

BRUNA MOTA ZANDIM

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE
TENDINOPATIA EM EQUINOS: ULTRAESTRUTURA
PLAQUETÁRIA, HISTOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA
TENDÍNEA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Z27p
2011

Zandim, Bruna Mota, 1986-
Plasma rico em plaquetas no tratamento de
tendinopatia em equinos: ultraestrutura plaquetária,
histologia e imunistoquímica tendínea / Bruna Mota
Zandim. – Viçosa, MG, 2011.
xi, 74f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Verônica de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Equino - Doenças - Tratamento. 2. Equino - Tendões
flexores - Lesões - Tratamento. 3. Plaquetas (Sangue)
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

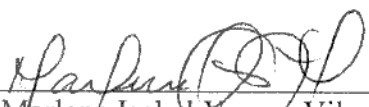
CDD 22. ed. 636.10896

BRUNA MOTA ZANDIM

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINOPATIA
EM EQUINOS: ULTRAESTRUTURA PLAQUETÁRIA, HISTOLOGIA E
IMUNOISTOQUÍMICA TENDÍNEA**

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

APROVADA: 25 de fevereiro de 2011.




Prof. Marlene Isabel Vargas Viloria
(Co-orientadora)



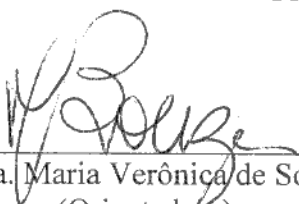
Prof. José Ivo Ribeiro Júnior



Prof. José Dantas Ribeiro Filho



Prof. Cláudio César Fonseca



Prof. Maria Verônica de Souza
(Orientadora)

À minha família, especialmente meus pais e minhas irmãs, pelo apoio incondicional, incentivo, confiança e amor, em mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por trilhar meus caminhos e iluminar minhas decisões.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de ampliar conhecimentos.

À minha orientadora, professora Maria Verônica de Souza, pela paciência, atenção, empenho e ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em especial o Professor Laércio dos Anjos Benjamin, que contribuíram para minha formação acadêmico-profissional e me auxiliaram, direta ou indiretamente, durante a realização da pesquisa.

Aos companheiros da Pós-graduação Fabrício Luciani Valente, Gabriel Andrés Tafur Gomes e Leandro Maia, que me ajudaram durante a realização desse experimento.

Aos bolsistas, Pablo Costa Magalhães e Luiza Neme Frassy, e às estagiárias, Mariana Silva Duarte, Ana Carolina Perez Acuaviva Cotellessa e Érica Fidelis dos Santos, pela ajuda durante as atividades relacionadas com o experimento.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, especialmente José de Oliveira Pinto, Aécio Carlos de Oliveira e José Célio de Oliveira; do Núcleo de Microscopia e Microanálise, Karla Veloso Gonçalves Ribeiro e Cláudia Alencar Vanetti; do Laboratório de Controle e Biologia de Hematozoários e Vetores do Bioagro da Universidade Federal de Viçosa, e do Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela colaboração durante a realização do experimento.

Aos amigos Luciana Louzada Prates e Homero Leite Martins, pelo carinho, disponibilidade e paciência.

Aos companheiros Rodrigo, Karina, Maria Clara, Nazaré, Jéssica e Pedro, pelo carinho e acolhida.

Ao Dr. José do Carmo, pelos ensinamentos e disponibilização do laboratório Prevent para a realização dos procedimentos histológicos.

Ao Professor Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo pela disponibilização do laboratório Controle e Biologia de Hematozoários e Vetores do Bioagro.

A Capes, pela concessão de bolsa de mestrado, e a Fapemig pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A Ouro Fino Saúde Animal Ltda, pela colaboração com a realização da pesquisa, pelo fornecimento do anti-inflamatório não-esteroidal.

Sem a ajuda de vocês eu não conseguiria chegar até aqui! Muito obrigada a todos!

BIOGRAFIA

BRUNA MOTA ZANDIM, filha de Luiz Henrique Zandim e Angelica Mota Zandim, nasceu em 30 de abril de 1986, em Vitória, ES.

