF- β 1 no plasma (pg/mL)
	Controle	Tratado	
0	0,94 $\pm$ 0,69	0,94 $\pm$ 0,69	2.527,61 $\pm$ 1.229,93
1	19,15 $\pm$ 24,42 A	14,99 $\pm$ 5,35 A*	2.440,34 $\pm$ 736,46
2	11,65 $\pm$ 4,86 A*	14,24 $\pm$ 6,84 A*	2.889,31 $\pm$ 779,88
7	32,11 $\pm$ 11,80 A*	31,66 $\pm$ 14,64 A*	2.875,01 $\pm$ 867,77
14	18,23 $\pm$ 10,54 A*	19,17 $\pm$ 8,02 A*	3.068,74 $\pm$ 794,10
37	36,31 $\pm$ 16,59 A*	24,29 $\pm$ 12,67 A*	2.505,27 $\pm$ 995,54
Fases de hemostasia e inflamatória**	15,40 $\pm$ 17,35 Ab	14,61 $\pm$ 5,91 Ab	
Demais fases***	28,88 $\pm$ 14,85 Aa	25,04 $\pm$ 12,62 Aa	

Valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes entre colunas, e letras minúsculas entre linhas diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste t. * Estatisticamente diferente do tempo 0, a 5% de probabilidade, pelo teste t, ** Representadas nos dias 1 e 2, *** Representadas nos dias 7, 14 e 37.

pele íntegra. Na última avaliação realizada, o que ocorreu em média aos 37 dias, foi observado um novo pico de elevação do fator de crescimento (GC: $p = 0,001$; GT: $p = 0,003$).

Os valores do PDGF-BB durante todo o período de cicatrização, incluindo o fechamento da ferida estão apresentados no Quadro 2. Esses valores não foram estatisticamente

Quadro 2. Valores médios e desvios padrão do PDGF-BB na pele e plasma sanguíneo nos sete equinos em cada tempo

Tempo (dias)	PDGF-BB na pele (pg/g)		PDGF-BB no plasma (pg/mL)
	Controle	Tratado	
0	0,11 $\pm$ 0,19	0,11 $\pm$ 0,19	573,41 $\pm$ 374,52
1	0,31 $\pm$ 0,48A	0,21 $\pm$ 0,34A	389,46 $\pm$ 376,10
2	0,16 $\pm$ 0,26A	0,46 $\pm$ 0,57A	544,17 $\pm$ 187,92
7	0,44 $\pm$ 0,43A	0,53 $\pm$ 0,52A	544,34 $\pm$ 292,17
14	0,50 $\pm$ 0,43A	0,35 $\pm$ 0,32A*	704,26 $\pm$ 193,10
37	0,69 $\pm$ 0,57A*	0,27 $\pm$ 0,42A	412,32 $\pm$ 157,92
Fases de hemostasia e inflamatória**	0,24 $\pm$ 0,38Ab	0,34 $\pm$ 0,47Aa	
Demais fases***	0,54 $\pm$ 0,47 Aa	0,38 $\pm$ 0,42 Aa	

Valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes entre colunas, e letras minúsculas entre linhas diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste t.

* Estatisticamente diferente do tempo 0, a 5% de probabilidade, pelo teste t, ** Representadas nos dias 1 e 2, *** Representadas nos dias 7, 14 e 37.

diferentes da pele íntegra até a primeira semana depois de realizada a lesão. No grupo tratado ocorreu elevação ($0,35 \pm 0,32$ pg/g, $p = 0,01$) da concentração do PDGF-BB com relação ao tempo zero ($0,11 \pm 0,19$ pg/g) na amostragem realizada com duas semanas. O mesmo foi observado no grupo controle ($0,69 \pm 0,57$ pg/g, $p = 0,04$) na avaliação efetuada na amostra obtida após fechamento da ferida.

Conforme demonstrado nos Quadros 1 e 2 não houve diferença entre grupos, na quantificação dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB, quando as fases de hemostasia e inflamatória foram comparadas com as demais. Entretanto, a comparação entre fases tanto no grupo tratado como no controle revelou diferença ($p < 0,05$) para o TGF- β 1, com menores valores dos fatores de crescimento nas fases de hemostasia e inflamatória. O mesmo ocorreu para o PDGF-BB no grupo controle.

Os valores médios de TGF- β 1 e PDGF-BB no plasma, no momento imediatamente antes do início da indução da lesão (T0) foram de $2.527,61 \pm 1.229,93$ pg/mL e $573,41 \pm 374,52$ pg/mL, respectivamente (Quadros 1 e 2). Já no PRP os valores médios foram de $8.693,8 \pm 3.362,58$ pg/mL e $3.964,25 \pm 2.224,19$ pg/mL, respectivamente. Os valores mínimos e máximos foram de 4.764,00 e 13.529,76 pg/mL e de 1.069,2 e 7.470,48 pg/mL para o TGF- β 1 e PDGF-BB, respectivamente. Portanto, o PRP apresentou respectivamente, 3x e 7x mais TGF- β 1 e PDGF-BB do que o plasma sanguíneo.

Não houve diferença, ao longo do tempo, na concentração dos dois fatores de crescimento avaliados no plasma sanguíneo. Não foi constatada correlação entre a concentração dos fatores de crescimento no PRP e a contagem de plaquetas ou leucócitos, nem entre as quantidades dos fatores de crescimento na pele e no plasma. Correlação positiva foi observada entre PRP e pele do grupo tratado para os fatores de crescimento TGF- β 1 ($r = 0,31$) e PDGF-BB ($r = 0,38$). Também existiu correlação positiva ($r = 0,81$) entre as quantidades de PDGF-BB e TGF- β 1 no PRP.

DISCUSSÃO

Aproximadamente 37 dias após indução cirúrgica, as feridas estavam macroscopicamente fechadas. Esse tempo

médio de cicatrização está próximo ($38,5 \pm 3,9$ dias) ao encontrado por Ferreira et al. (2007) em feridas não tratadas, produzidas da mesma forma e na mesma região. Feridas realizadas na região lateral do pescoço (8cm^2 , De Rossi et al. 2009), dorsolateral do metacarpo ($6,25\text{cm}^2$, Monteiro et al. 2009) e superfícies lateral e medial do metacarpo/metatarso ($2,5\text{cm}^2$, Carter et al. 2003), tratadas com PRP em gel, apresentaram períodos máximos de cicatrização entre 72 e 79 dias. Essa variação entre períodos máximos de cicatrização dependem do diâmetro das feridas, mas também da localização, pois lesões cutâneas localizadas no tronco cicatrizam mais rapidamente do que as dos membros (Wilkinson & van Weeren 2005).

Monteiro et al. (2009) constataram que feridas tratadas com PRP, localizadas nos membros, podem apresentar período máximo para fechamento superior (72 dias) ao de feridas não tratadas (62 dias), o que revela que o PRP não tem efeito positivo no tempo máximo para fechamento da ferida; resultados similares aos observados no presente estudo.

Diferentes metodologias podem ser empregadas para a obtenção do PRP. O citrato de sódio, anticoagulante utilizado no presente estudo, é considerado como adequado para a preparação desse componente rico em plaquetas, pois se liga aos íons de cálcio formando quelatos, o que impede que ocorra coagulação do plasma (Anitua et al. 2004). Adicionalmente, possui a capacidade de preservar a integridade da membrana das plaquetas (Landesberg et al. 2000), o que é desejável, pois pode evitar a liberação precoce dos α -grânulos plaquetários, que possuem os fatores de crescimento.

A lógica para a utilização do PRP reside na inversão da proporção de células vermelhas, as quais são menos úteis no processo de reparação, e na elevação da quantidade de plaquetas, fundamentais no estímulo da reparação tecidual (Marx 2004, Sánchez et al. 2009). O método escolhido para quantificar as plaquetas foi o de contagem manual, já que determina de forma individual, e que segundo Vendruscolo et al. (2012) reduz a possibilidade de se subestimar os valores plaquetários. Por outro lado, existe controvérsia sobre a quantidade ideal de plaquetas no PRP. Alguns autores mencionam que deve ser de pelo menos 1 milhão de plaquetas/ μL ou 3 a 6 vezes mais do que a encontrada no sangue total (Marx 2001, Weibrich et al. 2002, Alsousou et al. 2009), que varia de 100.000 a 350.000 plaquetas/ μL (Feldman et al. 2000, Marx 2001). Por outro lado, Anitua et al. (2004) recomendam quantidade mínima de 300.000 plaquetas/ μL . No presente estudo essa quantidade foi de 320.000 a 390.000 plaquetas/ μL , sendo portanto acima da considerada como apropriada por Anitua et al. (2004), e semelhante à obtida em estudos realizados em equinos hípidos mestiços (Maia et al. 2009b, Vendruscolo et al. 2012, Zandim et al. 2013). Sutter et al. (2004) obtiveram valores médios mais elevados (855.000 plaquetas/ μL) mediante utilização de metodologia automática com equipamento que permite a separação (aférese) dos constituintes do sangue total, o que resulta em maiores contagens de plaquetas. Entretanto, na prática clínica, esses aparelhos são pouco utilizados devido ao custo e por não estarem disponíveis em algumas clíni-

cas veterinárias, sendo, portanto, mais apropriado o uso de centrífugas convencionais quando se deseja reduzir gastos.

Estudo *in vitro* realizado por Graziani et al. (2006) demonstrou que preparações de PRP exercem um efeito dose-específico na proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Efeitos ótimos foram observados quando a contagem plaquetária foi 2,5x mais alta do que a presente no sangue total. Por outro lado, quantidades mais elevadas (5,5x) resultaram em efeitos indesejáveis, como a redução da proliferação fibroblástica, e da função dos osteoblastos. De acordo com os autores, diferentes concentrações de plaquetas no PRP podem ocasionar resultados distintos quando estudos *in vivo* são realizados. Aumento moderado da quantidade de plaquetas no PRP com relação à contagem no sangue total possibilita um ambiente mais adequado para a cicatrização de feridas devido a um melhor equilíbrio entre proliferação e diferenciação celular. Portanto, como a quantidade de plaquetas no PRP preparado no presente estudo foi em média de 2,8x a presente no sangue total, acredita-se que essa quantidade deveria ter sido suficiente para que a terapia resultasse em um fechamento mais rápido da ferida.

A concentração de leucócitos foi mais baixa (50 a 900 células/ μL) do que a obtida por Vendruscolo et al. (2012) (2.460 ± 763 células/ μL), quando utilizaram força de centrifugação relativa (*g*) e tempo igual ao usado no presente estudo. É conhecido o efeito positivo dos leucócitos na inflamação, imunidade e sinalização celular (Boswell et al. 2012), assim como na liberação de fatores de crescimento. Entretanto, aos leucócitos também são atribuídos efeitos indesejáveis, já que ao atuar como sinalizadores de células pró-inflamatórias podem provocar catabolismo tecidual (Jacobsen et al. 2008). Além disso, existe relato de que a aplicação de concentrado de plaquetas com leucócitos, para tratamento de paciente com tendinopatia pode aumentar a dor local (Mishra & Pavelko 2006). Portanto, tanto efeitos positivos como negativos são associados à presença dessas células no PRP. Considerando a relação antagonista entre plaquetas e leucócitos, e os fatores de crescimento e citocinas que são gerados, Wasterlain et al. (2012) sugerem que o PRP ideal para preparações ortopédicas deve conter uma proporção elevada de plaquetas em relação aos leucócitos, de forma a promover uma ação mais anabólica do que catabólica. Por outro lado Boswell et al. (2012) consideram que em feridas infectadas pode ser necessária e eficiente uma maior quantidade de leucócitos.

Tendo em vista a quantidade de plaquetas e leucócitos, os concentrados de plaquetas foram classificados em diferentes categorias. Existe o PRP puro (PRP-P), onde as células brancas são intencionalmente eliminadas, e o PRP com leucócitos (PRP-L) (Ehrenfest et al. 2009). Também existem as plaquetas ricas em fibrina (PRF) (Carmona et al. 2013b) que, diferentemente dos demais concentrados, não necessitam da utilização de anticoagulantes para serem obtidas (Ehrenfest et al. 2012). O PRP-L deve possuir entre 5 a 8x mais plaquetas (Ehrenfest et al. 2009, Carmona et al., 2013b) e 3 ou mais vezes maior quantidade de leucócitos (Carmona et al., 2013b) do que o sangue total. Entretanto, não existe consenso de quanto de plaquetas deve existir no PRP para que esse seja considerado como

puro. Hutchins & Grabsch (2009) mencionam que deve conter moderada quantidade de plaquetas, que deve ser de 1,5 a 2,5x a existente no sangue total, enquanto Carmona et al. (2013b) consideram que deve possuir de 1,3 a 4x a sanguínea. Adicionalmente, esses autores mencionam que esse concentrado pode conter de 0,5 a 2x mais leucócitos do que o sangue. Quando o concentrado rico em plaquetas é ativado por agentes farmacológicos, formando um polímero de fibrina, é conhecido como gel de plaquetas (GP). Portanto, um GP obtido a partir de um PRP-P é denominado de PRG-P, e quando originado de um PRP-L, de PRG-L.

Por conseguinte, ainda existe controvérsia na definição desses concentrados de plaquetas. O que se sabe até o momento é que cada metodologia pode produzir um produto diferente, possivelmente com distintos potenciais terapêuticos (Ehrenfest et al. 2009), e com variada quantidade e cinética de liberação dos fatores de crescimentos (Ehrenfest et al. 2009, Mazzucco et al. 2009, Sánchez et al. 2009). Levando em consideração as definições básicas para esses componentes ricos em plaquetas, pode-se dizer que no presente estudo foi utilizado um PRP pobre em leucócitos (PRP-PL), o qual pode resultar, quando comparado com o PRP rico em leucócitos (PRP-RL), em menor resposta inflamatória aguda, menor celularidade e vascularização, conforme relatado por Dragoo et al. (2012) cinco dias após tratamento de tendões de ratos com PRP-PL ou PRP-RL. De acordo com Wasterlain et al. (2012), devido a dificuldade em separar os leucócitos das plaquetas durante a maioria dos protocolos adotados, não é raro se utilizar um PRP-RL, que não é adequado quando se deseja uma menor reação inflamatória.

São conhecidas três isoformas de TGF- β , potencialmente produzidas pela maioria das células ativadas na reparação de feridas, principalmente pelas plaquetas (Chang et al. 1997). Existem evidências de regulação diferenciada pelas isoformas de TGF- β (Falanga et al. 1991, Villiger et al. 1993), sugerindo que os mecanismos de estresse, injúria do tecido ou exposição à citocinas podem induzir a um diferente espectro de expressão dessas isoformas. A isoforma TGF- β 1 é secretada na forma peptídica latente, e ativada por condições ácidas ou por clivagem proteolítica (Chang et al. 1997; Werner & Grose 2003), sendo responsável por acelerar o processo de reparação. Com relação ao PDGF, são descritas cinco isoformas (Vercounte-Edouart et al. 2008), sendo a BB considerada a mais potente (Goodkin & Pierce 1993). A síntese é favorecida como resposta à baixa tensão de oxigênio, trombina e por estímulos resultantes de outros fatores de crescimento (Carrasco et al. 2009). Tanto a quantidade de plaquetas como de leucócitos influencia na quantidade desses fatores de crescimentos. O protocolo utilizado para obtenção do PRP foi eficiente em concentrar os fatores de crescimento estudados. Essa eficiência foi maior para o PDGF-BB, do que para o TGF- β 1, já que o aumento desses fatores de crescimento foi de 7x e 3x, respectivamente. De acordo com Anitua et al. (2005), concentrados de plaquetas não possuem uma grande quantidade de TGF- β 1, mas apresentam importantes quantidades de outros fatores de crescimento angiogênicos e proliferativos como PDGF e FGF que também são fundamentais no processo de repa-

ração da pele. Os resultados obtidos na presente pesquisa corroboram a afirmativa desses autores.

Os valores do TGF- β 1 no PRP variaram menos (4.764,00-13.529,76pg/mL) do que os obtidos por Textor et al. (2011) em seis equinos sadios, que foram de 1.153 a 22.677pg/mL. Os valores médios desse fator de crescimento (8.693,8 $\pm$ 3.362,58pg/mL) foram relativamente altos, sendo semelhantes aos obtidos por Pereira et al. (2013) (7.634 $\pm$ 1.218pg/mL) quando o mesmo protocolo de obtenção foi utilizado, ou seja, duas centrifugações, sendo a primeira com 120xg/10 min, e a segunda com 240xg/10 min. Adicionalmente, foram bem mais elevados tanto no PRP como no plasma (2.717,71 $\pm$ 900,61pg/mL) do que os obtidos por Giraldo et al. (2013) que utilizaram a mesma técnica (ELISA) e os mesmos kits (R&D Systems) para quantificar esse fator de crescimento no PRP em gel (PRG-P) ativado farmacologicamente com gluconato de cálcio a 10%, em equinos das raças crioula argentina e colombiana (2.264,0 $\pm$ 1.196,0 pg/mL no PRP; 1.012,0 $\pm$ 426,0 pg/mL no plasma), com idade acima de 10.1 anos. O mesmo ocorreu com o fator de crescimento PDGF-BB quantificado no presente estudo, cujos valores médios foram de 3.964,25 $\pm$ 2.224,19pg/mL e de 527,99 $\pm$ 263,62pg/mL, para o PRP e plasma, respectivamente. Já os valores médios obtidos por Giraldo et al. (2013) foram de 1.208,0 $\pm$ 624,3pg/mL e 59,3 $\pm$ 131,7pg/mL, para o PDGF-BB no PRG-P e plasma, respectivamente. Esses autores também realizaram dupla centrifugação, mas por um menor período de tempo (120xg/5 min e 240xg/5 min).