Em dezembro de 2003 formou-se no Curso Técnico em Administração - Área de Gestão, pela Escola Técnica de Formação Gerencial SEBRAE Minas/Teófilo Otoni, MG.

Em julho de 2009 graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Em agosto de 2009 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, concentrando seus estudos na Área de Clínica Médica e Cirurgia de Equídeos, incluída na linha de pesquisa intitulada Biotecnologia, Diagnóstico e Controle de Doenças dos Animais.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I	1
Ativação de plaquetas: ultraestrutura e morfometria no plasma rico em plaquetas de equinos.....	1
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução	2
Métodos.....	4
Seleção e manejo dos animais.....	4
Protocolo laboratorial para obtenção e ativação do PRP	5
Microscopia eletrônica de transmissão das plaquetas presentes no PRP.....	7
Análise Estatística	9
Resultados.....	10
Discussão.....	13
Conclusão.....	18
Agradecimentos.....	19
Referências	19
CAPÍTULO II.....	26
Imunoistoquímica de TIMP-1 e TGF-β1, histologia e morfometria de tendão de equino tratado com plasma rico em plaquetas	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
1. Introdução	27
2. Material e métodos.....	30

2.1. Seleção e manejo dos animais.....	30
2.2. Indução da tendinopatia	31
2.3. Protocolo laboratorial para obtenção do PRP.....	32
2.4. Tratamento	33
2.5. Avaliação clínica e ultrassonográfica.....	34
2.6. Biópsia.....	34
2.7. Histologia	36
2.8. Imunoistoquímica	39
2.9. Análise Estatística	40
3. Resultados.....	41
3.1. Plasma rico em plaquetas	41
3.2. Avaliação clínica e ultrassonográfica.....	41
3.3. Biópsia.....	44
3.4. Histologia	45
3.5. Imunoistoquímica	48
4. Discussão e conclusão	49
Agradecimentos.....	60
Referências	60
Apêndice 1	69
Apêndice 2	70
Apêndice 3	71
Apêndice 4	72
Apêndice 5	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ATL	Área transversal da lesão
ATT	Área transversal do tendão
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CP	Concentrado de plaquetas
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGG	Éter gliceril guaiacolato
HE	Hematoxilina-eosina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
MMP	Metaloproteinase
NaCl	Cloreto de sódio
OCS	Sistema canalicular aberto
PDGF	Fator de crescimento derivado da plaqueta
PBS	Tampão fosfato-salina
PPT	Proteínas plasmáticas totais
PRP	Plasma rico em plaquetas
TFDP	Tendão do músculo flexor digital profundo
TFDS	Tendão do músculo flexor digital superficial
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

ZANDIM, Bruna Mota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinopatia em equinos: ultraestrutura plaquetária, histologia e imunoistoquímica tendínea.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-Orientadoras: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Andrea Pacheco Batista Borges.