Os maiores valores desses fatores de crescimento obtidos no presente estudo, sem que o PRP fosse ativado por agentes farmacológicos, corrobora os achados de Zandim et al. (2012), que demonstraram em estudo ultraestrutural do PRP de equinos que embora a ativação de plaquetas por agentes farmacológicos seja importante, o PRP não ativado por essas substâncias também apresenta adequada porcentagem de plaquetas em estado ativado. Além disso, sabe-se que o estresse mecânico causado pela centrifugação durante o preparo do PRP também pode ativar algumas plaquetas (Gonshor 2002, Landi & Marques Júnior 2003). Nesse sentido, várias pesquisas realizadas em equinos (Smith et al. 2006, Schnabel et al. 2007, McCarrel & Fortier 2009, Bosch et al. 2011, Zandim et al. 2013) vem utilizando o PRP sem prévia adição desses agentes ativadores. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo corroboram a afirmativa de McCarrel & Fortier (2009), de que não é necessário o uso de ativadores para liberação dos fatores de crescimento no PRP, o que é reforçado pela correlação positiva observada entre a concentração do TGF- β 1 e PDGF-BB no PRP e na pele. Essa correlação era esperada, particularmente porque o fator de crescimento derivado das plaquetas induz os macrófagos a produzirem o transformante beta, conforme mencionado por Barrientos et al. (2008).

A metodologia adotada para a preparação do PRP foi baseada na descrita por Argüelles et al. (2006), sendo as concentrações de plaquetas e leucócitos maiores e menores, respectivamente, do que as obtidas por esses autores em concentrado de plaquetas. Por outro lado, esses pesquisadores obtiveram valores médios de TGF- β 1 superiores

(10.500pg/mL), embora os valores mínimos e máximos tenham sido bem mais variados (1.900 a 17.100pg/mL) do que os do presente estudo (4.764,00 a 13.529,76pg/mL). Esses autores incluíram na pesquisa 26 equinos (machos e fêmeas) clinicamente saudáveis, com idades muito variadas (3 a 12 anos; 6,9±2,3). Embora Textor et al. (2011) não observaram diferença na quantidade de TGF-β1 ($p=0,391$) e PDGF-BB ($p=0,169$) no PRP de machos e fêmeas, recentemente Giraldo et al. (2013) relataram que existe diferença ($p<0,001$) na concentração do PDGF-BB no PRG-P proveniente de fêmeas da raça crioulo colombiana ou equinos jovens (até 5 anos de idade), quando comparados com machos da raça crioulo argentina ou equinos mais velhos (acima de 10,1 anos). Portanto, esses resultados contraditórios entre estudos reforça a necessidade de mais pesquisas *in vivo* utilizando amostras homogêneas em termos de idade e sexo, conforme realizado no presente estudo.

A variação entre estudos na quantidade de fatores de crescimento presentes no PRP utilizando mesma metodologia de obtenção e técnica para quantificação, também pode estar relacionada com os vários constituintes do PRP, pois além das plaquetas, outras células possuem a capacidade de liberar fatores de crescimento (Weibrich et al. 2003). Adicionalmente, embora a presente pesquisa não tenha revelado correlação, há relato de associação entre a presença de leucócitos e de TGF-β1 no PRP, onde valores mais elevados das células brancas resultariam em maiores concentrações do fator de crescimento (Pereira et al. 2013). Conforme mencionado previamente, esse estudo utilizou um PRP-PL, o que pode, portanto, ter resultado em menor concentração do TGF-β1.

A pele íntegra da região da garupa dos equinos mestiços do presente estudo apresentou valores médios muito mais baixos de TGF-β1 ($0,94\pm0,69$ pg/g) do que os relatados por Theoret et al. (2001) na pele sadia dos membros torácicos (MTs) e região torácica (RT) de quatro equinos mestiços com idade entre 2 e 4 anos, que foram respectivamente de 980 ± 396 pg/g (MTs) e $1.430\pm336,0$ pg/g (RT). Esses valores tão diferentes podem estar relacionados com a idade dos animais. Giraldo et al. (2013) compararam a concentração do TGF-β1 no PRG-P de equinos com idade até 5 anos, com animais com mais de 10,1 anos, e observaram valores mais altos nos equinos mais jovens ($3.284,0\pm2.176,0$ pg/mL), comparado com os mais velhos ($2.264,0\pm1.196,0$ pg/mL). Adicionalmente, animais com idade entre 5,1 e 10 anos apresentaram valores bem mais próximos ($2.366,0\pm1.044,0$ pg/mL) aos dos equinos mais velhos. Os animais do estudo de Theoret et al. (2001) foram bem mais jovens do que os utilizados no presente estudo. Adicionalmente, a região corporal onde foi quantificado o fator de crescimento também pode ter influenciado, pois já foi comprovado que existe diferença no tempo máximo de cicatrização entre lesões cutâneas localizadas nos membros e no tronco, sendo mais lento nas primeiras (Wilmink & van Weeren 2005).

De acordo com Theoret et al. (2002a,b), seus estudos foram os primeiros a determinar, de forma temporal, a expressão dos fatores de crescimento TGF-β1 e bFGF durante o processo de cicatrização da pele sadia e com tecido de granulação exuberante, na região dos membros torácicos/

tórax e membros torácicos, respectivamente. Diferentemente dos resultados de Theoret et al. (2001), em que o pico de TGF-β1 foi observado 24h após indução cirúrgica de feridas em quatro equinos mestiços, as concentrações de TGF-β1 nos animais do presente estudo foram maiores ($p<0,05$) após uma semana e na avaliação final, quando as feridas nos equinos de ambos os grupos estavam macroscopicamente cicatrizadas. Entretanto, o intervalo de tempo entre as avaliações realizadas por esses autores foi mais próximo (12 e 24h, assim como com 2, 5, 10 e 15 dias), não sendo realizada nenhuma análise após 30 dias de realizada a lesão. Por outro lado, apesar dos valores máximos do fator de crescimento no estudo de Theoret et al. (2001) terem ocorrido com 24h, permaneceram elevados até o 14º dia nas feridas localizadas no tórax, e até a cicatrização nas feridas localizadas nos membros. Portanto, existe uma variação muito grande na concentração desse fator de crescimento, de acordo com a localização da lesão cutânea.

Monteiro et al. (2009) avaliaram o efeito do PRP com 2,8x mais plaquetas do que no soro, em feridas localizadas no aspecto distal dos membros torácicos de seis equinos mestiços, com idade entre 10 e 15 anos, mediante quantificação do TGFβ-1 pelo método ELISA. Os autores observaram que a ferida tratada com PRP apresentou 1,6x mais TGF-β1 do que a controle após uma semana de realizada a lesão, porém sem diferença estatística entre grupos. No presente estudo, embora tenha ocorrido aumento ($p<0,005$) do TGF-β1 uma semana após tratamento, o mesmo ocorreu nas feridas não tratadas. Diferentemente do estudo desses autores, a quantidade média desse fator de crescimento nesse tempo de uma semana na ferida não tratada com PRP ($32,11\pm11,8$ pg/g) foi semelhante ao das feridas tratadas ($31,66\pm14,64$ pg/g). Esse resultado contraditório se deve, novamente, a localização das feridas. Por outro lado, conforme ocorreu no estudo desses autores, a aplicação tópica do PRP não acelerou macroscopicamente o processo de reparação das feridas.

Da mesma forma que ocorreu para o TGF-β1, os valores mínimos e máximos do PDGF-BB no PRP variaram menos ($1.069,2-7.470,48$ pg/mL) do que os obtidos por Textor et al. (2011) em seis equinos saudáveis, que foram de 134 a 7.157pg/mL. Os valores médios foram mais altos ($p<0,05$) do que o do tempo zero, duas semanas depois de realizada a lesão, e na avaliação final, nos grupos tratado e controle, respectivamente. Adicionalmente, em algumas avaliações realizadas, os valores do PDGF-BB foram mais elevados (T1 e T2, GT) do que o obtido em outra amostragem (T3), porém não foram significativamente diferentes da concentração obtida na pele íntegra. O mesmo ocorreu no TGF-β1 quantificado em T1 na pele do grupo controle. Essas variações de resultados ocorreram provavelmente em função do desvio padrão que foi elevado nessas amostragens, impedindo que a diferença fosse estatisticamente importante. Por outro lado, esse desvio padrão elevado se deve a variação individual, o que certamente também está relacionado com a contagem de plaquetas e leucócitos totais no PRP.

O PDGF-BB, que pode ser derivado de plaquetas, leucócitos e células endoteliais, participa na quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, e induz os macrófagos (Pierce et al.

1991) a produzir inclusive TGF- β 1 (Pierce et al. 1991, Barrientos et al. 2008), conforme mencionado previamente. Também é mitogênico para fibroblastos e miócitos, e tem a capacidade de induzir o fenótipo dos miofibroblastos nos fibroblastos (Clark 1993, Heldin & Westermark 1999, Barrientos et al. 2008), o que é fundamental para a contração da ferida. Feridas em membros de pôneis cicatrizam mais rapidamente do que em equinos (Wilmink & van Weeren 2004), o que pode estar relacionado com a maior quantidade desse fator de crescimento. Com base no seu padrão de expressão *in vitro* Clark (1993) sugere que o PDGF possui dois papéis distintos na cicatrização da pele, sendo um efeito precoce, ao estimular a proliferação dos fibroblastos, e um efeito tardio pela indução dos miofibroblastos. Nesse contexto, a sua elevação em uma fase mais tardia era esperada, e foi considerado como fisiológico, pois no grupo controle ocorreu aumento cutâneo, ao longo do tempo, da concentração desse fator de crescimento.

A ausência de diferença entre grupos tratados e controles pode estar relacionada com o processo de reparação fisiológica das feridas de pele, que se dá, de forma clássica, em quatro fases bem definidas que se sobrepõem, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e, por último, remodelação (Enoch & Leaper 2007, Young & McNaught 2011). Schultz et al. (2011) subdivide a terceira fase em migração e proliferação, e a quarta em contração e remodelação. Embora a quantidade de plaquetas presentes no hematoma formado após uma lesão seja de apenas 6%, sendo o restante hemácias (94%) e leucócitos (1%) (Marx 2004, Mei-Dan et al. 2010), tanto o TGF- β como o PDGF são liberados pelos α -grânulos das plaquetas no local onde existe lesão tecidual (Assoian et al. 1983). Theoret et al. (2002a) demonstraram por imunistoquímica que o TGF- β 1 é expresso no epitélio da pele sadia de equinos, e que essa expressão é aumentada na pele lesionada, estando associada às células envolvidas no reparo tecidual. Adicionalmente, vários outros fatores podem influenciar na resposta natural do organismo. Além disso, apesar da baixa quantidade de plaquetas no hematoma (condições fisiológicas), o TGF- β 1 é imediatamente liberado, realizando quimiotaxia para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, que promovem aumento dos níveis desse fator de crescimento em vários tipos celulares, que por sua vez estimulam a migração de células inflamatórias, fibroplasia, síntese de colágenos, angiogênese e a deposição de matriz (Assoian et al. 1983, Pierce et al. 1991). Já o PDGF é encontrado em quantidades elevadas não apenas nas plaquetas conforme mencionado anteriormente, mas também nos leucócitos, células endoteliais vasculares, assim como em outros tipos de células. Na realidade, em condições naturais, as plaquetas sintetizam e secretam fatores de crescimento durante sua vida útil, que de acordo com Nurdén et al. (2008) é de 7 a 10 dias.

Durante a última fase do processo de cicatrização da pele ocorre a ação de miofibroblastos, que são células contráteis originadas da diferenciação de fibroblastos, e que se encontram posicionadas paralelamente no tecido de granulação recém-formado, que parte da periferia da ferida em direção central. Foi demonstrado que a concentração de TGF- β é mais alta ($p < 0,05$) em lesões cutâneas de pôneis

do que de equinos (Wilmink & van Weeren, 2004), o que acarreta maior resposta inflamatória, e maior contração da ferida (van den Boom et al. 2002), já que esse fator de crescimento estimula a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (Desmoulière et al. 1993), que se ligam ao colágeno fazendo com que haja maior contração, e estímulo à ativação dos fatores de crescimento, tanto do próprio TGF- β , como do PDGF (Chamberlain et al. 2011).

Apesar da importância do TGF- β 1 em diferentes fases do processo de cicatrização da pele, esse fator de crescimento também está associado com o desenvolvimento de tecido de granulação exuberante devido a sua função pró-fibrótica (Theoret et al. 2001, van den Boom et al. 2002, Theoret & Wilmink 2013), portanto a sua permanência elevada no final do processo de cicatrização cutânea pode não ser benéfica. Entretanto, ao que parece essa redução na pele é lenta, já que no presente estudo os valores do TGF- β 1 permaneceram significativamente altos em relação ao tempo zero ($0,94 \pm 0,69$ pg/g), tanto no grupo tratado ($24,29 \pm 12,67$ pg/g) como controle ($36,31 \pm 16,59$ pg/g), porém não houve a formação de tecido de granulação exuberante. Essa formação de tecido está intimamente relacionada com a inflamação crônica da pele, o que perpetua a liberação de mediadores como o TGF- β , que por sua vez estimula de forma excessiva a fibroplasia, ocasionando a formação do tecido (Theoret & Wilmink 2013), o que contraditoriamente inibe a contração (Wilmink & van Weeren 2005). Na realidade, estudos *in vitro* demonstraram que baseado no modelo de expressão dos genes do TGF- β , o efeito desse fator de crescimento no processo de cicatrização cutânea é paradoxo. Enquanto o exógeno estimula a reepitelização, migração de queratinócitos e formação de tecido de granulação (Coffey et al. 1988, Hebda 1988), o endógeno tem demonstrado inibir a reepitelização (Werner & Grose 2003). Esse fato foi relatado em camundongos por Eskild-Jensen et al. (1997), após tratamento de feridas em orelhas desprovidas de pelo, com anticorpos neutralizantes para TGF- β 1 e TGF- β 2. De acordo com os autores, os fatores de crescimento endógenos não foram essenciais para a reepitelização e neovascularização cutânea.

Baseado nos resultados dos diversos estudos mencionados e nos dados obtidos na presente pesquisa, pode-se afirmar que a utilização do PRP como forma de tratamento ainda necessita ser melhor estudada. De acordo com Andia et al. (2012), a origem da eficácia do PRP parece ser mais complexa do que se pensa, sendo importante considerar que as plaquetas possuem centenas de proteínas, de forma que, podem existir outras classes de moléculas (como as citocinas e quimiocinas presentes nos α -grânulos) envolvidas na reparação dos tecidos que inclusive podem ser mais importantes do que os fatores de crescimento. Por outro lado, é fundamental ressaltar que mais de 95% dos fatores de crescimento pré-sintetizados são secretados dentro de 1h da ativação dos α -grânulos (Marx 2004). No presente estudo a demora em aplicar o PRP não pode ser incriminada como a causa da ausência de diferença entre os grupos, já que uma vez obtido e confirmada a quantidade de plaquetas, o PRP foi imediatamente aplicado, conforme recomendado pela literatura científica (Marx 2004, Vavken et

al. 2006). Embora se considere 8h como o tempo máximo para a utilização do PRP após sua obtenção, que é quando pode ocorrer perda da sua estabilidade (Marx 2001, 2004) e deficiência na expressão das proteínas secretoras (Pietrzak & Eppley 2005), segundo Vavken et al. (2006), o PRP não deve ser armazenado.

Diferentemente do que ocorreu na pele, no plasma não houve alteração nas concentrações dos fatores de crescimento com relação ao tempo zero. De acordo com Marx (2001), os fatores de crescimento atuam nos receptores localizados nas membranas das células, ativando a expressão gênica fisiológica, sem qualquer efeito mutagênico direto. Um possível efeito sistêmico/ergogênico da circulação dos fatores de crescimento é uma discussão que vem sendo realizada, mas os resultados são contraditórios. A possibilidade de efeito sistêmico é considerado um aspecto polêmico na utilização dos concentrados em plaquetas, pois a aplicação local poderia resultar em um melhor desempenho de um atleta após administração do PRP em uma estrutura mole, o que poderia configurar como *doping*. Esse fato foi bastante discutido em 2010, quando ficou proibida a aplicação intramuscular do PRP em humanos, pela Agência Mundial de Anti-Doping nos Estados Unidos das Américas. De acordo com Wasterlain et al. (2012), embora essa proibição tenha sido posteriormente cancelada devido à falta de provas de que o PRP seria ergogênico, muitos dos fatores de crescimento contidos nos componentes ricos em plaquetas permaneceram proibidos nas listas de substâncias consideradas como *doping* tanto no ano de 2011 como de 2012.

Até o ano de 2012 apenas Banfi et al. (2006) haviam efetivamente encontrado um possível efeito sistêmico decorrente da administração local do PRP. Os autores mediram as concentrações séricas dos fatores de crescimento EGF e VEGF em quatro pacientes humanos portadores de tendinopatia patelar, e em um com tendinose próxima à articulação úmero-rádio-ulnar. A quantificação foi realizada pela técnica ELISA antes e 30 min após administração da terapia, assim como com 3 e 24h depois do tratamento. O efeito sistêmico foi atribuído pela diminuição significativa na concentração sérica do EGF já após 30 min da aplicação intratendínea do PRP obtido pelo sistema GPS II, ou seja, método semi-automático. Por outro lado, o efeito permaneceu apenas até a avaliação realizada 3h após o tratamento. Por outro lado, o mesmo não foi observado para o VEGF, o que foi atribuído a alta variabilidade interindividual. Recentemente Wasterlain et al. (2013) divulgaram resultados de um estudo onde foi pesquisado o efeito sistêmico de várias proteínas, entre elas os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), bFGF, VEGF e PDGF-BB no soro de 25 pacientes humanos submetidos a tratamento intratendíneo com PRP obtido pelo sistema GPS III (método semi-automático). Os fatores de crescimento foram quantificados pela técnica ELISA antes do tratamento, 15 min após realização do mesmo, assim como com 3, 24, 48, 72 e 96h. Efeito sistêmico ($p<0,05$) foi observado para os fatores de crescimento IGF-1 (aumento com 24 e 48h), bFGF (elevação com 72 e 96h), e VEGF (aumento já na avaliação realizada com 3h, que permaneceu até a avaliação realiza-

da com 96h), mas não para o PDGF-BB, fator pesquisado no presente estudo.

Conforme mencionado, ambos estudos encontraram efeitos sistêmicos para alguns fatores de crescimento, mas não para outros, e o momento em que foram expressadas as alterações séricas variou com a proteína estudada. Adicionalmente, o referido efeito foi antagônico, enquanto em um estudo ocorreu redução (Banfi et al. 2006), no outro foi observado aumento (Wasterlain et al. 2013) do fator de crescimento. Portanto, nesses casos, o efeito sistêmico pode ser considerado uma alteração para mais ou para menos na concentração de fatores de crescimento no soro/plasma/sangue em comparação com valores basais previamente mensurados antes da aplicação local do PRP, de forma a comprovar que o tratamento agiu em todo o organismo e não apenas no sítio de aplicação. Por outro lado, apesar de Schippering et al. (2011) considerarem uma possível elevação plasmática de IGF-1 como efeito ergogênico, os autores não encontraram alteração na quantidade do fator de crescimento após uma única aplicação intramuscular de PRP em humanos saudáveis, sendo portanto considerado pelos pesquisadores um tratamento seguro, pelo menos no que refere a um possível efeito ergogênico. A técnica de obtenção do PRP também foi semi-automática (ACP Arthrex®), sendo o fator de crescimento quantificado no soro pela técnica ELISA antes da aplicação do PRP, assim como após 0,5, 3 e 24h.

É importante ressaltar que tanto Banfi et al. (2006) como Wasterlain et al. (2013) realizaram o estudo com pacientes apresentando lesão tendínea de ocorrência natural, presentes em diferentes locais, com evolução e severidade não padronizadas. Os autores mencionam inclusive como limitação do estudo a falta de grupo controle. Adicionalmente, a quantificação dos fatores de crescimento em ambos os casos foi realizada no soro, que dependendo da proteína é encontrada em maior quantidade do que no plasma, como é o caso do VEGF (Kraus et al. 2004). Um outro aspecto a ser considerado é a forma de obtenção do PRP, que em ambos os estudos foi pelo método semi-automático que, em geral, origina um PRP-L, ou seja, rico em leucócitos (Ehrenfest et al. 2012). Recentemente Hessel et al. (2014) divulgaram resultados de uma pesquisa onde foram comparadas a concentração de plaquetas e dos leucócitos, assim como do TGF- β 1 e PDGF-BB em concentrados autólogos de plaquetas obtidos pelo método manual e por quatro diferentes sistemas (Angel, ACP, E-PET e GPS III) utilizados como métodos semi-automáticos. O estudo revelou importante variação na composição do PRP; os sistemas E-PET e GPS III apresentaram maiores ($p<0,001$) valores de plaquetas com relação aos níveis basais, porém também de leucócitos (GPS III, $p<0,001$). A exceção do sistema ACP (Arhrex®), ocorreu elevação ($p<0,001$) do PDGF-BB nos métodos semi-automáticos E-PET e GPS III, assim como no método manual. O TGF- β 1 aumentou em todos os produtos avaliados, a exceção do sistema ACP. Valores mais elevados ($p<0,001$) foram observados com o kit comercial E-PET e pela técnica manual. De acordo com os autores essas discrepâncias de resultados podem influenciar a bioatividade dos componentes ricos em plaquetas e, consequentemente, influenciar na qualidade da regeneração tecidual.

Apesar dos resultados obtidos por Wasterlain et al. (2013), os próprios autores acreditam que o aumento obtido para o IGF-I não esteja relacionado com a presença desse fator de crescimento no PRP, já que a quantidade sérica foi mais elevada do que no componente rico em plaquetas. Na opinião dos autores, a elevação se deve, provavelmente, à ativação do hGH-IGF-1, que é um dos principais hormônios relacionados com a produção do IGF-1. No estudo desses pesquisadores ocorreu uma importante elevação desse hormônio nas primeiras 24h, embora não tenha sido significativa. Adicionalmente, os autores comentam que essa dissociação pode ser reforçada pela ausência de elevação ($p>0,05$) do PDGF-BB no seu estudo, apesar do seu aumento no PRP. Portanto, se os fatores de crescimento contidos no PRP fossem os únicos responsáveis pelo aumento dos seus níveis circulantes, também seria esperado alteração sistêmica na quantidade do PDGF-BB. Finalmente, merece destaque o comentário dos autores de que o método utilizado para a preparação do PRP e a técnica de ativação podem afetar a magnitude do efeito sistêmico. Na realidade, eles não utilizaram apenas um PRP-L, mas sim um PRP-RL, que pode provocar a liberação não apenas de fatores de crescimentos anabólicos, mas também catabólicos, o que pode resultar em diferenciada elevação sistêmica de fatores de crescimentos anabólicos. Estudo *in vitro* recentemente publicado por Boswell et al. (2014), com cultura de tendão de equinos tratada com PRP contendo diferentes proporções de leucócitos e plaquetas, revelou que o grupo que recebeu a maior quantidade de plaquetas apresentou redução na expressão do colágeno tipo I. Por outro lado, o tendão tratado com quantidades mais baixas de leucócitos apresentou menor sinalização catabólica. Na opinião desses pesquisadores, os resultados sugerem que o menor efeito catabólico ocasionado pela baixa concentração de células brancas seja, provavelmente, mais importante do que a alta quantidade de plaquetas, cuja finalidade é maximizar o efeito anabólico nos tecidos.

O presente estudo quantificou fatores de crescimento fundamentais para as diferentes fases do processo de cicatrização cutânea, e utilizou kits humanos com comprovada reação cruzada para equinos. Embora as proteínas TGF- β 1 e PDGF-BB não tenham sido mensuradas nas primeiras três horas após tratamento das feridas, foram quantificadas em momentos (12 e 36h, por exemplo) que poderiam sinalizar um possível efeito sistêmico. Portanto, os resultados obtidos sugerem que o PRP-PL da forma como foi obtido nesse estudo não possui potencial ergogênico quando injetado por via intradérmica, tendo em vista que não ocorreu redução ou aumento significativos nas quantidades desses fatores de crescimento nos tempos 12 e 36h após administração local, assim como com 1, 2 e 5 semanas. Como futura investigação sugere-se a quantificação desses e de outros fatores de crescimentos em diferentes tempos, durante as primeiras 10h após aplicação do PRP, com a finalidade de se verificar se resultados semelhantes são obtidos.

Diferentemente do estudo *in vitro* de McCarrel & Fortier (2009) não foi observada correlação entre o TGF- β 1 e a concentração de plaquetas. O estudo desses autores foi realizado em culturas de tendão do músculo flexor digital

superficial e ligamento suspensório de equinos. Embora a pesquisa tenha demonstrado correlação positiva entre esse fator de crescimento e a concentração de plaquetas nos diferentes concentrados plaquetários avaliados, não ocorreu o mesmo para o PDGF-BB, o que foi atribuído a forma e ao tempo de liberação desse fator de crescimento, baseado em informações descritas por Lee (2000). Segundo esses autores, o TGF- β 1 é uma proteína liberada na forma inativa com meia-vida biológica de 90 min, sendo rapidamente ativada após liberação, enquanto o PDGF-BB é liberado a partir das plaquetas na forma ativa, e possuem uma meia-vida inferior a 2 min. Independentemente dos resultados, deve-se ter muito cuidado em se extrapolar e comparar dados obtidos *in vitro* com os *in vivo*, conforme comentado pelos próprios autores.

O período de avaliação adotado foi satisfatório, pois abrangeu diferentes fases do processo de cicatrização da pele. Portanto, corroborando o mencionado por Baksh et al. (2013), os benefícios do uso de PRP no contexto clínico ainda permanecem obscuros.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o método manual para obtenção do PRP, utilizando duas centrifugações, é eficiente em concentrar o TGF- β 1 e o PDGF-BB.

Uma única aplicação local de PRP-PL 12h após indução cirúrgica de lesão cutânea na região glútea não aumenta a expressão local de TGF- β 1 e PDGF-BB, durante diferentes fases do processo de cicatrização. Adicionalmente, não altera a concentração no plasma sanguíneo desses fatores de crescimento 1, 2, 7, 14 e 37 (aproximadamente) dias após administração.

As fases de migração e proliferação, assim como a de contração e remodelação possuem maiores concentrações dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB, quando comparadas com as fases de hemostasia e inflamatória.

Agradecimentos. Os autores agradecem à CAPES, FAPEMIG (CVZ-APQ-00661-11) e ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Alsousou J., Thompson M., Hulley P., Noble A. & Willett K. 2009. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J. Bone Joint Surg. Brit.* 91:987-996.
- Andia I., Sánchez M. & Maffulli N. 2012. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12:7-22.
- Anitua E., Alkhraisat M.H. & Orive G. 2012. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J. Control. Release* 157:29-38.
- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P. & Nurden A.T. 2004. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91:4-15.
- Anitua E., Andia I., Sanchez M., Azofra J., del Mar Zaldueño M., de la Fuente M., Nurden P. & Nurden A.T. 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J. Orthop. Res.* 23:281-286.
- Argüelles D., Carmona J.U., Climent F., Muñoz E. & Prades M. 2008. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in 5 horses. *Vet. Rec.* 162:208-211.

- Argüelles D., Carmona J.U., Pastor J., Iborra A., Vinals L., Martínez P., Bach E. & Prades M. 2006. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res. Vet. Sci.* 81:237-245.
- Assoian R.K., Komoriya A., Meyers C.A., Miller D.M. & Sporn M.B. 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 258:7155-7160.
- Baksh N., Hannon C.P., Murawski C.D., Smyth N.A. & Kennedy J.G. 2013. Platelet-rich plasma in tendon models: a systematic review of basic science literature. *Arthroscopy*, 29:596-607.
- Banfi G., Corci M.M. & Volpi P. 2006. Could platelet rich plasma have effects on systemic circulating growth factors and cytokine release in orthopaedic applications? *Brit. J. Sports Med.* 40:816.
- Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H. & Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16:585-601.
- Bosch G., Moleman M., Barneveld A., van Weeren P.R. & van Schie H.T.M. 2011. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 21:554-561.
- Boswell S.G., Cole B.J., Sundman E.A., Karas V. & Fortier L.A. 2012. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28: 429-439.
- Boswell S.G., Schnabel L.V., Mohammed H.O., Sundman E.A., Minas T. & Fortier L.A. 2014. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am. J. Sports Med.* 42:42-49.
- Carmona J.U., Argüelles D., Climent F. & Prades M. 2007. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J. Equine Vet. Sci.* 27:167-170.
- Carmona J.U. & López C. 2011. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *J. Equine Vet. Sci.* 31:506-510.
- Carmona J.U., López C. & Samudio I.J. 2013a. Autologous platelet concentrates as an adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction. *J. Equine Vet. Sci.* 33:191-195.
- Carmona J.U., López C. & Sandoval J.A. 2013b. Review of the currently available systems to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. *Rec. Pat. Reg. Med.* 12:48-159.
- Carrasco J., Bonete D. & Gomar F. 2009. Plasma rico em plaquetas vs. Plasma rico en factores de crecimiento. *Rev. Esp. Cir. Osteoart.* 46:127-140.
- Carter C.A., Jolly D.G., Worden C.E., Hendren D.G. & Kane C.J.M. 2003. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.* 74:244-255.
- Chamberlain C.S., Crowley E.M., Kobayashi H., Eliceri K.W. & Vanderby R. 2011. Quantification of collagen organization and extracellular matrix factors within the healing ligament. *Microsc. Microanal.* 17:779-787.
- Chang J., Most D., Stelnicki E., Siebert J.W., Longaker M.T., Hui K. & Lineweaver W.C. 1997. Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. *Plast. Reconstr. Surg.* 100:937-944.
- Clark R.A. 1993. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am. J. Med. Sci.* 306:42-48.
- Coffey Jr R.J., Bascom C.C., Sipes N.J., Graves-Deal R., Weissman B.E. & Moses H.L. 1988. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 8:3088-3093.
- Czubryt M.P. 2012. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5:1-11.
- De Rossi R., Coelho A.C.A.O., Mello G.S., Frazilio F.O., Leal R.B., Facco G.G. & Brum K.B. 2009. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horse. *Acta Cir. Bras.* 24:276-281.
- Deschene K., Céleste C., Boerboom D. & Theoret C.L. 2011. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. *Wound Repair Regen.* 19:250-259.
- Desmoulière A., Geinoz A., Gabbiani F. & Gabbiani G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces a-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 122:103-111.
- Dragoo J.L., Braun H.J., Durham J.L., Ridley B.A., Odegard J.L., Luong R. & Arnoczky S.P. 2012. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am. J. Sports Med.* 40:1274-1280.
- Ehrenfest D.M.D., Bielecki T., Mishra A., Borzini P., Inchingolo F., Sammartino G., Rasmusson L. & Everts P.A. 2012. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (L-PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13:1131-1137.
- Ehrenfest D.M.D., Rasmusson L. & Albrektsson T. 2009. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 27:158-167.
- Enoch S. & Leaper D.J. 2007. Basic science of wound healing. *Surg.* 26:31-37.
- Eskild-Jensen A., Koff J., Kjolseth D., Andersen L.H., Christensen T.M., Baandrup U. & Hjortdal V.E. 1997. Endogenous TGF-beta1 and TGF-beta2 are not essential for epithelialization and neovascularization in the hairless mouse ear wound model. *Ann. Chir. Gynaecol.* 86:248-254.
- Falanga V., Qian S.W., Danielpour D., Katz M.H., Roberts A.B. & Sporn M.B. 1991. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 97:634-637.
- Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1344p.
- Ferreira J.C., Souza M.V., Vilória M.I.V., Fonseca E.F., Vianna M.W.S. & Costa J.C.M. 2007. Efeitos da monofenilbutazona na cicatrização por segunda intenção em equinos. *Ceres* 54:263-270.
- Giraldo C.E., López C., Álvarez M.E., Samudio I.J., Prades M. & Carmona J.U. 2013. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet. Res.* 29:1-10.
- Gonshor A. 2002. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: background and process. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22:547-557.
- Goodkin D.A. & Pierce G.F. 1993. Role of platelet-derived growth factor in osteoblast function and bone synthesis. *Wound Repair Regen.* 1:203-212.
- Graziani F., Ivanovski S., Cei S., Ducci F., Tonetti M. & Gabriele M. 2006. The *in vitro* effect of diferente PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin. Oral Implants Res.* 17:212-219.
- Hebda P.A. 1988. Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures. *J. Invest. Dermatol.* 91:440-445.
- Heldin C.H. & Westermark B. 1999. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growthfactor. *Physiol. Rev.* 79:1283-1316.
- Hessel L.N., Bosch G., van Weeren P.R. & Ionita J.C. 2014. Equine autologous platelet concentrates: a comparative study between different available systems. *Equine Vet. J. doi: 10.1111/evj.12288.* (Em publicação)
- Hutchins G.G. & Grabsch H.I. 2009. Molecular pathology: the future? *Surgeon* 7:366-377.
- Jacobsen L.C., Sorensen O.E., Cowland J.B., Borregaard N. & Theilgaard-Mönch K. 2008. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 83:1155-1164.
- Kraus R.M., Stallings H.W., Yeager R.C. & Gavin T.P. 2004. Circulating plasma VETGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *J. Appl. Physiol.* 96:1445-1450.
- Landesberg R., Roy M. & Glickman R.S. 2000. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 58:297-300.
- Landi E.P. & Marques Júnior J.F.C. 2003. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. *Revta Bras. Hematol. Hemoter.* 25:39-46.

- Lee S.J. 2000. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med. J.* 41:704-719.
- Maffulli N. & del Buono A. 2012. Platelet plasma rich products in musculoskeletal medicine: Any evidence? *Surgeon* 10:148-150.
- Maia L., Souza M.V., Alves G.E.S., Ribeiro Júnior J.L., Oliveira A.C., Zandim B.M. & Silva Y.F.R.S. 2009a. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica. *Pesq. Vet. Bras.* 29:241-245.
- Maia L., Souza M.V., Ribeiro Júnior J.L., Oliveira A.C., Alves G.E.S., Anjos L.B., Silva Y.F.R.S., Zandim B.M. & Moreira J.D.C.L. 2009b. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J. Equine Vet. Sci.* 29:618-626.
- Marx R.E. 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 10:225-228.
- Marx R.E. 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62:489-496.
- Mazzucco L., Balbo V., Cattana E., Guaschino R. & Borzini P. 2009. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateletex and one manual procedure. *Vox Sang.* 97:110-118.
- McCarrel T. & Fortier L. 2009. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J. Orthop. Res.* 27:1033-1042.
- Mei-Dan O., Lippi G., Sánchez M., Andia I. & Maffulli N. 2010. A revolution in soft tissue sports injury management. *Phys. Sports Med.* 38:127-135.
- Mishra A., Pavelko T. 2006. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am. J. Sports Med.* 34:1774-1778.
- Monteiro S.O., Lepage O.M. & Theoret C.L. 2009. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am. J. Vet. Res.* 70:277-282.
- Nurden A.T., Nurden P., Sanchez M., Andia I. & Anitua E. 2008. Platelets and wound healing. *Front. Biosci.* 13:3532-3548.
- Pereira R.C.F., Zacarias G.V.F., Cantarelli M.M.B.C., Silva G.B., Barbosa A.L.T., Brass K.E. & De La Côte F.D. 2013. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. *Ciência Rural* 43:1122-1127.
- Pierce G.F., Mustoe T.A., Altmann B.W., Deuel T.F. & Thomason A. 1991. Role of platelets-derived growth factor in wound healing. *J. Cell Biochem.* 45:319-326.
- Pietrzak W.S. & Eppley B.L. 2005. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J. Craniofac. Surg.* 16:1043-1054.
- Rees H.M. & Ecker E.E. 1923. An improved method for counting blood platelets. *J. Am. Med. Assoc.* 80:621-622.
- Renzi S., Riccò S., Dotti S., Sesso L., Grolli S., Cornali M., Carlin S., Patruno M., Cinotti S. & Ferrari M. 2013. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res. Vet. Sci.* 95:272-277.
- Sánchez M., Anitua E., Orive G., Iñigo M. & Andia I. 2009. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med.* 39:345-354.
- Schnabel L.V., Mohammed H.O., Miller B.J., McDermott W.G., Jacobson M.S., Santangelo K.S. & Fortier L.A. 2007. Platelet Rich Plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J. Orthop. Res.* 25:230-240.
- Schippinger G., Oettl K., Frankhauser F., Spirk S., Domej W. & Hofmann P. 2011. Influence of intramuscular application of autologous conditioned plasma on systemic circulating IGF-1. *J. Sports Sci. Med.* 10:439-444.
- Schultz G.S., Davidson J.M., Kirsner R.S., Bornstein P. & Herman H. 2011. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen.* 19:134-148.
- Smith J.J., Ross M.W. & Smith R.K.W. 2006. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 19:43-47.
- Sutter W.W., Kaneps A.J. & Bertone A.L. 2004. 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. *Am. J. Vet. Res.* 65:924-930.
- Textor J.A., Norris J.W. & Tablin F. 2011. Effects of preparation method, shear force and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Am. J. Vet. Res.* 72:271-278.
- Theoret C.L., Barber S.M., Moyana T.N. & Gordon J.R. 2001. Expression of transforming growth factor β 1, β 3, and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet. Surg.* 30:269-277.
- Theoret C.L., Barber S.M. & Gordon J.R. 2002a. Temporal localization of immunoreactive transforming growth factor β 1 in normal equine skin and in full-thickness dermal wounds. *Vet. Surg.* 31:274-280.
- Theoret C.L., Barber S.M., Moyana T.N. & Gordon J.R. 2002b. Preliminary observations on expression of transforming growth factors β 1 and β 3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet. Surg.* 31:226-273.
- Theoret C.L. & Wilmink J.M. 2013. Aberrant wound healing in the horse: naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. *Wound Rep. Reg.* 21:365-371.
- Thrall M.A. 2007. Diagnóstico dos distúrbios hemorrágicos, p.170-187. In: *Ibid.* (Ed.), *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Roca, São Paulo.
- van den Boom R., Wilmink J.M., O'Kane S., Wood J. & Ferguson M.W. 2002. Transforming growth factor-b levels during second intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Repair Regen.* 10:188-194.
- Vavken P., Saad F.A. & Murray M.M. 2006. Age dependence of expression of growth factor receptors in porcine ACL fibroblasts. *J. Orthop. Res.* 28:1107-1112.
- Vendruscolo C.P., Carvalho A.M., Moraes L.F., Maia L., Queiroz D.L., Watanabe M.J., Yamada A.L.M. & Alves A.L.G. 2012. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. *Pesq. Vet. Bras.* 32:106-110.
- Vercoutte-Edouart A.S., Dubreucq G., Vanhoecke B., Rigaut C., Renaux F., Dahri-Correia L., Lemoine J., Bracke M., Michalski J.C. & Correia J. 2008. Enhancement of PDGF-BB mitogenic activity on human dermal fibroblast by biospecific dextran derivatives. *Biomaterials* 29:2280-2292.
- Villiger P.M., Kusari A.B., Ten Dijke P. & Lotz M. 1993. IL-1 β and IL-6 selectively induce transforming growth factor β isoforms in human articular chondrocytes. *J. Immunol.* 151:3337-3344.
- Waselau M., Sutter W.W., Genovese R.L. & Bertone A.L. 2008. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232:1515-1520.
- Wasterlain A.S., Braun H.J. & Dragoo J.L. 2012. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper. Tech. Orthop.* 22:33-42.
- Wasterlain A.S., Braun H.J., Harris A.H.S., Kim H.-J. & Dragoo J.L. 2013. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. *Am. J. Sports Med.* 41:186-193.
- Weibrich G., Kleis W.K., Hafner G. & Hitzler W.E. 2002. Growth factor levels in platelet rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 30:97-102.
- Weibrich G., Kleis W.K.G., Hafner G., Hitzler W.E. & Wagner W. 2003. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin. Oral. Implants. Res.* 14:357-362.
- Werner W. & Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83:835-870.
- Wilmink J.M. & van Weeren R.P. 2004. Differences in wound healing between horses and ponies: Application of research results to the clinical approach of equine wounds. *Clin. Tech. Equine Pract.* 3:123-133.