A pesquisa foi desenvolvida na forma de dois subprojetos: o primeiro foi intitulado “Ativação de plaquetas: ultraestrutura e morfometria no plasma rico em plaquetas de equinos”, e o segundo subprojeto, “Imunoistoquímica de TIMP-1 e TGF- β 1, histologia e morfometria em tendão de equino tratado com plasma rico em plaquetas”. O objetivo do primeiro subprojeto foi investigar a capacidade de ativação do plasma rico em plaquetas (PRP) por substâncias farmacológicas, assim como verificar a necessidade ou não dessa ativação para uso terapêutico. O PRP foi obtido de quatro equinos mestiços hígidos, machos castrados, com 13 a 16 anos (15 ± 1 anos) de idade, e processado para classificação e quantificação da morfologia plaquetária, mediante a utilização da microscopia eletrônica de transmissão. Todas as amostras de PRP foram ativadas com cloreto de cálcio (CaCl_2) a 10%, trombina bovina pura ou associada a CaCl_2 . O controle (PRP puro) não foi ativado farmacologicamente. Nas amostras de PRP puro, 49% das plaquetas foram classificadas como ativação incerta, 41% em descanso, 9% totalmente ativada e 1% com dano irreversível. O tratamento com CaCl_2 a 10% proporcionou uma distribuição de 54% de plaquetas com ativação incerta, 24% totalmente ativada, 20% em descanso, e 2% como com dano irreversível. Amostras tratadas com trombina bovina pura ou associada com CaCl_2 apresentaram morfologia plaquetária que não se enquadraram na classificação adotada, apresentando forma irregular com emissão de grandes pseudópodes filamentosos, aspecto de lise celular e grânulos inteiros no citoplasma remanescente e meio extracelular. Houve efeito do tratamento sobre a morfologia plaquetária ($P=0,03$). O CaCl_2 a 10% é um adequado agente ativador de plaquetas. Entretanto, nos casos onde se faz necessário o uso de PRP na forma mais líquida, recomenda-se o uso do PRP puro, que além de apresentar uma adequada porcentagem de plaquetas totalmente ativadas, também possui importante quantidade do tipo em descanso, que pode ser ativado por substâncias presentes no tecido lesionado. O segundo subprojeto teve como objetivo verificar o efeito terapêutico do PRP no tratamento da tendinopatia do tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS), mediante a realização de estudos histológico e imunoistoquímico (TIMP-1 e TGF- β 1), nas fases inflamatória e de proliferação do processo de reparação. Tendinopatia do TFDS de

ambos os membros torácicos foi induzida em seis equinos mestiços hípidos, machos castrados e com idade entre 5 e 16 anos ($13 \pm 4,05$ anos), mediante administração intratendínea de 2.090 unidades de digestão tecidual de colagenase. Após cinco dias, um dos membros de cada animal foi tratado com 1,8 mL de PRP puro e o outro com NaCl a 0,9%. Biópsia para obtenção de amostra para exames histológico e imunoistoquímico foi realizada três (fase inflamatória) ou dezesseis (fase de proliferação) dias após realização dos tratamentos. O processamento das amostras para histologia seguiu os métodos rotineiros, e os cortes foram corados com hematoxilina-eosina, Picrosirius Red e tricrômico de Masson para avaliação de características morfológicas e organização tecidual, além de realização da morfometria. Para a imunoistoquímica foi adotado o método da peroxidase indireta, utilizando anticorpos primários anti-TIMP-1 e anti-TGF- β 1, sendo verificada a presença ou ausência de marcação citoplasmática. Em ambas as fases, independentemente do tratamento, a área da lesão estava preenchida por tecido de granulação contendo fibras colágenas esparsas com perda do paralelismo, fibroblastos com morfologia variada e endotendão hipertrofiado, sendo essas características mais acentuadas na fase de proliferação. Os infiltrados inflamatórios predominantes foram do tipo misto. Ainda que o tendão tratado com PRP tenha apresentado melhor orientação das fibras colágenas, histologicamente não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos. A marcação do TFDS foi negativa para TGF- β 1, e positiva para TIMP-1 em alguns membros, sem diferença ($P > 0,05$) entre tratamentos e fases do reparo. Uma única aplicação intralesional de PRP puro, cinco dias após a indução de tendinopatia, não influencia o processo de reparação, nem a presença de TIMP-1 e TGF- β 1 nos fibroblastos nas fases inflamatória e de proliferação do processo de reparação.

ABSTRACT

ZANDIM, Bruna Mota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Platelet-rich plasma in the treatment of tendinopathy in horses: platelet ultrastructure, histology and immunohistochemical analyses of tendon.** Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Andrea Pacheco Batista Borges.