- Wilmink J.M. & van Weeren P.R. 2005. Second-Intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Vet. Clin. Equine* 21:15-32.
- Yamada A.L.M., Carvalho A.M., Oliveira P.G.G., Felisbino S.L., Queiroz D.L., Watanabe M.J., Hussni C.A. & Alves A.L.G. 2012. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64:318-322.
- Yang L., Witten T.M. & Pidaparti R.M.A. 2013. A biomechanical model of wound contraction and scar formation. *J. Theor. Biol.* 332:228-248.
- Young A. & McNaught C-E. 2011. The physiology of wound healing. *Surgery* 29:475-479.
- Zandim B.M., Souza M.V., Frassy L.M., Vilória M.I.V., Maia L., Fonseca C.C., Valente F.V., Moreira J.C.L. & Magalhães P.C. 2013. Immunohistochemistry of factor VIII, histology and morphometry in equine tendon treated with platelet-rich plasma. *Revta Bras. Med. Vet.* 35:169-184.
- Zandim B.M., Souza M.V., Magalhães P.C., Benjamin L.A., Maia L., Oliveira A.C., Pinto J.O. & Ribeiro Júnior J.I. 2012. Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. *Pesq. Vet. Bras.* 32:83-92.

7. CAPÍTULO - 4

Avaliação macroscópica e histomorfométrica de diferentes etapas do processo de cicatrização de ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos

PINTO, José de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril, 2016. **Cinética biomolecular de fatores de crescimento e colágeno envolvidos na cicatrização de pele tratada com plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos: modelo experimental em equinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Avaliação macroscópica e histomorfométrica de diferentes etapas do processo de cicatrização de ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos

(Conforme normas do periódico Veterinary Dermatology)

RESUMO

A pele possui diversas funções, sendo fundamental para o corpo de todo ser vivo. Nos equinos as lesões cutâneas são frequentes, e um dos tratamentos que vem sendo utilizado há alguns anos em equinos, é o plasma rico em plaquetas (PRP), fonte de fatores de crescimento. O objetivo desse estudo foi avaliar macro e microscopicamente o processo de cicatrização por segunda intenção de feridas de pele de equinos tratadas ou não com dose única de PRP pobre em leucócitos (PRP-PL) aplicado 12 horas após indução cirúrgica da lesão. Foram utilizados oito equinos machos castrados, mestiços, hípidos, com idade entre 16 e 17 anos. Três feridas em formato quadrangular foram realizadas nas regiões glúteas direita e esquerda de todos os animais. Doze horas após indução das lesões, 0,5 mL de PRP-PL foi administrado em cada uma das quatro extremidades das feridas (grupo tratado=T), de uma das regiões glúteas, escolhida aleatoriamente. A região contralateral foi utilizada como controle (grupo não

tratado=NT). Seis biópsias de pele foram obtidas com Punch de 6 mm. A primeira foi realizada no dia da lesão (T0), e as demais após 1 (T1) 2 (T2) 7 (T3) e 14 (T4) dias. A sexta biópsia (T5) foi feita após completo fechamento macroscópico da lesão. Foram realizadas medições diárias de uma ferida não submetida previamente à biópsia, para avaliação da contração da lesão, que foi determinada utilizando o programa QUANT v 1.0.0.28. Foram avaliadas diariamente, características macroscópicas (exsudação, formação de coágulo, presença de crosta, de tecido de granulação e fechamento da ferida) de uma das feridas não biopsiada (tratada e não tratada). As amostras foram processadas como de rotina para avaliação histomorfométrica. As características histológicas analisadas foram inflamação, angiogênese, espessura do novo epitélio e reepitelização (escores de 0 a 3). A morfometria foi realizada mediante utilização do programa QCAPTURE PRO 6.00:6.05 a partir de 10 imagens de cada lâmina escolhidas aleatoriamente. A normalidade e homogeneidade das variáveis paramétricas foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Na sequência foram avaliados por ANOVA. As características histológicas foram analisadas pelo teste não paramétrico de Friedman. Não houve diferença entre grupos no que se refere ao tempo necessário para o fechamento da ferida. Análise histomorfométrica realizada 14 dias após indução da lesão revelou maior angiogênese ($P=0,034$) e quantidade de leucócitos totais ($P=0,0179$) na ferida tratada, com posterior redução dessas características. Tanto fibroblastos como vasos sanguíneos tiveram quantidade máxima no sétimo dia de observação para ambos os grupos com posterior redução para valores mais próximos do fisiológico observado no tempo zero. Os fibrócitos apresentaram valores significativos ($P=0,023$) no sétimo após a lesão no grupo não tratado. Esses achados, no entanto, não interferiram no processo cicatricial das lesões nos dois grupos avaliados. Avaliação microscópica geral, realizada independentemente dos escores e análise morformétrica revelou que a maioria das feridas tratadas demonstraram melhores características cicatriciais nos fragmentos examinados na última biópsia (T5).

Palavras-chave: cavalos, dermatopatia, fatores de crescimento, macroscopia e microscopia cutânea.

ABSTRACT

Macroscopic and histomorphometric analysis of different stages of cutaneous wound healing process in horses treated with leukocyte-poor platelet-rich plasma

(According to the norms of the journal Veterinary Dermatology)

The skin has several functions. It is fundamental to the body of every living being. In horses, skin lesions are common, and one of the treatments that have been used for some years in horses, is the platelet-rich plasma (PRP), a source of growth factors. The aim of this study was to evaluate macro and microscopically the process of healing by secondary intention of horse skin wounds treated or untreated with a single dose of leukocyte-poor PRP (LP-PRP) applied 12 h after surgical induction of injury. Eight healthy crossbred geldings aged between 16 and 17 years were used. Three square-shaped injuries were produced in the right and left gluteal regions of all animals. Twelve hours after injury induction, 0.5 mL LP-PRP was administered to each of the four edges of the wounds (treated group = T) from one of the gluteal regions, chosen at random. The contralateral region was used as control (untreated group = UT). Five skin biopsies were obtained with a 6-mm Punch. The first sample (T0) was obtained at injury induction, and the others after 1 (T1), 2 (T2), 7 (T3) and 14 (T4) days. The sixth biopsy (T5) was performed after complete macroscopic closure of the wound. Daily measurements of one wound were performed, which was not previously submitted to biopsy, to compose the evaluation of wound contraction, using QUANT software v. 1.0.0.28. Macroscopic characteristics (secretions, clot formation, presence of crust and granulation tissue, as well as the evolution of wound closure) of one of the non-biopsied wounds (treated and untreated) were evaluated daily. Samples were processed as routine for histomorphometric evaluation. Histological features (inflammation, angiogenesis, thickness of new epithelium, and reepithelialization) were evaluated using scores of 0 to 3. Morphometric analysis was performed on QCAPTURE PRO software 6:00:6:05, from 10 images of each section (chosen at random). Normality and homogeneity of the parametric variables were checked by the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. In sequence, ANOVA was applied. The histological features were analyzed by Friedman's non-parametric test. There was no difference between groups with respect to the time required for the wound closure. Histomorphometric analysis performed 14 days after injury induction revealed higher angiogenesis ($P=0.034$) and number of total

leukocytes ($P=0.0179$) in treated wounds, with subsequent reduction of these variables. Both fibroblasts and blood vessels had their peak of expression on the seventh day of observation in both groups, with a subsequent decline to values close to those observed at zero time. Fibrocytes were observed in larger amounts ($P=0.023$) at day seven for the group non-treated. However, these findings did not interfere with the wound healing process in either group. General microscopic evaluation performed independently of scores and morphometry revealed that the majority of treated wounds showed better healing characteristics in the sections analysed in the last biopsy (T5).

Key words: horses, dermatopathy, growth factors, macroscopic and microscopic of skin.

INTRODUÇÃO

A pele é um órgão essencial para a proteção corporal. A sua espessura nos equinos varia de 1 a 6,3 mm dependendo da localização¹, sendo mais espessa sobre a região lombossacra e área glútea.² É um obstáculo contra microrganismos, além de representar uma barreira passiva contra perdas de fluidos, o que favorece a manutenção da homeostase. Portanto, trata-se de um tecido complexo com interações celulares e moleculares.³⁻⁵

Feridas cutâneas são frequentes na espécie equina. Em estudo anterior⁶ foi observado que correspondem a aproximadamente 37% da casuística no Hospital de Clínica Veterinária da Universidade Federal de Pelotas/RS/Brasil. Dependendo da localização e extensão da lesão, pode comprometer parcial ou totalmente a utilização dos equinos em atividades esportivas ou práticas laborais. Portanto, promover uma cicatrização cutânea rápida e de qualidade é um desafio na Clínica Médica e Cirúrgica de equídeos.

O processo de cicatrização cutânea pode ser dividido em quatro fases que se sobrepõem: hemostasia, inflamação, proliferação e, por último, remodelação.⁷⁻⁸ Outros autores subdividem a terceira fase em migração e proliferação, e a quarta em contração e remodelação.⁹⁻¹⁰ As alterações inflamatórias locais observadas no presente estudo fazem parte do processo fisiológico após uma lesão cutânea¹⁰ que, se deve a liberação de mediadores celulares, que estimulam a produção de substâncias como histamina,

bradicinina, prostaglandinas e, conseqüentemente, ocasionam aumento de volume local e congestão.

O plasma rico em plaquetas (PRP), utilizado desde 1990 para tratamento de úlceras crônicas em humanos,¹¹⁻¹² é uma fonte autógena de fatores de crescimento, que vem sendo amplamente utilizado visando promover mais rápida cicatrização de feridas cutâneas, embora resultados obtidos a partir de estudos controlados sejam contraditórios. Entre os fatores bioativos presentes no PRP com importante potencial terapêutico, se destacam o transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), derivado de plaquetas (PDGF), fibroblástico básico (bFGF) e o vascular endotelial (VEGF).¹³⁻¹⁶ Enquanto pesquisas demonstram a eficácia dos fatores de crescimento em acelerar o processo de cicatrização de lesões cutâneas nos equinos,¹⁷⁻¹⁸ outros não revelam esse efeito.¹⁹⁻¹⁰ Por outro lado, há relato de uma tendência a uma melhor resposta em alguns constituintes da pele tratada com plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos (PRP-PL) com relação ao grupo controle,²¹ assim como uma melhor qualidade cicatricial.²² O presente estudo é parte de uma linha de pesquisa onde foram quantificados os fatores de crescimento TGF- $\beta 1$ e PDGF-BB pela técnica imunoenzimática ELISA²¹ e avaliadas a expressão gênica dos colágenos tipo I e III pelos métodos qRT-PCR e imunoistoquímica.^{20,22} Não ocorreu diferença estatística entre os grupos. Por outro lado, análise de regressão no grupo que recebeu o plasma rico em plaquetas revelou que a produção dos colágenos começa a estabilizar no final do processo de cicatrização macroscópica da ferida.

O presente estudo parte do princípio que feridas cutâneas tratadas com PRP-PL apresentam cicatrização de melhor qualidade. O objetivo desse estudo foi avaliar macro e microscopicamente o processo de cicatrização por segunda intenção de feridas de pele localizadas na região glútea de equinos, tratadas ou não com dose única de PRP-PL, aplicado doze horas após indução cirúrgica da lesão.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) sob o número de protocolo 96/2011. Os procedimentos foram realizados de acordo com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, os princípios éticos para pesquisa animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Legislação Brasileira vigente.

Foram utilizados oito equinos mestiços hígidos, machos castrados, com idade entre 16 e 17 ($16,37 \pm 0,52$) anos. Somente animais aparentemente sadios verificados durante exame físico geral e sem afecção dermatológica foram incluídos na pesquisa. Os animais foram alojados em baias individuais de alvenaria com de 20 m², 21 dias antes do início do experimento, onde foram alimentados com feno de tifton 85 e capim elefante picado (*Pennisetum purpureum*), além de ração farelada própria para equinos. Sal mineral e água foram deixados ad libitum. Os equinos foram diariamente deixados livres em piquete de *Brachiária decumbens* durante 2 horas no período da manhã. O apetite, coloração das mucosas, a temperatura corporal e os movimentos intestinais foram avaliados diariamente. Esse manejo foi mantido durante todo o ensaio. No período de adaptação, que foi de três semanas, os animais foram pesados, pulverizados com solução carrapaticida contendo deltametrina, e vermifugados por via oral com moxidectina (0,2 mg/kg).

Três lesões de pele em formato quadrangular foram produzidas na região glútea direita e esquerda de todos os animais, conforme já descrito²⁰⁻²³ anteriormente. Para isso, o local foi submetido a tricotomia e preparado assepticamente com digluconato de clorexidine degermante a 2% e alcoólico a 0,5%. Os animais foram sedados com xilazina a 2% (0,8 mg/kg/IV), e em seguida foi realizado bloqueio anestésico subcutâneo com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, ao redor do local a ser incidido. A lesão foi realizada com molde de plástico em formato quadrangular (6,25 cm²), sendo removidos epiderme, derme e tecido subcutâneo. As feridas foram identificadas em ambas as garupas, em A, B e C em sentido craniocaudal, sendo deixadas cicatrizar por segunda intenção. O completo fechamento da lesão foi avaliado na ferida C. As lesões A e B foram biopsiadas para avaliação histomorfométrica. Soro antitetânico foi aplicado no dia da indução da ferida cutânea. A dor foi reduzida utilizando dose única de tartarato de butorfanol (0,08 mg/kg/IV). Não foram utilizados fármacos anti-inflamatórios e antibióticos.

A obtenção do PRP-PL foi baseada no protocolo já descrito.²⁴ Após antisepsia local com álcool-iodado, 144 mL de sangue foram obtidos com agulhas e tubos a vácuo, por venipunção da jugular, e acondicionados em 36 tubos com capacidade para 4,5 mL, contendo citrato de sódio a 3,2%. Também foram obtidas amostras de sangue com EDTA para quantificação das plaquetas e leucócitos totais. Uma vez obtidas, as amostras de sangue com citrato de sódio foram homogeneizadas e centrifugadas a 120 x

g por 10 min. Após centrifugação, foi descartado de cada tubo, 50% do plasma sanguíneo presente na superfície e o restante transferido para tubos de polipropileno sem anticoagulante com capacidade para 10 mL, sendo o botão leucocitário e as hemácias sedimentadas descartadas. Em seguida, o plasma foi novamente centrifugado a 240 x g por 10 min, e na sequência foi descartado um volume de 75% do sobrenadante (maior parte sendo plasma pobre em plaquetas), e o PRP-PL contendo o botão de plaquetas, reservado. A concentração das plaquetas e dos leucócitos foi determinada manualmente²⁵ no PRP-PL e no sangue obtido com EDTA. A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer utilizando líquido de Türk para contagem dos leucócitos e de Brecher para contagem das plaquetas.²⁶

Doze horas após indução das lesões cirúrgicas, 0,5 mL do PRP-PL foi administrado em cada uma das quatro extremidades das feridas (T = tratadas), de uma das regiões glúteas, esquerda ou direita (escolha aleatória), totalizando 2 mL por ferida. A lesão contralateral foi utilizada como controle (NT = não tratadas). Todas as feridas (T e NT) foram submetidas à limpeza diária com água Milli Q.

Para análise histomorfometria foram obtidos seis fragmentos, sendo o primeiro de pele íntegra (T0) aproveitando parte do fragmento removido com lâmina de bisturi número 23 durante a produção da ferida cirúrgica. As demais amostras foram obtidas por biópsias utilizando Punch de 6 mm de diâmetro com 24 horas (T1), assim como com dois (T2) sete (T3) e 14 (T4) dias. A sexta biópsia (T5) foi obtida após completo fechamento da pele. Os fragmentos foram colocados em formalina tamponada por no máximo 48 horas e na sequência em álcool a 70%. Posteriormente foram processados como de rotina, realizados cortes com 5 µm de espessura, que foram corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), conforme descrito por Bancroft et al.²⁷

As características histológicas relacionadas inflamação, angiogênese, espessura do novo epitélio e reepitelização foram avaliadas utilizando-se escores de 0 a 3, conforme escala semiquantitativa de Lepault et al.²⁸ adicionada pela característica espessura do novo epitélio, estudada por Monteiro et al.¹⁹ (Tabela 1). Três pesquisadores sem conhecimento se os fragmentos histológicos pertenciam a animais tratados ou não tratados fizeram essa avaliação. Adicionalmente, foi realizada análise morfométrica. Para isso foram obtidas aleatoriamente 10 imagens fotográficas mediante utilização de microscópio de luz (Olympus BX50, BR Ltda Produtos e Equipamentos

para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil), acoplado a câmera fotográfica (Olympus QColor 3, Brazeiss Representações Ltda, São Paulo, SP, Brasil), conectada a um computador para captação de imagens pelo programa QCAPTURE PRO 6.00:6.05. As imagens foram colocadas sob uma grade com 400 interseções confeccionada no programa Power Point,²⁴ utilizando 48 interseções. Os tipos celulares e estruturas quantificadas na morfometria foram leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, vasos sanguíneos, colágenos, fibroblastos, fibrócitos e miofibroblastos.

Foram avaliadas diariamente as características macroscópicas (ferida C - tratada e não tratada) exsudação, presença de crosta e de tecido de granulação, assim como evolução do fechamento da ferida até a aparente cicatrização. Também foram realizadas mensurações diárias da retração na borda da ferida C, que posteriormente foram escaneadas e a área transversal (cm²) determinada utilizando software QUANT v 1.0.0.28,²⁷ conforme descrito previamente.²³ Finalmente, antes e semanalmente após indução da lesão, foram avaliadas variáveis hematológicas (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais e plaquetas) e bioquímicas (proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio) mediante obtenção do sangue total também por venipunção da jugular em tubos a vácuo contendo o anticoagulante EDTA.

Tabela 1 - Classificação das características histológicas inflamação, angiogênese, espessura do novo epitélio e reepitelização conforme os critérios mencionados.

VARIÁVEIS	ESCORE	CRITÉRIOS AVALIADOS
Inflamação	0	- Ausente
	1	- Ø foco inflamatório < 2x a espessura epiderme intacta adjacente;
	2	- Ø entre 2 e 5x a espessura da epiderme intacta;
	3	- Ø + 5x a espessura da epiderme intacta.
Angiogênese	0	- Ausência de novo capilar dentro do leito da ferida;
	1	- Entre 1 e 5 novos capilares presentes;
	2	- Entre 6 e 15 novos capilares presentes;
	3	- + de 15 novos capilares presentes.
Espessura do novo epitélio*	0	- Inferior;
	1	- Igual;
	2	- Superior ao da epiderme adjacente intacta.
Reepitelização	0	- Ausência de novo epitélio na margem da ferida;
	1	- Novo epitélio cobrindo 1/3 do tecido de granulação.
	2	- Novo epitélio cobrindo 2/3 do tecido de granulação.
	3	- Epitelização aparentemente completa.

Baseado na classificação descrita por Lepault et al.²⁸ e Monteiro et al.^{19*}

Análise estatística

As variáveis macroscópicas (exsudação, presença de crosta, presença de tecido de granulação e fechamento de ferida) foram submetidas ao teste t de student para duas médias dependentes ou pareadas. As características histológicas (reação inflamatória, angiogênese, espessura do novo epitélio e reepitelização) foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Friedman. A normalidade e homogeneidade das variáveis paramétricas foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. A comparação entre feridas T e NT em cada tempo, considerando o efeito animal foi realizada utilizando ANOVA. A mesma análise foi usada para avaliar o resultado dentro de cada grupo, assim como para verificar a relação entre o tempo final de cicatrização das feridas, e a quantidade mais alta ou mais baixa de leucócitos no PRP-PL. A

comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

O PRP-PL foi administrado imediatamente após processamento laboratorial e confirmação do número de plaquetas e leucócitos, cujos valores no sangue total e no componente rico em plaquetas e pobre em leucócitos estão demonstrados na Tabela 2. Os valores médios de plaquetas/ μ L no sangue total foram de $116,25 \pm 7,50$, $212,13 \pm 7,77$, $210,88 \pm 52,49$, $180,75 \pm 22,36$ e $204,88 \pm 58,97$, nos tempos T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre o tempo máximo necessário para fechamento da ferida cirúrgica e a quantidade mais alta (900, 800, 450 e 350) ou mais baixa (100, 150, 150, 50) de leucócitos/ μ L no PRP-PL considerando os oito animais. Também não foi encontrada correlação significativa ($r = -0,08$; $P > 0,05$) entre o tempo de cicatrização da ferida e a concentração de leucócitos no PRP-PL proveniente de cada equino, no dia do tratamento (Fig. 1).

Nenhum dos oito equinos apresentou variações extremas de temperatura retal, hiporexia, ou outras alterações físicas que comprometessem a coleta de dados. As variáveis referentes às características hematológicas estão apresentadas na Tabela 3. Os valores se mantiveram dentro dos limites de normalidade para a espécie ou discretamente elevados.

Tabela 2 - Contagem de plaquetas e leucócitos no sangue total e plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos

	Sangue Total		PRP-PL	
	Plaquetas (plaquetas/ μ L)	Leucócitos (células/ μ L)	Plaquetas (plaquetas/ μ L)	Leucócitos (células/ μ L)
1	140.000	10.900	350.000	450
2	110.000	10.600	320.000	100
3	120.000	8.500	350.000	900
4	130.000	5.700	390.000	800
5	130.000	7.900	330.000	50
6	100.000	9.400	320.000	150
7	150.000	5.600	380.000	350
8	140.000	7.600	360.000	150

PRP-PL: plasma rico em plaquetas e pobres em leucócitos.

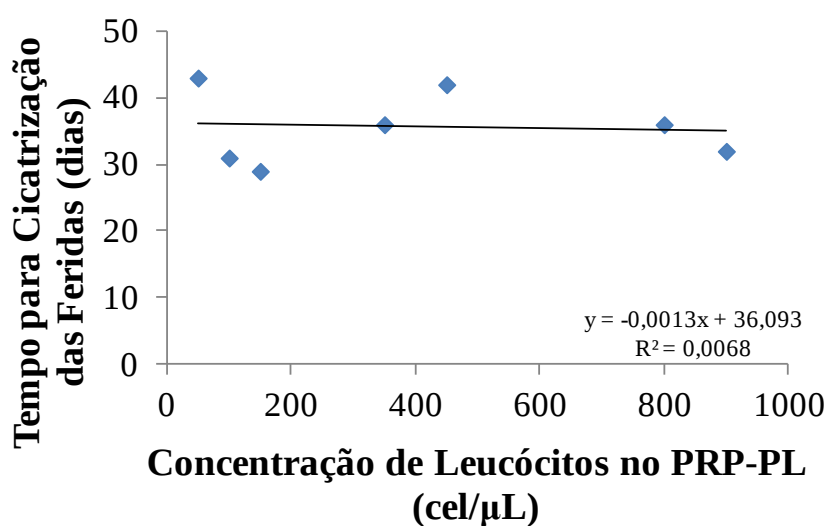


Figura 1- Relação entre a concentração de leucócitos no PRP-PL de cada equino no dia de realização do tratamento, e o tempo necessário para fechamento macroscópico das feridas.

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão das variáveis hematológicas e bioquímicas avaliadas durante o período experimental

Tempo	0	1	2	3	4	5
Hematócrito (%)	30,40±3,93	28,68±3,39	30,33±3,07	28,38±4,70	28,88±3,1	28,55±3,58
Hemoglobina (g/dL)	10,07±1,15	9,77±1,10	9,83±0,82	9,55±1,43	9,73±1,01	9,68±1,00
Eritrócitos (células/ μ L)	6,39±0,94	6,08±1,02	5,77±0,68	5,89 ±1,11	5,85±0,74	5,79±0,85
Leucócitos (células/ μ L)	7,93±1,81	7,88±1,48	8,05±2,27	7,93±1,96	7,71±1,29	6,61±1,08
PPT (g/dL)	7,82±0,57	7,75±0,47	7,62±0,51	7,77±0,45	7,57±0,43	7,62±0,44
Fibrinogênio (g/dL)	0,38±0,07	0,39±0,17	0,37±0,16	0,37±0,19	0,32±0,14	0,35±0,17

Tempos: 0 = antes; 1 = 24 horas; 2 = 48 horas; 3 = 1 semana; 4 = 2 semanas e 5 = final.
PPT: proteína plasmática total.

Avaliação Macroscópica

Durante a visualização do fechamento da ferida, realizada durante a limpeza foi observado um discreto sangramento inicial e leito totalmente preenchido por uma crosta de coágulo que, ao ser removido, revelou região hiperêmica, pequenas sinuosidades e exsudação serosa. As bordas começavam a demonstrar contornos irregulares por volta do sétimo dia depois de produzidas as feridas.

Os dados referentes às características macroscópicas avaliadas (exsudação, presença de crosta, tecido de granulação, assim como a evolução da cicatrização) estão apresentados na Tabela 4. O tempo máximo de cicatrização, monitorado pela medida da área, é demonstrado na Fig. 2. Após duas semanas havia presença de crosta de aspecto pardo-avermelhada revestindo todo leito das feridas, independente do tratamento. O aspecto foi de tecido em cicatrização, com a área lesionada iniciando um processo de arredondamento das bordas.

Independente do grupo de feridas (T, NT), a partir do quarto dia, todo o leito foi preenchido por tecido de granulação, sendo facilmente visível macroscopicamente em média do quarto ao décimo sexto dia tanto na lesão tratada como não tratada com PRP-PL. O tempo máximo necessário para cicatrização das lesões foi de 47 dias em ambos

os grupos, sendo os valores médios de $36,87 \pm 7,45$ e de $38,75 \pm 6,47$ dias nas feridas não tratadas e tratadas, respectivamente. Não houve diferença ($P=0,59$) entre grupos. A evolução do fechamento macroscópico da ferida pode ser observada na Fig. 3, em fotografias esporadicamente obtidas.

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão de tempo de permanência máximo (dias), referentes às características macroscópicas avaliadas nas feridas de ambos os grupos.

	Tratado (dias)	Não tratado (dias)
Exsudação	$3,17 \pm 0,25$	$3,13 \pm 0,30$
Crosta	$13,75 \pm 1,39$	$15,63 \pm 1,15$
Granulação	$15,75 \pm 0,59$	$16,13 \pm 0,61$
Cicatrização	$38,75 \pm 6,47$	$36,87 \pm 7,45$

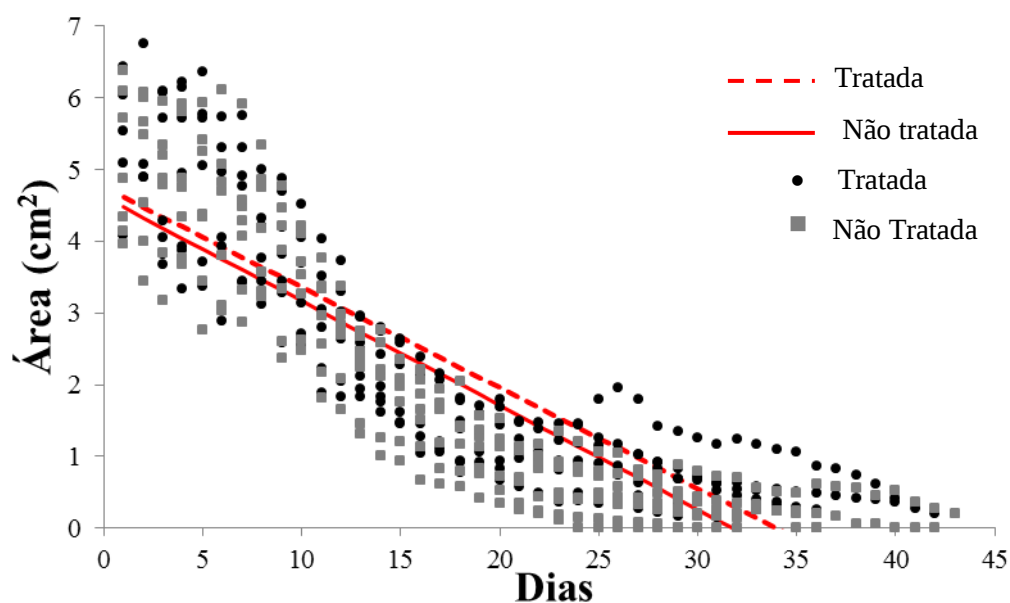


Figura 2 – Monitoramento da redução da área da lesão em feridas tratadas como não tratadas com PRP-PL. Nota-se comportamento semelhante entre os grupos, o que foi confirmado pela análise de regressão linear ($P>0,05$).

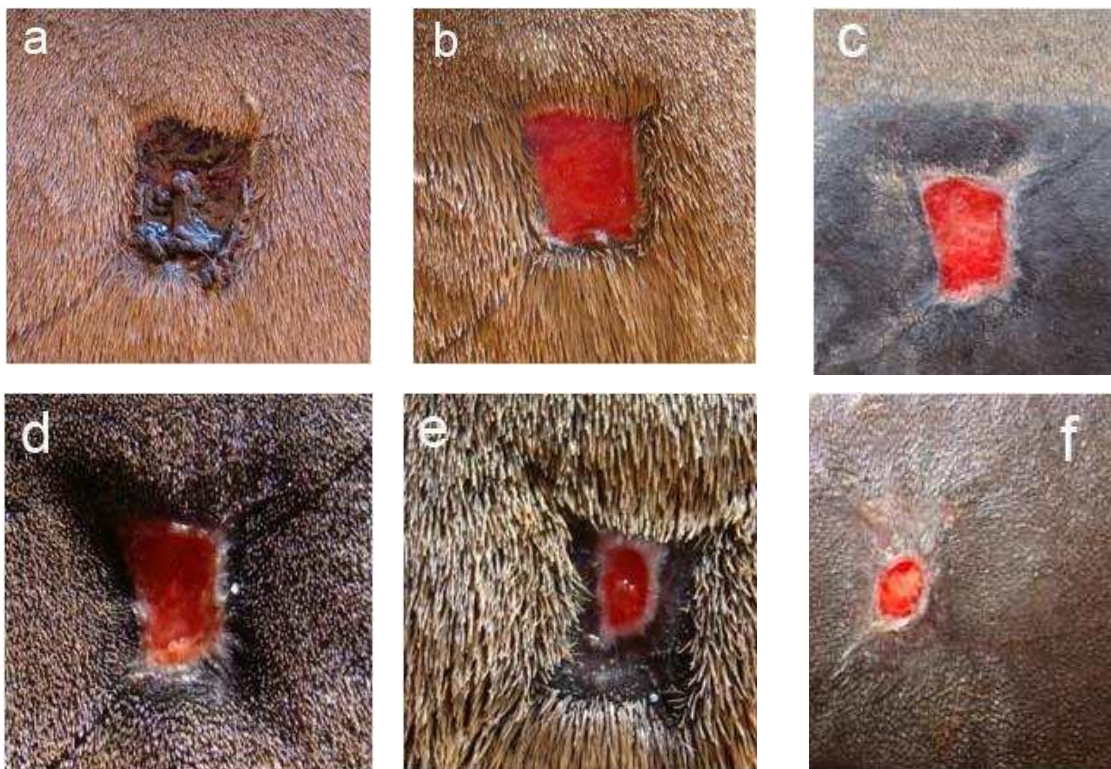


Figura 3 – Evolução do fechamento da ferida independente do grupo após 10 (a,b), 15 (c,d), 25 (e) e 34 (f) dias de indução da lesão cutânea.

Avaliação Histopatológica

Os fragmentos de pele íntegra (T0) demonstraram epiderme com camada córnea em toda a sua extensão, e na derme folículos pilosos, glândulas sebáceas, vasos sanguíneos e raras células inflamatórias linfoplasmocitárias. Após 24 horas da indução da lesão (T1) havia infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico na derme (Fig. 4a), necrose acentuada e extensa da epiderme com infiltrado inflamatório neutrofílico (Fig. 4b), onde esta apresentou diâmetro entre duas e cinco vezes a espessura da epiderme intacta, sendo classificada como escore 2 para reação inflamatória, tanto na ferida tratada como no controle. Nesta fase da lesão não foi possível emitir um escore para reepitelização da epiderme e nem para angiogênese e fibroplasia da derme.

Nos fragmentos obtidos com 48 horas (T2; Fig. 4c,d) havia exsudato fibrinopurulento acentuado com predominância de neutrófilos e eosinófilos, que abrangiam a epiderme e derme superficial e na derme angiogênese ao longo do leito da

ferida. Ambas as características receberam escore 2, com diâmetro variando entre duas e cinco vezes a espessura da epiderme intacta para o infiltrado inflamatório, e entre 6 e 15 novos capilares para a angiogênese. Adicionalmente, houve redução ($P>0.05$) do número de neutrófilos em relação ao tempo de 24 horas em ambos os grupos.

Nas amostras obtidas após uma semana (T3) a reepitelização da epiderme encontrava-se com focos de hiperplasia (Fig. 4e,f). Na derme o tecido de granulação foi bastante expressivo, caracterizando-se por pequenos vasos revestidos por células endoteliais tumefeitas, edema ou substância fundamental amorfa, intensa proliferação fibroblástica e discreta organização das fibras colágenas. Os fibroblastos desorganizados foram mais bem visualizados na coloração de Tricrômico de Masson (Fig. 5). A população dos leucócitos totais ($P=0,8835$) associados à lesão foi mista, com predominância aleatória de neutrófilos ($P=0,8358$) e eosinófilos ($P=0,8619$), não havendo diferença entre os grupos. Linfócitos também foram observados em menor quantidade.