The research was conducted in two different subprojects: the first was entitled “Platelet activation: ultrastructure and morphometry in the platelet-rich plasma of horses”, and the second “Immunohistochemistry of TIMP-1 and TGF- β 1, histology and morphometry in equine tendon treated with platelet-rich plasma”. The aim of the first study was to investigate the capability of activating the platelet-rich plasma (PRP) by pharmacological substances, as well as the need of this activation for the therapeutic uses. The PRP was obtained from four healthy, crossbred gelding, aged 13 to 16 years (15 ± 1 year), and processed for observation and quantification of the platelets morphology by using of transmission electron microscopy. All PRP samples were activated with 10% calcium chloride (CaCl_2) solution, bovine thrombin, and bovine thrombin associated with CaCl_2 . The control (pure PRP) was not activated pharmacologically. In PRP pure samples, 49% of the platelets were classified as state of activation uncertain, 41% as resting, 9% as fully activated, and 1% as irreversibly damaged. The 10% CaCl_2 solution treatment provided a distribution of 54% as state of activation uncertain, 24% as fully activated, 20% as resting, and 2% as irreversibly damaged. Samples treated with bovine thrombin alone or associated with CaCl_2 showed platelet morphology that did not fit in the classification adopted, revealing irregular shape with large filamentous pseudopodia emission, cell lysis aspect, and whole granules remaining in the cytoplasm remaining, and extracellular environment. There was an effect of treatment on platelet morphology ($P=0.03$). The CaCl_2 10% is an appropriate platelet activator agent. However, in cases where it is necessary the use of PRP in a more liquid form, it is recommended the use of pure PRP, which besides presenting an adequate percentage of fully activated platelets, also has significant amount of the resting type, which can be activated by substances present in the injured tissue. The aim of the second subproject was to investigate the therapeutic effect of PRP in the treatment of superficial digital flexor (SDF) tendinopathy, through histological and immunohistochemical (TIMP-1 and TGF- β 1) studies, in inflammatory and proliferative phases of healing. SDF tendinopathy of both forelimbs was induced in healthy, crossbred gelding, by intratendinous administration of 2.090 units of collagenase tissue digestion.

After five days, one forelimb of each animal was intralesional treated with 1.8 mL of pure PRP, and the other limb with 0.9% NaCl solution. Biopsy to obtain samples for histologic and immunohistochemical studies was performed three (inflammatory phase) or sixteen (proliferative phase) days after treatments. The samples were processed following the histologic routine method, and sections were stained with hematoxylin-eosin, Picrosirius Red, and Masson's trichrome, for evaluation of morphological characteristics and tissue organization, besides performing morphometry. For immunohistochemistry evaluation, indirect peroxidase technique was adopted, by using of the primary antibodies anti-TIMP-1 and anti-TGF- β 1, being the presence or absence of cytoplasmic staining verified. In both phases, regardless the treatments, the injured area was filled by a granulation tissue containing sparse collagen fibers with loss of parallelism, fibroblasts with variable morphology, and endotenon hypertrophy, being these characteristics more pronounced in the proliferation phase. Mixed inflammatory cell infiltrate was predominant. Although the PRP treated tendon presented a better orientation of collagen fibers, no differences ($P>0.05$) were detected between groups in histologic variables. The SDF tendon was immunonegative stained for TGF- β 1, and immunopositive stained for TIMP-1 in some samples, but no difference ($P>0.05$) was detected between treatments and stages of tendon repair. A single intralesional application of pure PRP, five days after the induction of tendinopathy, does not influence the healing process, nor the presence of TIMP-1 and TGF- β 1 in fibroblasts in both inflammatory and proliferation phases of the repair process.

CAPÍTULO I

Ativação de plaquetas: ultraestrutura e morfometria no plasma rico em plaquetas de equinos

Redigido conforme as normas do periódico Platelets

(Ainda serão realizadas algumas modificações para atender as normas)

ZANDIM, Bruna Mota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinopatia em equinos: ultraestrutura plaquetária, histologia e imunistoquímica tendínea.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-Orientadoras: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Andrea Pacheco Batista Borges.

Resumo

O objetivo desse estudo foi investigar a capacidade de ativação do plasma rico em plaquetas (PRP) por substâncias farmacológicas, assim como verificar a necessidade ou não dessa ativação para uso terapêutico. O PRP foi obtido de quatro equinos mestiços hígdidos, machos castrados, com 13 a 16 anos (15 ± 1 anos) de idade, e processado para observação e quantificação da morfologia plaquetária mediante a utilização da microscopia eletrônica de transmissão. Todas as amostras de PRP foram ativadas com cloreto de cálcio (CaCl_2) a 10%, trombina bovina pura ou associada a CaCl_2 . O controle (PRP puro) não foi ativado farmacologicamente. Nas amostras de PRP puro, 49% das plaquetas foram classificadas como ativação incerta, 41% em repouso, 9% totalmente ativada e 1% com dano irreversível. O tratamento com CaCl_2 a 10% proporcionou uma distribuição de 54% de plaquetas com ativação incerta, 24% totalmente ativada, 20% em repouso, e 2% como com dano irreversível. Amostras tratadas com trombina bovina apresentaram morfologia plaquetária que não se enquadraram na classificação adotada, apresentando forma irregular com emissão de grandes pseudópodes filamentosos, aspecto de rompimento e grânulos inteiros no citoplasma remanescente e meio extracelular. Houve efeito do tratamento sobre a morfologia plaquetária ($P=0,03$). O CaCl_2 a 10% é um adequado agente ativador de plaquetas. Entretanto, nos casos onde se faz necessário o uso de PRP na forma mais líquida, recomenda-se o uso do PRP puro, que além de apresentar uma adequada porcentagem de plaquetas totalmente ativadas, também possui importante quantidade do tipo em repouso, que pode ser ativado por substâncias presentes no tecido lesionado.

Palavras chave-Cavalos; Componentes ricos em plaquetas; Função plaquetária; Fatores de crescimento; Microscopia eletrônica; Quantificação morfométrica.

Platelet activation: ultrastructure and morphometry in the platelet-rich plasma of horses

ZANDIM, Bruna Mota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Platelet-rich plasma in the treatment of tendinopathy in horses: platelet ultrastructure, histology and immunohistochemical analyses of tendon.** Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Marlene Isabel Vargas Vitoria and Andrea Pacheco Batista Borges.

Abstract

The aim of this study was to investigate the capability of activating the platelet-rich plasma (PRP) by pharmacological substances, as well as the need of this activation for the therapeutic uses. The PRP was obtained from four healthy, crossbred, gelding horses, aged 13 to 16 years, and processed for observation and quantification of the platelets morphology by using of transmission electron microscopy. All PRP samples were activated with 10% calcium chloride (CaCl₂) solution, bovine thrombin, and bovine thrombin associated with CaCl₂. The control (pure PRP) was not activated pharmacologically. In PRP pure samples, 49% of the platelets were classified as state of activation uncertain, 41% as resting, 9% as fully activated, and 1% as irreversibly damaged. The 10% CaCl₂ solution treatment provided a distribution of 54% as state of activation uncertain, 24% as fully activated, 20% as resting, and 2% as irreversibly damaged. The bovine thrombin treated samples showed platelet morphology that did not fit in the classification adopted, revealing irregular shape with large filamentous pseudopodia emission, cell lysis aspect, and whole granules remaining in the cytoplasm remaining, and extracellular environment. There was an effect of treatment on platelet morphology (P=0.03). The CaCl₂ 10% is an appropriate platelet activator agent. However, in cases where it is necessary the use of PRP in a more liquid form, it is recommended the use of pure PRP, which besides presenting an adequate percentage of fully activated platelets, also has significant amount of the resting type, which can be activated by substances present in the injured tissue.

Keyword: equine, components rich in platelets, platelet function, growth factors, transmission electron microscopy.