As feridas biopsiadas com 14 dias demonstraram similaridade nos achados histológicos entre os grupos. Foi observado hiperplasia acentuada da epiderme (Fig. 4g,h), não houve diferença entre a quantidade de neutrófilos ($P=0,2088$), eosinófilos ($P=0,3506$), número de vasos sanguíneos ($P=0,9728$), colágenos ($P=0,4836$), fibroblastos ($P=0,8182$), fibrócitos ($p=0,8853$) e miofibroblastos ($P=0,6234$) associados a reparação da ferida. Houve diferença entre grupos para os leucócitos totais ($P=0,0179$) e macrófagos ($P=0,0596$), com maior quantidade na lesão tratada, assim como ocorreu uma maior angiogênese no grupo tratado (Fig. 6).

Os cortes histológicos realizados após o fechamento da pele (Fig. 4i,j) em ambos os grupos, revelaram escore 2 para reepitelização, onde o novo epitélio cobria 2/3 da epiderme e 3 para fibroplasia (paralelismo entre fibroblastos). Em uma visão geral, a configuração mais regular dos fibroblastos e fibrócitos e o paralelismo de fibras colágenas foram observados em 75% dos fragmentos histológicos das feridas tratadas, sugerindo uma melhor cicatrização neste grupo (Fig. 4i) do que nas feridas controles (Fig. 4j), porém não houve diferença estatística, a exceção da característica número de fibrócitos que foi maior no grupo não tratado, sete dias depois de induzida a ferida.

A coloração Tricrômico de Masson (TM) (Fig. 5), utilizada para adicionar informação sobre as fibras colágenas, possibilitou a observação de outras características da ferida. Nas amostras coradas com TM foi observada no tempo de 48 horas de

induzida a lesão, necrose acentuada da epiderme nos bordos da ferida, e presença de crosta desidratada recobrindo a lesão (Fig. 5a,b).

A partir de uma semana os fibroblastos são destacados no meio do azul tricrômico (Methyl blue)²⁷ e começam a adquirir aparência de miofibroblastos, célula com características morfológicas intermediárias entre o fibroblasto e célula muscular lisa (possui agregado de actina e miosina no citoplasma). Os novos capilares começam a ser observados como pequenos brotos. Os escores para angiogênese variaram entre 2 e 3 em ambos os grupos. Foi possível observar menor quantidade de substância fundamental amorfa, com matriz extracelular constituída predominantemente por espessas fibras colágenas em fase inicial de organização (Fig. 5c,d).

Com duas semanas foi possível observar grande número de vasos, culminando com a máxima expressão da angiogênese, ou seja, mais de quinze novos capilares presentes e melhor alinhamento de fibras colágenas (Fig. 5e,f). Neste tempo houve maior ($P=0,0034$) (Fig. 6) quantidade de vasos sanguíneos na ferida tratada. Também foi possível destacar a transição entre fibras colágenas organizadas e alinhadas.

Na fase final (T5) observou-se organização acentuada das fibras colágenas (Fig. 3g,h) que se encontravam dispostas em feixes alinhados paralelamente, sendo que este alinhamento foi melhor visualizado no grupo tratado (Fig. 5g).

Avaliação Morfométrica

Das variáveis morfométricas analisadas, a contagem de leucócitos totais e de fibrócitos, apresentaram diferença entre grupos, sendo superior, respectivamente, na amostra obtida duas ($P=0,017$) e uma ($P=0,023$) semana após a lesão nas feridas tratadas (leucócitos totais) e não tratadas (fibrócitos) com PRP-PL. Os resultados referentes à análise morfométrica estão apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7.

Aumento considerável de neutrófilos ($P=0,0012$) coincidiu com o tempo observado para os leucócitos totais, ou seja, na amostra obtida nas primeiras 24 horas, quando comparado com o tempo zero. Da mesma forma, o aumento foi maior ($P<0,05$) na ferida tratada. Os eosinófilos apresentaram um pico de expressão máxima após 48 horas no grupo não tratado com redução a partir de uma semana depois de realizada a lesão, quando já se observavam valores próximos aos basais para ambos os grupos (Tabela 5).

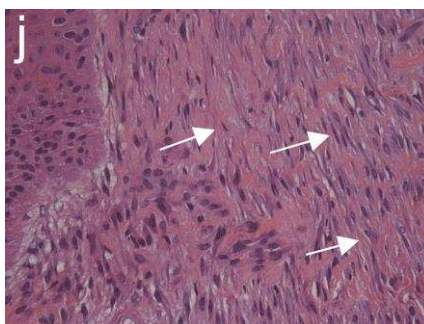
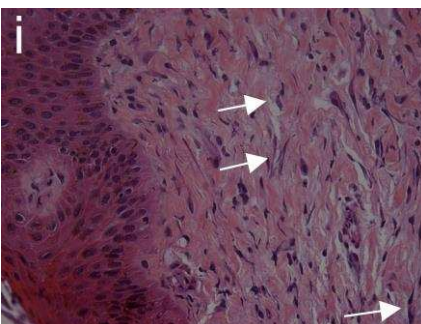
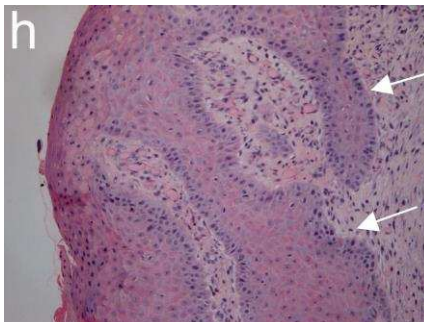
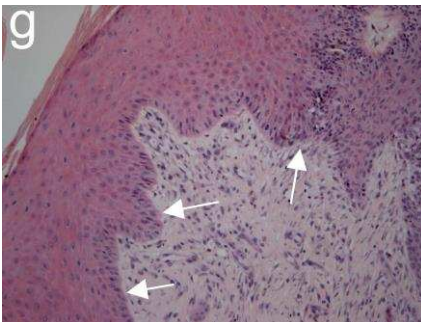
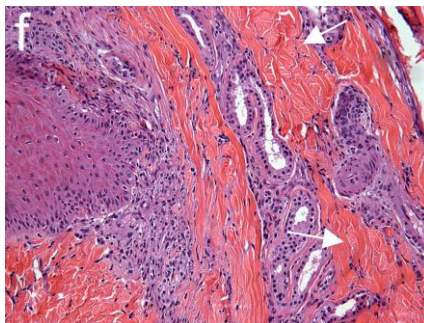
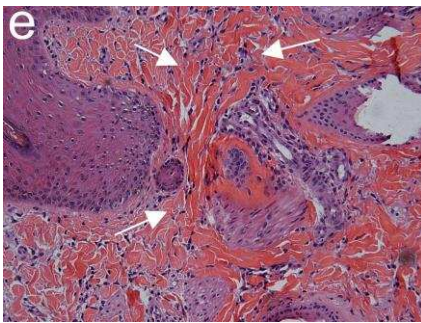
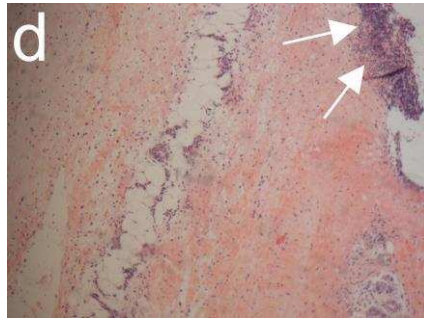
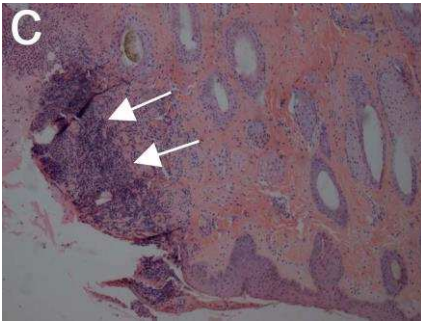
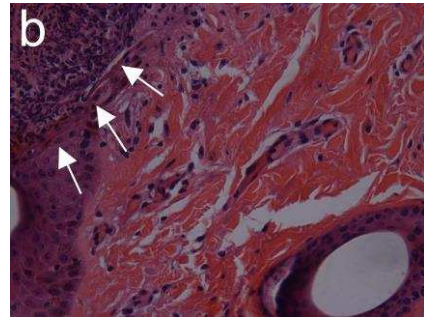
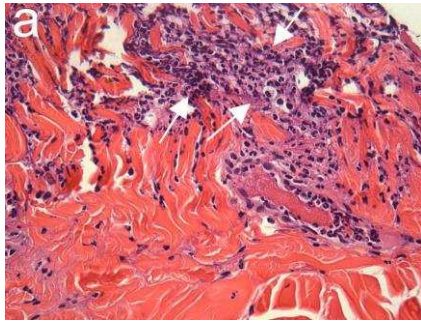


Figura 4 – Fotomicrografia do processo de cicatrização de pele de equinos. Imagem apresentando fragmentos obtidos após 24 horas de induzida a lesão em ferida tratada (a) e não tratada (b). Na imagem (a) nota-se infiltrado inflamatório predominante neutrofilico na derme (setas) e na (b), também é possível observar área de necrose da epiderme na borda superior esquerda (setas), associada a infiltrado inflamatório polimorfonuclear, compatível com o tempo de indução da lesão. As imagens c (tratada) e d (não tratada) representam 48 horas após indução da lesão (Tempo 2), com infiltrado inflamatório mais acentuado na ferida tratadas (setas). Uma semana depois de produzida a lesão (Tempo 3), nota-se a epiderme com contornos irregulares em ambos os grupos (d, e), e início da organização do colágeno (setas). Na segunda semana (Tempo 4), o infiltrado leucocitário se encontra quase imperceptível, mas é possível observar organização moderada de fibroblastos e epiderme hiperplásica (g, tratada; h, não tratada) (setas). No tempo 5, condizente com o fechamento macroscópico da lesão foi observada uma epiderme mais fina na ferida não tratada (i), mas a ferida tratada (j) apresentou um processo cicatricial, aparentemente mais organizado do que na pele não tratada (setas). Hematoxilina-Eosina. Aumento: 40 x (c,d); 100 x (g,h); 200 x (a,b,e,f,i e j).

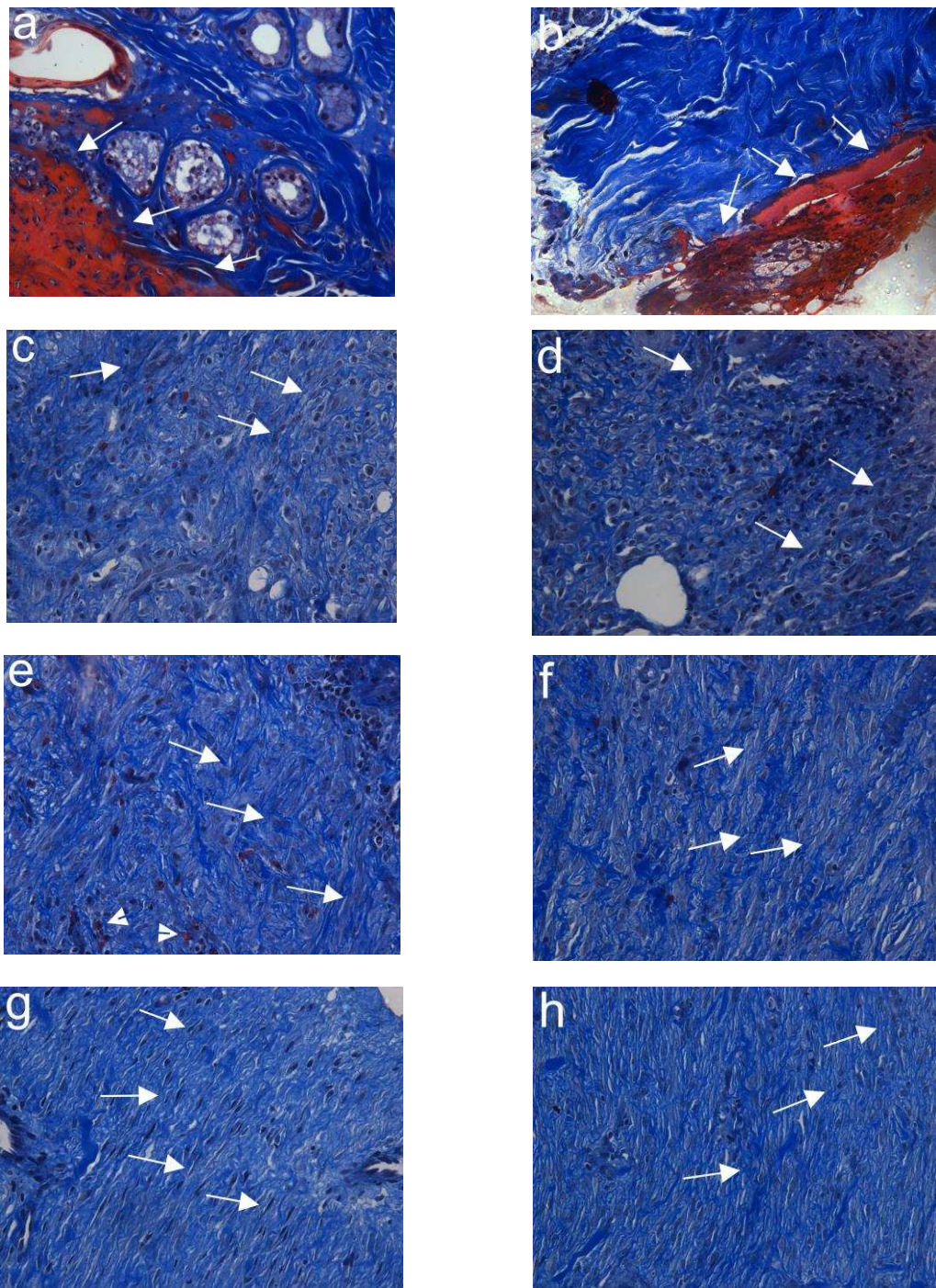


Figura 5 – Fotomicrografia do processo de cicatrização cutânea em equinos. Nota-se no grupo tratado (a) e controle (b), no tempo de 48 horas (T2), área de hemorragia e necrose na epiderme e derme superficial destacada em coloração avermelhada (setas), contrastando na derme com fibras colágenas compactas, em arranjo paralelo de

coloração azul escura. Nos achados de uma semana (T3) notam-se fibras colágenas esparsas, com espaços vazios, alinhamento moderado de fibroblastos (setas) e poucos vasos em destaque em ambos os grupos (c, tratado) e (d, controle). Nas lesões após duas semanas (T5), as fibras colágenas se encontram em arranjo compacto; existiam poucos espaços vazios, preenchido por colágeno (setas), com maior número de vasos sanguíneos na ferida tratada (cabeça de setas) (e), em comparação com a ferida não tratada (f), com maior quantidade de angiogênese aos 14 dias após a lesão. Nas imagens g (ferida tratada) e h (não tratada), obtidas quando a lesão se encontrava macroscopicamente cicatrizada observa-se fibras colágenas arrançadas de forma menos compactadas na ferida controle (setas). O alinhamento de fibroblastos e fibrócitos é mais bem evidenciado nas feridas tratadas (setas). Tricrômico de Masson. Aumento: 200x.

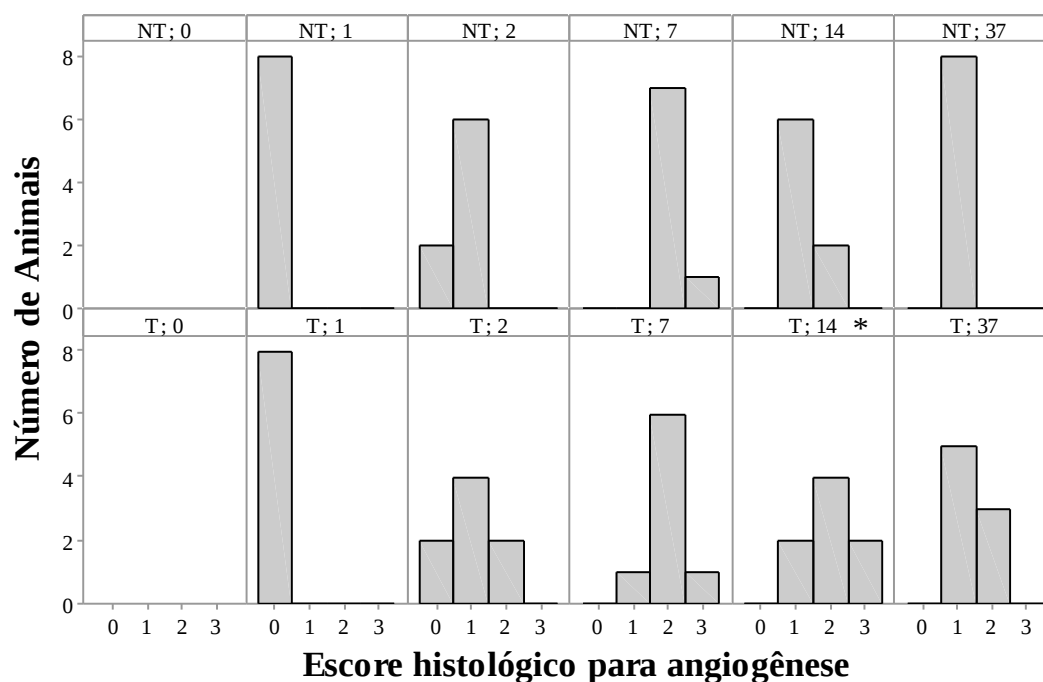


Figura 6 – Avaliação histológica da angiogênese (escores de 0 a 3) nas feridas não tratadas (NT) e tratadas (T) com PRP-PL. A quantidade máxima de cinco capilares (escore 1) foi mais frequente nas feridas tratadas (75%). Por outro lado, o escore 2 que corresponde ao máximo de 15 novos capilares foi menos frequente nas lesões que receberam o PRP-PL (25%). Finalmente, o escore 3, que representa uma quantidade acima de 15 novos capilares, foi observado em apenas 25% das feridas não tratadas. Entretanto, somente aos 14 dias houve diferença (*: $P < 0,05$) entre grupos, onde valores mais elevados foram observados nas feridas tratadas.

A contagem de macrófagos teve um aumento de mais de cinco células de T0 até T3, tendo um ápice no sétimo dia pós-produzida a lesão, tanto no grupo tratado como no controle. A partir de uma semana, o número de macrófagos reduziu no grupo de feridas controle, mas no grupo tratado ainda permaneceu elevado até duas semanas (Tabela 6), revelando diferença estatística em relação ao grupo controle aos 14 dias ($P = 0,059$). Após duas semanas houve um discreto declínio dessas células, de forma a aproximar dos valores basais no T5, em ambos os grupos.

Maiores quantidades de vasos sanguíneos foram observados nas amostras de pele avaliadas com uma semana, particularmente no grupo tratado (Tabela 6), sendo a redução dos vasos maior nesse grupo ($P = 0,0672$), quando comparado com o não tratado

no momento de fechamento da ferida. Na realidade, em ambos os grupos houve aumento considerável, mas não estatisticamente significativo ($P=0,120$) no número de vasos. Por outro lado, partir do sétimo dia ocorreu diminuição gradativa até o fechamento da ferida, quando a contagem retornou a valores próximos aos limites fisiológicos encontrados no tempo zero. Com relação às fibras colágenas, foi observada diminuição ($P=0,0115$) no T1 quando comparado com a pele sadia (T0). A partir desse momento ocorreu aumento gradativo até atingir um valor de quase cinco vezes a mais do que o encontrado na pele sadia (T0), o que ocorreu em T5, e em ambos os grupos.

A máxima elevação no número de fibroblastos (Tabela 7) foi observada no T3, mantendo semelhança de valores entre os grupos. O aumento em relação ao tempo T0 foi de 2,4 vezes para ambos os grupos. A partir de uma semana até a avaliação final houve redução progressiva, mas mantendo similaridade entre grupos ($P=0,5623$). Os fibrócitos apresentaram importante redução no T1 com relação ao T0, com aumento progressivo em ambos os grupos até a avaliação final (Tabela 7), revelando diferença no tempo T3 (uma semana), com superioridade do grupo controle ($P=0,0230$), conforme mencionado previamente. Finalmente, os miofibroblastos tiveram um aumento progressivo, semelhante entre os grupos, de mais de dezoito vezes do tempo T0 até o tempo final, sem diferença estatística. A quantidade máxima dessas células foi no T5 para ambos os grupos, com números superiores ($P=0,389$) no grupo não tratado.

Tabela 5 – Avaliação morfométrica (média±desvios padrão) das variáveis leucócitos totais, neutrófilos e eosinófilos, obtida por sistema de escore para verificação do processo de cicatrização de pele de equinos tratados ou não com PRP-PL

Tempo (dias)	Tratado	Não tratado
Leucócitos Totais		
0	0,88±2,36 ^{Ad}	1,88±2,30 ^{Ab}
1	33,00±20,00 ^{Aa}	26,88±13,18 ^{Aa}
2	28,50±20,72 ^{Aab}	22,63±8,23 ^{Aa}
7	21,00±6,48 ^{Aabc}	20,38±9,86 ^{Aa}
14	11,50±4,41 ^{Abcd}	6,50±1,41 ^{Bb}
37	3,38±4,27 ^{Acđ}	2,13±1,25 ^{Ab}
Média ± DP	16,71±16,62 ^A	13,40±12,74 ^A
Neutrófilos		
0	0,12±0,35 ^{Ab}	0,12±0,35 ^{Ab}
1	25,75±20,18 ^{Aa}	18,87±14,69 ^{Aa}
2	18,37±18,31 ^{Aab}	10,87±7,14 ^{Aab}
7	10,00±6,30 ^{Aabc}	9,12±11,75 ^{Aab}
14	2,12±3,36 ^{Abc}	0,37±0,52 ^{Aab}
37	2,25±3,58 ^{Abc}	0,37±0,74 ^{Ab}
Média ± DP	9,76±14,55 ^A	6,62±10,52 ^A
Eosinófilos		
0	0,00±0,00 ^{Ab}	0,00±0,00 ^{Aa}
1	0,75±0,71 ^{Aab}	1,50±2,00 ^{Aa}
2	0,25±0,71 ^{Aab}	16,62±0,35 ^{Aa}
7	1,00±0,93 ^{Aa}	1,12±1,46 ^{Aa}
14	0,25±0,71 ^{Aab}	0,00±0,00 ^{Aa}
37	0,00±0,00 ^{Ab}	0,12±0,35 ^{Aa}
Média ± DP	0,37±0,70 ^A	3,22±1,15 ^A

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes na mesma linha e coluna, respectivamente, diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 6 - Avaliação morfométrica (média $\pm$ desvios padrão) das variáveis macrófagos, vasos sanguíneos e colágenos, obtida por sistema de escore, para verificação do processo de cicatrização de pele de equinos tratados ou não com PRP-PL

Tempo (dias)	Tratado	Não tratado
Macrófagos		
0	1,75 $\pm$ 2,05 ^{Ac}	1,75 $\pm$ 1,98 ^{Ac}
1	6,50 $\pm$ 2,51 ^{Aab}	6,50 $\pm$ 1,85 ^{Aab}
2	9,88 $\pm$ 3,64 ^{Aa}	11,63 $\pm$ 4,75 ^{Aa}
7	10,00 $\pm$ 3,12 ^{Aa}	10,13 $\pm$ 6,03 ^{Aab}
14	9,13 $\pm$ 3,94 ^{Aa}	6,13 $\pm$ 1,55 ^{Abc}
37	2,13 $\pm$ 2,30 ^{Abc}	1,63 $\pm$ 1,30 ^{Ac}
Média $\pm$ DP	6,56 $\pm$ 4,51 ^A	6,29 $\pm$ 5,01 ^A
Vasos sanguíneos		
0	7,37 $\pm$ 6,50 ^{Ab}	7,25 $\pm$ 6,11 ^{Ab}
1	16,00 $\pm$ 11,14 ^{Aab}	14,12 $\pm$ 8,31 ^{Aab}
2	15,00 $\pm$ 6,45 ^{Aab}	13,62 $\pm$ 6,78 ^{Aab}
7	27,25 $\pm$ 13,26 ^{Aa}	19,00 $\pm$ 8,11 ^{Aa}
14	10,62 $\pm$ 6,65 ^{Ab}	10,50 $\pm$ 5,15 ^{Aab}
37	7,62 $\pm$ 4,21 ^{Ab}	10,62 $\pm$ 6,32 ^{Aab}
Média $\pm$ DP	13,97 $\pm$ 10,65 ^A	12,51 $\pm$ 7,50 ^A
Colágeno		
0	1631,38 $\pm$ 304,39 ^{Abc}	1631,38 $\pm$ 304,39 ^{Abc}
1	498,00 $\pm$ 237,00 ^{Ac}	432,00 $\pm$ 223,70 ^{Ad}
2	1223,50 $\pm$ 377,43 ^{Ab}	1190,38 $\pm$ 502,08 ^{Ac}
7	1644,63 $\pm$ 433,45 ^{Aab}	1661,25 $\pm$ 226,75 ^{Abc}
14	1850,75 $\pm$ 552,39 ^{Aa}	2018,38 $\pm$ 308,99 ^{Aab}
37	2192,75 $\pm$ 258,72 ^{Aa}	2260,75 $\pm$ 332,59 ^{Aa}
Média $\pm$ DP	1506,83 $\pm$ 647,89 ^A	1532,35 $\pm$ 684,16 ^A

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes na mesma linha e coluna, respectivamente, diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 7 - Avaliação morfométrica (média $\pm$ desvios padrão) das variáveis fibroblastos, fibrócitos e miofibroblastos, obtidas por sistema de escore, para verificação do processo de cicatrização de pele de equinos tratados ou não com PRP-PL

Tempo (dias)	Tratado	Não tratado
Fibroblastos		
0	36,12 $\pm$ 12,33 ^{Ac}	36,12 $\pm$ 12,33 ^{Ac}
1	38,25 $\pm$ 16,54 ^{Ac}	37,62 $\pm$ 17,74 ^{Ac}
2	51,37 $\pm$ 25,09 ^{Abc}	46,25 $\pm$ 25,71 ^{Ac}
7	87,87 $\pm$ 17,29 ^{Aa}	89,50 $\pm$ 14,53 ^{Aa}
14	76,37 $\pm$ 21,65 ^{Aab}	74,62 $\pm$ 12,15 ^{Aab}
37	52,75 $\pm$ 12,19 ^{Abc}	53,37 $\pm$ 11,13 ^{Abc}
Média $\pm$ DP	57,12 $\pm$ 25,73 ^A	56,24 $\pm$ 25,14 ^A
Fibrócitos		
0	22,62 $\pm$ 6,82 ^{Abcd}	20,87 $\pm$ 6,49 ^{Ac}
1	12,37 $\pm$ 5,32 ^{Ad}	12,12 $\pm$ 4,49 ^{Ac}
2	17,75 $\pm$ 6,96 ^{Ac}	14,12 $\pm$ 8,36 ^{Ac}
7	27,87 $\pm$ 7,94 ^{Bbc}	38,50 $\pm$ 9,44 ^{Aab}
14	34,25 $\pm$ 16,79 ^{Ab}	35,12 $\pm$ 9,25 ^{Ab}
37	51,25 $\pm$ 6,71 ^{Aa}	48,42 $\pm$ 5,50 ^{Aa}
Média $\pm$ DP	27,68 $\pm$ 15,47 ^A	28,19 $\pm$ 15,28 ^A
Miofibroblastos		
0	4,87 $\pm$ 2,53 ^{Ac}	5,37 $\pm$ 3,89 ^{Ac}
1	11,75 $\pm$ 5,82 ^{Ac}	12,50 $\pm$ 4,00 ^{Ac}
2	17,12 $\pm$ 5,08 ^{Ac}	16,62 $\pm$ 9,29 ^{Ac}
7	40,00 $\pm$ 8,37 ^{Ab}	43,20 $\pm$ 19,48 ^{Ab}
14	68,75 $\pm$ 16,23 ^{Aa}	74,12 $\pm$ 17,93 ^{Aa}
37	80,37 $\pm$ 17,39 ^{Aa}	86,37 $\pm$ 13,38 ^{Aa}
Média $\pm$ DP	37,14 $\pm$ 30,81 ^A	39,69 $\pm$ 33,75 ^A

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes na mesma linha e coluna, respectivamente, diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

Conforme mencionado previamente, o tempo máximo para fechamento macroscópico das lesões foi de 47 dias, sendo os valores médios menores nas feridas não tratadas com PRP-PL. Esse período de tempo médio de cicatrização se assemelha ao mencionado para feridas não contaminadas, localizadas na região torácica, que foi de aproximadamente quatro semanas,³⁰ bem como em lesões realizadas da mesma forma e na mesma região que a descrita no presente estudo.²³ O menor tempo de fechamento da ferida não tratada com PRP também foram relatados,¹⁹ em lesões produzidas na superfície dorsolateral do metacarpo. Por outro lado, uma cicatrização macroscópica mais rápida pode não refletir em um tecido de melhor qualidade.²² O mesmo foi observado no presente estudo, onde as feridas tratadas com PRP-PL apresentaram um tecido cicatricial de melhor qualidade no último tempo de avaliação, principalmente em relação ao alinhamento de fibras colágenas e fibroblastos, concluída após avaliação dos três avaliadores.

Os achados macroscópicos observados durante o exame diário corroboram com Ferreira et al.²³, que observaram formação de crosta escura a partir do coágulo no local, seguida por formação de tecido de granulação, contração e reepitelização. O período de observação de secreção serosa nas feridas foi bastante curto, sendo ao redor de três dias após indução das lesões. As feridas permaneceram com aparência avermelhadas e brilhantes, principalmente após a limpeza diária, mas com pouquíssima secreção.

A crosta de aspecto pardo-avermelhado, observada no leito da ferida em duas semanas de induzida a lesão cirúrgica, é condizente com a fase proliferativa da cicatrização, conforme observado³¹ em feridas cutâneas na região dorsal de coelhos, produzidas mediante queimadura com bisturi elétrico. Duas semanas após remoção cirúrgica da pele dos coelhos, os autores observaram feridas ressecadas, revelando a presença de crostas finas e de coloração amareladas, um pouco mais rugosas e mais difíceis de serem removidas. Crostas finas semelhantes foram observadas também no leito das feridas do presente estudo até próximo do 14º dia após indução das lesões tanto no grupo tratado como não tratado. O ressecamento da crosta observada na superfície após duas semanas de indução da lesão foi previamente mencionado.³² De acordo com os autores, que avaliaram o efeito da fenilbutazona na cicatrização de feridas cutâneas em 10 equinos que foram biopsiados com punch de 2 milímetro no hemitórax direito e esquerdo e na região lombar direita e esquerda. Na pesquisa desses autores, crostas

espessas e de coloração vermelho escuras ainda estavam facilmente removíveis até 12^o dia depois de produzidas as lesões.

A quantidade de leucócitos encontrada no PRP-PL foi de 50 a 900 células/ μ L. Apesar deste tema já ter sido discutido previamente,²¹ é interessante ressaltar estudo³³ que compararam o estímulo a liberação de citocininas (marcador de inflamação) em tecidos tratados com sangue total, PRP-RL e plasma pobre em plaquetas (PPP). A exposição ao PRP com leucócitos, segundo os autores, foi associada com uma diminuição na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Recentemente foram investigados³⁴ produtos resultantes de cultura por 96 horas de fragmentos do tendão do músculo flexor digital superficial no PRP-PL gerado a partir de sangue venoso de oito equinos. Os autores concluíram que a menor quantidade de leucócitos no PRP pode ser mais importante do que uma elevada quantidade de plaquetas, para que ocorra diminuição da expressão de moléculas pró-inflamatórias e aumento da expressão de moléculas da matriz extracelular. Portanto, a utilização do PRP-PL no presente estudo, cujas feridas não estavam contaminadas, foi uma decisão adequada.

Está bastante documentado na literatura científica a atividade quimiotóxica exercida pelas plaquetas.^{12,15,35-36} Portanto, esperava-se exatamente o que ocorreu neste estudo, ou seja, que a ferida com maior quantidade de plaquetas apresentasse maior fluxo de leucócitos. Situação compatível também com o aumento considerável de neutrófilos nas primeiras 24 horas de realização das lesões em ambos ($P>0,05$) os grupos com maior quantidade nas feridas tratadas. Conforme previamente mencionado essa observação permaneceu até o fechamento macroscópico da ferida. De acordo com Schultz et al.,⁹ os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a responderem aos mediadores solúveis liberados pelas plaquetas e a cascata de coagulação. Esse aumento de células foi seguido por uma discreta redução até uma semana, sofrendo a partir desse período, mais brusca diminuição até o fechamento macroscópico da ferida cirúrgica. Essa margem de aumento que permaneceu no grupo tratado, sem, no entanto, revelar diferença estatística, pode estar relacionado ao efeito quimiotático das plaquetas, determinante no acréscimo dos neutrófilos no grupo tratado. Entretanto, é importante que a quantidade não permaneça elevada por muito tempo, pois pode prejudicar o fechamento da ferida que, coincidentemente, foi mais lenta nas lesões tratadas. Adicionalmente, em condições fisiológicas, isso também ocorre, tendo como evidência os valores altos no grupo controle (Tabela 5).

Os macrófagos liberam várias substâncias biologicamente ativas, consideradas fundamentais no recrutamento de mais células inflamatórias para o local da lesão.^{9,30} Schwartz et al.³⁰ estudaram a cicatrização de feridas em seis equinos induzidas nas regiões metacárpicas e peitoral. De acordo com os autores, os neutrófilos que indicam inflamação aguda, foram encontrados em todas as amostras de pele uma semana depois de produzida a lesão. Por outro lado, nas amostras avaliadas com duas semanas os macrófagos estavam presentes, indicando inflamação crônica. Essas células foram o tipo celular predominante nas amostras de tecido avaliadas a partir de duas semanas até a cicatrização macroscópica da ferida no estudo desses autores. No presente estudo, valores máximos de macrófagos foram encontrados sete dias depois de induzida a lesão ($P>0.05$), tanto no grupo tratado como não tratado. Esse momento coincidiu com o máximo de desarranjo tecidual na ferida. A presença de macrófagos indica a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa durante o processo de cicatrização cutânea, e essas células exercem sua máxima atividade, que é de fagocitar a área da ferida, ingerindo bactérias, tecido desvitalizados e neutrófilos.⁹ Possuem a capacidade de secretar e sintetizar fatores de crescimento que, como consequência, estimulam a migração de fibroblastos nas feridas.^{10,37} A sua presença indica a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa durante o processo de cicatrização cutânea.⁹ Portanto, a resposta parece variar conforme o local da lesão cutânea em equinos.

A pele²³ da região glútea dos equinos apresenta infiltrado inflamatório focal na superfície da ferida, com predomínio de pleomorfismo, e moderada quantidade de eosinófilos, acompanhado de reações vasculares, 10 dias após indução da lesão cirúrgica conforme observado no presente estudo. A avaliação por imunoistoquímica, do fator VIII em tendões de equinos tratados com PRP-PL e observação de infiltrado eosinofílico nos tendões tratados com PRP,²⁴ se deve, possivelmente, ao efeito quimiotático da histamina liberada pelas plaquetas, está em conformidade com Chandra et al.,³⁸ ao estudarem pele de coelho tratada com gel de plaquetas.

Embora a análise morfométrica não tenha demonstrado diferença ($P>0,05$) para contagem de vasos sanguíneos (Tabela 6), houve maior angiogênese ($P=0,03$) na ferida tratada com PRP-PL, duas semanas após indução da lesão (Fig. 4). Os resultados histológicos foram obtidos utilizando a classificação de Lepault et al.²⁸ mediante avaliação de certa forma subjetiva, baseado em escore histológico de 0 a 3. Esses resultados demonstram o risco em se comparar diferentes técnicas para avaliar uma

característica histológica. Algumas podem ser consideradas mais fidedignas, sendo assim, a escolha primária durante a realização de um estudo controlado e padronizado. Independentemente, a redução observada posteriormente, com valores próximos ao do grupo controle é um fator positivo, pois a persistência da angiogênese é um aspecto indesejável, já que pode alterar as propriedades mecânicas da matriz extracelular mediante atividade proteolítica, retardando assim todo mecanismo fisiológico envolvido na regeneração tecidual.³⁹ Portanto, é preciso que fatores anti-angiogênicos tais como angiostatina, endostatina, trombospondina e fator derivado do epitélio pigmentar,⁹ estejam em quantidade suficiente para permitir a regulação e controle da angiogênese.