Introdução

O plasma rico em plaquetas (PRP) e o concentrado de plaquetas (CP, composição sólida de plaquetas sem plasma), utilizados em estudos in vitro e in vivo, constituem uma

linha de pesquisa ainda em desenvolvimento e, por isso, são pouco utilizados por clínicos que trabalham com a espécie equina. As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados [1-3], derivados de megacariócitos, com aproximadamente 1 a 3 μm de diâmetro [1,2,4,5], e com papel fundamental na hemóstase [3-5]. Normalmente, circulam na forma em repouso [5], que apresenta aparência discóide [3,5] devido à estrutura do citoesqueleto formado por microtúbulos e microfilamentos de actina e miosina [5,6], e com citoplasma contendo, mitocôndrias, sistema tubular denso, sistema canalicular aberto (OCS), partículas de glicogênio, lisossomos, peroxissomos, assim como os grânulos de armazenamento específicos (α -grânulos e grânulos densos) [1-4,6,7]. Na microscopia eletrônica de transmissão, os α -grânulos aparecem como corpos ovais a esféricos revestidos por membrana com o interior mais eletrôn-denso, sendo menos eletrôn-densos (mais escuros) que os grânulos densos [8]. As plaquetas são revestidas por membrana constituída por bicamada fosfolipídica, polissacarídeos e glicoproteínas [6], cujo arranjo estrutural permite que esse corpúsculo responda rapidamente a estímulos e mudanças no ambiente [8-11].

As plaquetas podem ser ativadas por substâncias farmacológicas ou fisiológicas. Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfológicamente, passando da forma discóide para arredondada, e desenvolvem pseudópodes que se espalham pelo tecido lesionado, fenômeno chamado de agregação plaquetária [5]. Adicionalmente, ocorre a desgranulação dos seus grânulos [5,6,12]. Após estimulação agonista, os α -grânulos plaquetários liberam proteínas, como por exemplo, fibrinogênio, trombospondina e fatores de crescimento transformante beta (TGF- β), epidermal (EGF), derivado da plaqueta (PDGF) e semelhante à insulina (IGF) [5,6], por pelo menos dois mecanismos: via fusão com o OCS e conseqüente extrusão de seus conteúdos através de pequenos canais presentes na membrana plasmática [13-16], ou por exocitose, ou seja, por fusão direta dos α -grânulos com a membrana plasmática [17]. O OCS é constituído por túneis interligados que percorrem o citoplasma e se conectam com a membrana plasmática, reduzindo a distância entre o centro da plaqueta e o meio externo [14].

A liberação de proteínas dos α -grânulos no local da lesão promove o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas [4], iniciando o processo inflamatório, além de promover a angiogênese, que resulta na neovascularização e formação de um novo tecido conjuntivo necessário à cicatrização [3,5].

O PRP tem demonstrado ser uma terapia promissora para diversas afecções em animais e seres humanos, uma vez que é fonte autógena e econômica de fatores de

crescimento [18], atóxica e não imunorreativa [2,19], obtida pelo sequestro e concentração de plaquetas por um gradiente de densidade mediante centrifugação [20]. É comumente utilizado na forma ativada após a adição de agentes ativadores, como ADP [21], trombina [22-25], trombolastina [26], colágeno [27-29], cloreto de cálcio [30-39], gluconato de cálcio [40] ou a associação de dois deles, como por exemplo, a trombina bovina e o cloreto de cálcio [29,41-44], além de tromboxano, fator ativador de plaqueta, serotonina, epinefrina e análogos de endoperóxido cíclico [3,5,11]. Entretanto, acredita-se que o PRP libere fatores de crescimento sem requerer indução exógena da ativação das plaquetas [45], sendo já utilizado em algumas pesquisas sem prévia ativação, para o tratamento de afecções osteomusculares e em tendões e ligamentos de equinos [45-49] e outras espécies [39,50,51].

Nesse contexto, a falta de um estudo comparativo entre os agentes ativadores mais utilizados indicou a necessidade da realização do presente experimento, cujo objetivo foi avaliar a capacidade de ativação do PRP com cloreto de cálcio (CaCl_2) a 10%, trombina bovina ou associação de ambos, e verificar a necessidade de ativação ou não do PRP para uso terapêutico. A hipótese formulada acerca da metodologia proposta é de que a utilização em separado ou associada desses agentes ativadores promove importante ativação plaquetária, o que é fundamental para a liberação de fatores de crescimento.

Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) sob protocolo número 34/2009. 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.

Seleção e manejo dos animais

Foram utilizados quatro equinos mestiços hípidos, machos, castrados, com idade entre 13 e 16 anos (15 ± 1 anos) e peso entre 270 e 297 kg. Durante o processo de seleção, objetivando assegurar higidez, todos os animais foram submetidos a exame físico geral (frequências cardíaca e respiratória, tempo de enchimento capilar, temperatura corporal, coloração das mucosas, hidratação e motilidade intestinal), e laboratorial [hemograma completo e determinação do fibrinogênio e das proteínas plasmáticas totais (PPT)].

Trinta dias antes da obtenção do PRP, os animais foram colocados em baias individuais de 20 m² e alimentados com feno de tifton 85 (*Cynodon nlemfuensis*), capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado e ração (Total Alimentos S/A, Três Corações, Minas Gerais, Brasil). Sal mineral (Nutrihorse plus, Nutriplan, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) e água foram deixados ad libitum.

Duas semanas antes da obtenção do PRP, os animais foram pesados, banhados com carrapaticida (Ultimate, Pffizer Saúde Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e vermifugados por via oral com moxidectina (Equest, Fort Dodge, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) na dose única de 0,2 mg/kg via oral, para a eliminação de endo e ectoparasitas. Nesse mesmo período, foram novamente realizados hemograma completo e determinação da concentração da PPT e do fibrinogênio.

Protocolo laboratorial para obtenção e ativação do PRP

Baseado no método descrito por Argüelles et al. [31], algumas modificações foram realizadas para a obtenção do PRP. Para esse propósito, foram coletados 81 mL de sangue de cada animal pela punção da veia jugular externa em 18 tubos vacutainer (0,5 mL de anticoagulante e 4,5 mL de sangue total) com 3,8% de citrato de sódio (0,199 mol/L) (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). Adicionalmente, outros 4,5 mL de sangue total foram obtidos em tubo contendo EDTA (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) para contagem sanguínea de plaquetas, que foi realizada automaticamente (HumaCount plus, Human do Brasil, Recife, Pernambuco, Brasil).

As amostras de sangue obtidas com citrato de sódio foram homogeneizadas e centrifugadas a 120 g por cinco minutos. De cada tubo centrifugado foi descartado 50% da coluna sobrenadante (Figura 1A), com o propósito de se usar plasma com uma concentração de plaquetas maior na segunda centrifugação.

Do plasma restante nos 18 tubos, foram pipetados 1,1 mL próximo à camada leucocitária, perfazendo um total de 20 mL, que foram acondicionados em dois tubos estéreis de polipropileno sem anticoagulante (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) com capacidade para 10 mL. Em seguida, foi realizada nova centrifugação a 240 g por cinco minutos. Após esta segunda centrifugação, o plasma se apresentou dividido em duas frações: o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) e a fração remanescente, denominada plasma rico em plaquetas. Finalmente, um volume de aproximadamente 75% do plasma obtido de cada tubo foi descartado (Figura 1B), e um

total de 5 mL do PRP foi acondicionado em um novo tubo estéril sem anticoagulante. Uma fração de 10 μ L foi utilizada para contagem manual de plaquetas (método de Rees e Ecker [52]), pois a contagem automática seria prejudicada, ou até mesmo impossibilitada, devido à existência de agrupamentos plaquetários no PRP.