A angiogênese pode ser estimulada por fatores que atuam no microambiente da ferida, incluindo baixa tensão de oxigênio, baixo pH e elevadas quantidade de lactato.⁴⁰ Uma das principais proteínas modeladoras da angiogênese é a trombospondina.⁴¹ Por outro lado, a angiogenina atua mediante ativação de vasos endoteliais e células da musculatura lisa, acarretando processos biológicos, tais como a migração celular, invasão, proliferação e formação de estruturas tubulares.⁴² Adicionalmente, os fatores de crescimento TGF- β , VEGF, bFGF, e o do tecido conjuntivo (CTGF) são potentes sinalizadores angiogênicos para células endoteliais.^{9,43-44} O aumento no número de vasos observado no grupo tratado não pode estar associado a processos isquêmicos, pois as feridas foram cicatrizadas por segunda intenção, sendo diariamente avaliadas e limpas, apresentando macroscopicamente excelente aspecto clínico.

Os retalhos corados com HE, obtidos na pele íntegra (T0) apresentaram características de uma pele sadia, conforme previamente descrito.³⁰ A discreta organização das fibras colágenas foi mencionada por esses autores, que descreveram abundante presença de colágenos (tipo I e III) ao realizar a coloração Picrosirius Red, já na primeira semana do processo de cicatrização em amostras de pele de equinos sadios. A elevação no número dessas células ocorre de forma progressiva até a 4ª semana, que é quando os pesquisadores concluíram o estudo.

O período de início do preenchimento do leito das feridas por tecido de granulação que foi independente do grupo, foi observado já com apenas quatro dias de induzida a lesão, sendo semelhante ao mencionado,⁴⁵ que foi de cinco dias após indução de feridas com 1 cm² na pele correspondente a superfície lateral do terceiro metacarpiano. A partir de uma semana o tecido de granulação aparece com grande

número de vasos, e a cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção ocorre mais rapidamente em pôneis do que em equinos.⁴⁶

O aumento diferencial dos leucócitos e da angiogênese aos 14 dias de realizada a lesão no grupo tratado é um resultado relevante, pois os leucócitos estimulam a ação de fatores de crescimento. Adicionalmente, houve marcada diminuição no tempo final (T5), o que é um achado muito importante. Sabe-se que permanência do processo inflamatório estimula a formação de tecido de granulação exuberante.^{45,47}

Durante a fase de migração e proliferação existe grande quantidade de fibroblastos, mas os mesmos podem ser encontrados em elevada proporção durante todo o processo cicatricial.¹⁰ No presente estudo essas células tiveram um pico de expressão na semana de induzida a lesão em ambos os grupos, com subsequente decréscimo. Fibras colágenas, fibroblastos e miofibroblastos foram às características histológicas mais numerosas durante todos os tempos da análise microscópica (Tabela 6 e 7). Entretanto, isso ocorreu em ambos os grupos. Na realidade, uma vez ocorrido um ferimento, os fibroblastos são atraídos para o local do processo inflamatório e iniciam a produção de componentes da matriz extracelular,⁴⁸. Possivelmente, a esse fato se deve a considerável quantidade destas células na análise morfométrica realizada nos retalhos de pele obtidos 48 horas de produzidas as feridas.

Para que haja a contração da ferida é fundamental a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos no tecido de granulação neoformado. Quando os fibroblastos adquirem aspecto bioquímico e morfológico semelhante a fibras musculares lisas são denominados de miofibroblastos.⁴⁹ Essas células podem também podem originar dos fibrócitos, por ação de TGF- β e outras quimiocinas.⁵⁰ O seu efeito na contração da ferida, ocorre por movimento centrípeto da margem da lesão,^{47,51-52} decorrente da força de tensão gerada.⁵³ Embora a importância dos miofibroblastos, no presente estudo o aumento (16 vezes) progressivo ocorreu ambos os grupos.

Existe uma relação mútua entre as fibras colágenas e os fibroblastos. Estas últimas células se ligam à fibronectina e estimulam a produção de colágeno durante a fase de proliferação do processo de cicatrização das feridas.^{10,20,34,54} Maiores quantidades de colágenos foram observadas nos dois últimos tempos de avaliações, ou seja, com 14 dias e quando a ferida estava macroscopicamente cicatrizada (Tabela 6), independentemente do grupo. Souza et al.²⁰ também não observaram diferença entre feridas tratadas e controle no que se refere a expressão dos colágenos tipo I e III por

qRT-PCR, embora tenham observado que existe estabilização mais precoce dos colágenos nas lesões que receberam uma única aplicação de PRP.

Quando a ferida estava macroscopicamente fechada foi observado paralelismo dos fibroblastos e uma reepitelização praticamente completa, onde o novo epitélio cobria quase toda a epiderme intacta adjacente. Esse achado foi observado em ambos os grupos. Segundo Balbino et al.,⁵⁵ o processo de remodelação de uma cicatriz ocorre com sucessivas etapas, que vai desde a produção, processamento, até orientação das fibras colágenas. Inicialmente o colágeno é depositado de forma aleatória, seguindo a organização da fibronectina como forma de orientação. Esse processo depende da natureza e direção das tensões a que os tecidos são submetidos.

Apenas os fibrócitos mostraram diferença ($P=0.0014$) entre grupos favorecendo as feridas não tratadas, mas somente na avaliação realizada uma semana após indução da lesão. A menor quantidade de fibrócitos após uma semana de induzida a lesão no grupo de feridas tratadas sugere que os fibroblastos permaneceram por mais tempo após sete dias de efetuado o tratamento com PRP-PL. Como mencionado previamente essas células podem gerar os miofibroblastos, mas possuem como uma das principais funções o estímulo à formação de colágenos. Na realidade, segundo Pagnano et al.,⁵⁶ também participam na formação da atividade antigênica. Na avaliação aos 14 dias essas células já estavam bastante aumentadas, conforme no grupo controle ($P>0,05$).

A análise histomorfométrica revelou que algumas células, tais como macrófagos, eosinófilos e fibroblastos, assim como vasos sanguíneos apresentaram quantidade máxima no sétimo dia após a produção da ferida cirúrgica, com discreto declínio para níveis basais aos 37 dias. Enquanto a quantidade de fibras colágenas, fibrócitos e miofibroblastos aumentaram linearmente a partir de T3 (7dias) até T5 (37 dias). A forma de evolução dessas características ao longo do tempo, determinada por histomorfometria são compatíveis com um processo de cicatrização fisiológico.

Na atualidade a utilização e as perspectivas de uso terapêutico do PRP ou suas variáveis são desafiadoras. Recentemente Hessel et al.⁵⁷ divulgaram dados de uma pesquisa onde foram comparadas a concentração de plaquetas e dos leucócitos, assim como do TGF- β 1 e PDGF-BB em concentrados autólogos de plaquetas obtidos pelo método manual e por quatro diferentes sistemas (Angel, ACP, E-PET e GPS III) utilizados como métodos semi-automáticos. Os resultados foram bastante discrepantes, sendo mais desfavoráveis para os métodos manuais. De acordo com os autores essas

diferenças entre procedimentos de obtenção do PRP podem influenciar a bioatividade dos componentes ricos em plaquetas e, conseqüentemente, influenciar na qualidade da regeneração tecidual. Os autores também comentam na maior possibilidade de infecção no método manual, que foi o utilizado no presente estudo. Entretanto, nenhum dos sete animais da pesquisa apresentou reação inflamatória fora do esperado após a administração do PRP-PL. Comenta-se que seja possível que uma menor quantidade de leucócitos possa ser mais importante para o efeito do componente rico em plaquetas, do que a própria quantidade das mesmas. Também é conhecido que o excesso de plaqueta no PRP pode apresentar resposta inferior do que quando esse possui apenas 2,5 vezes a quantidade de plaquetas presentes no sangue total. Finalmente, é importante destacar que os métodos quantitativos e semi-quantitativo são de custo mais elevado, e na maioria das vezes se busca é um produto de fácil obtenção e baixo custo.

Os resultados obtidos no presente estudo foram decorrentes de uma pesquisa controlada e randomizada, e contribui para a permanência da incerteza com relação à eficácia do PRP-PL. Esse aspecto duvidoso sobre o efeito positivo na cicatrização de tecidos foi mencionado no ano de 2013 e 2015 por Baksh et al.⁵⁸ e Brossi et al.⁵⁹, respectivamente. Talvez resultados diferentes possam ser encontrados caso outras avaliações histomorfométricas houvessem sido realizadas após cicatrização macroscópica da ferida, pois de acordo com Bosch et al.⁶⁰, o efeito do PRP é a longo prazo. Adicionalmente, Yamauchi & Mechanic⁶¹ afirmaram que a pele continua remodelando após aparente fechamento da lesão. Nesse contexto, na opinião dos autores de este estudo, futuras pesquisas devem ser delineadas com um maior período de avaliação do processo de cicatrização cutânea, independentemente do aspecto cicatricial apresentado pela lesão.

CONCLUSÃO

O plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos, aplicado 12 horas após indução de ferida cutânea, não acelera o processo de cicatrização em equinos, porém avaliação histológica sugere que o tecido cicatricial tratado possui, aparentemente, melhor qualidade microscópica durante a fase final do processo de cicatrização clínica. Adicionalmente, vascularização é mais intensa após duas semanas de administrada a terapia, porém ocorre redução posteriormente. Por outro lado, célula inflamatória como o neutrófilo aumenta no local da ferida com 48 horas, de forma a intensificar a fase

inflamatória do processo de cicatrização cutânea, sem porém interferir no tempo final de cicatrização da lesão.

Agradecimentos.- Os autores agradecem à FAPEMIG (CVZ-APQ-0061-11), à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Rees CA. Disorders of the skin. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, eds. Equine Internal Medicine. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2003; 682-729.
2. Scott DW, Miller WH. Equine dermatology. Philadelphia, PA: Saunders, 2003; 457-458.
3. Murphy GF, Sellheyer K, Mihm MC. A pele. In: Robbins & Cotran. Patologia Bases Patológicas das Doenças. 7th edition. Cap. 25, 2005; 1283-1329.
4. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Parasitic diseases. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 7th edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co. 2013; 284-342.
5. Stashak TS, Theoret CL. Integumentary system: wound healing, management, and reconstruction. In: Orsini JA; Divers TJ. eds. Equine emergencies. 4th edition. New York: Elsevier, 2014; 238-267.
6. Paganela JC, Ribas LM, Santos CA et al. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. Rev Port Cien Vet 2009; 104: 13-18.
7. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Surgery 2007; 26: 31-37.
8. Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. Surgery 2011; 29: 475-479.
9. Schultz GS, Ladwig G, Wysocki A. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. World Wide Wounds 2006; 1-12.
10. Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. Wound Repair Regen 2011; 19: 134-148.

11. Margolis DJ, Kantor J, Santanna J et al. Effectiveness of platelet released for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 2001; 24: 483-488.
12. Lana JFSD, Santana MHA, Belangero WD et al. Platelet-rich plasma. New York: Springer Heidelberg, 2014. 360p.
13. Engebretsen L, Steffen K, Alonso JM et al. Sports injuries and illnesses during the Winter Olympic Games. *Br J Sports Med* 2010; 44: 772-780.
14. Mei-Dan O, Mann G, Maffulli, N. Platelet-rich plasma: any substance into it? *Br J Sports Med* 2010; 44: 618-619.
15. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA et al. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 2012; 28: 429-439.
16. Fantini P. Plasma rico em plaquetas: padronização em equídeos, criopreservação e efeito terapêutico na desmíte do ligamento supraespinhoso de equinos. 2014. 80f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
17. Carter CA, Jolly DG, Worden CE et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 244-255.
18. Maciel FB, DeRossi R, Módolo TJC et al. Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. *Burns* 2012; 38: 1058-1065.
19. Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res* 2009; 70: 277-282.
20. Souza MV, Pinto JO, Costa MBM et al. Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesq Vet Bras* 2014; 34: 233-240.
21. Souza MV, Pinto JO, Costa MBM et al. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesq Vet Bras* 2014; 34: 599-612.
22. Souza MV, Silva MB, Pinto JO et al. Immunohistochemical expression of collagens in the skin of horses treated with leukocyte-poor platelet-rich plasma. *BioMed Res Int*, p.1-2, 2015. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/aa/893485/>. Accessed jun 16, 2015.

23. Ferreira JC, Souza MV, Vilória MIV et al. Efeitos da monofenilbutazona na cicatrização por segunda intenção em equinos. *Rev Ceres* 2007; 54: 263-270.
24. Zandim BM, Souza MV, Frassy L M et al. Immunohistochemistry of fator VIII, histology and morphometry in equine tendon treated with platelet-rich plasma. *Rev Bras Med Vet* 2013; 35: 169-184.
25. Rees HM, Ecker EE. An improved method for counting blood platelets. *J Am Med Assoc* 1923; 80: 621-622.
26. Thrall, M.A. Diagnóstico dos distúrbios hemorrágicos, p.170-187. In: *Ibid.* (Ed.), *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Roca, São Paulo. 2007; 170-187.
27. Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York: Churchill Livingstone, 1996; 99-138.
28. Lepault E, Céleste C, Doré M et al. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 520-529.
29. Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato JR. QUANT - A software for plant disease severity assessment. In: *International Congress of Plant Pathology*. Christchurch, USA: 2003; 8: 54-55.
30. Schwartz AJ, Wilson DA, Keegan KG et al. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1564-1570.
31. Ribeiro SN, Atallah FA, Taffarel MO et al. Plasma rico em plaquetas com curativo em queimaduras de espessura total em coelhos. *Rev Bras Med Vet* 2013; 35: 79-83.
32. Hussni CA, Groh TM, Alves AL et al. Efeitos da fenilbutazona na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em equinos. *Braz J Vet Res An Sci* 2010; 47: 262-267.
33. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007; 78: 661-669.
34. Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed OH et al. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med* 2014; 42: 42-49.

35. Anitua E, Andia I, Ardanza B et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
36. Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop* 2012; 22: 33-42.
37. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol rev* 2003; 83: 835-870.
38. Chandra RK, Handorf C, West M et al. Histologic effects of autologous platelet gel in skin flap healing. *Arch Facial Plast Surg* 2007; 9: 260-263.
39. Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R et al. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med & Sci Sports* 2005; 15: 211-222.
40. Bhushan M, Young HS, Brenchley PE et al. Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol* 2002; 147: 418-425.
41. Bornstein, P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling* 2009; 3: 189-200.
42. Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2008; 40: 619-624.
43. Maia L, Souza MV. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteo-articulares em animais. *Ciencia Rural* 2009; 39: 1279-1286.
44. Carmona JU, López C, Giraldo CE. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Arch Med Vet* 2011; 43: 1-10.
45. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN et al. Preliminary observations on expression of transforming growth factors β 1 and β 3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 2002; 31: 266-773.
46. Wilmink JM; van Weeren PR, Stolk PWT et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999; 31: 61-67.
47. Wilmink JM, van Weeren PR. Differences in wound healing between horses and ponies: application of research results to the clinical approach of equine wounds. *Clin Tech Equine Practice* 2004; 3: 123-133.

48. Santos JB, Porto SG, Suzuki LM et al. Avaliação e tratamento de feridas orientação aos profissionais de saúde. Hospital de Clínicas Porto Alegre RS, 2011. Available at: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/34755/000790228.pdf?sequence=1>. Accessed Feb 02, 2015.
49. Desmoulière A, Gabbiani G. The role of myfibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. In: Clark RAF, ed. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press. 1996; 391-423.
50. Bucala R. Fibrocytes and fibrosis. Q J MED 2012; 105:505-508.
51. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. Lab invest 1990; 63: 21-29.
52. Clark RAF. Biology of dermal repair. Dermatol Clinics 1993; 11: 647-66
53. Silver, A. Basic physiology of wound healing in the horse. Equine Vet J 1982; 14: 7-15.
54. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. J Orthop Surg Res 2005; 23: 84-92.
55. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Rev Bras Cien Farm 2005; 41: 27-51.
56. Pagnano LO, Baraldi-Artoni SM, Pacheco MR et al. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. Ciencia Rural 2008; 38: 1662-1666.
57. Hessel LN, Bosch G, van Weeren PR et al. Equine autologous platelet concentrates: a comparative study between different available systems. Equine Vet J 2014; 47: 319-325.
58. Baksh N, Hannon CP, Murawski CD et al. Platelet-rich plasma in tendon models: a systematic review of basic science literature. Arthroscopy 2013; 29: 596-607.
59. Brossi PM, Moreira JJ, Machado TS et al. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. BMC Vet Res 2015; 11: 98-148.

60. Bosch G, Moleman M, Barneveld A et al. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports* 2011; 21: 554-561.
61. Yamauchi M, Mechanic GL. Cross-linking of collagen. In: Nimni ME. (Ed.), *Collagen*. CRC Press, Florida.1988; 35-92.

8. CONCLUSÃO GERAL

Mediante todas as observações anotadas e testadas neste estudo, pode-se concluir que a administração local de plasmar rico em plaquetas e pobre em leucócitos no volume administrado neste estudo, sem utilização de agentes ativadores farmacológicos, injetado 12 horas após indução cirúrgica de ferida cutânea na região glútea de equinos:

- 1- Não altera o tempo de fechamento macroscópico da ferida.
- 2- Ocasiona importante aumento da expressão gênica dos colágenos tipos I e III.
- 3- Não aumenta a concentração local de TGF- β 1 e PDGF-BB, durante diferentes fases do processo de cicatrização.
- 4- Não altera a concentração no plasma sanguíneo dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB, 1, 2, 7, 14 e 37 dias após administração.
- 5- Resulta, durante as fases de migração e proliferação, assim como a de contração e remodelação, em maiores quantidades dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB, quando comparadas com as fases de hemostasia e inflamatória.
- 6- Aumenta a infiltração de neutrófilos na fase inflamatória.
- 7- Acarreta elevação da angiogênese duas semanas após tratamento, sem interferência microscópica na fase final do processo cicatricial.
- 8- Promove, percentualmente, cicatrização de melhor qualidade, no momento em que as feridas se encontram macroscopicamente fechadas.