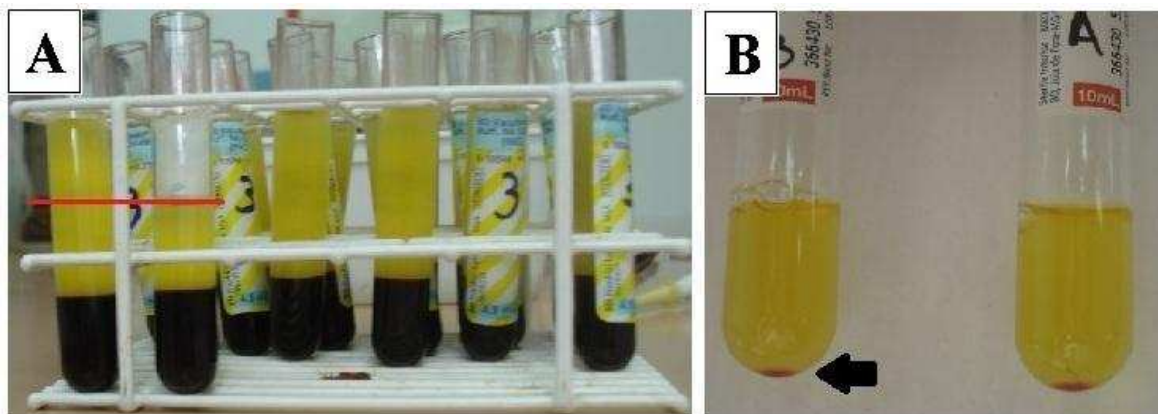


Figura 1-Amostras de sangue acondicionadas em tubos com citrato de sódio a 3,8% após centrifugação a 120 g por cinco minutos, e eliminação de 50% do plasma sobrenadante, demonstrada pela linha vermelha (A). Depois da segunda centrifugação, foram eliminados 75% da coluna de plasma, com destaque para o botão de plaquetas (seta) (B).

Para a ativação, alíquotas de 0,9 mL do PRP foram pipetadas em quatro novos tubos estéreis. A ativação foi realizada mediante a adição de 50 μ L de CaCl_2 (Cloreto de cálcio 11,1%, 1 M, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 10% [32], 50 μ L (20 UI) de trombina bovina (Bovine thrombin lyophilized powder, 59 NIG units/mg, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) diluída em água Milli-Q, conforme realizado por Aspenberg e Virchenko [22] e Waselau et al. [25], ou 50 μ L de trombina bovina (20 UI) diluída em CaCl_2 a 10%. No tubo remanescente, o PRP não foi ativado, mas recebeu 50 μ L de água Milli-Q e foi considerado como controle (Figura 2A).

Os tubos contendo o PRP com as substâncias ativadoras, assim como o puro (sem ativação), foram acondicionados em estufa entre 20 a 22°C por duas horas, com a finalidade de favorecer a desgranulação plaquetária (Figura 2B) [31,37,38,53].

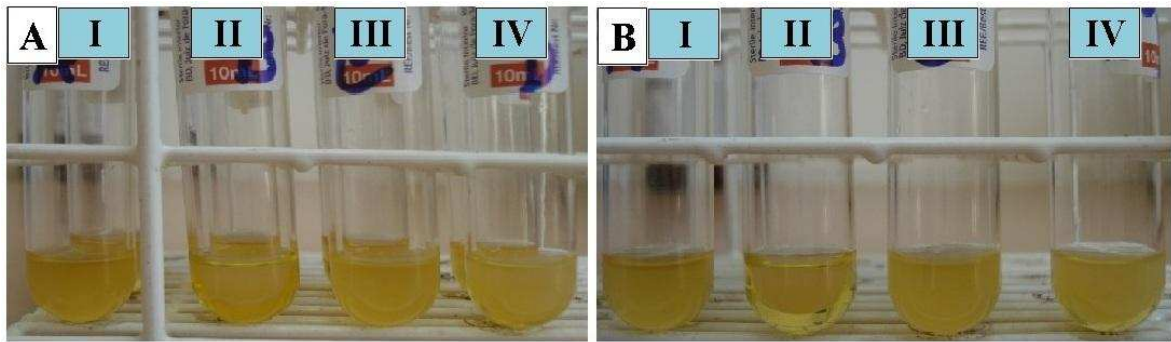


Figura 2-PRP não ativado (I) e ativado com trombina bovina (II), CaCl_2 a 10% (III) e trombina associada a CaCl_2 a 10% (IV) (A). Aparência coagulada das amostras com trombina bovina após permanecerem duas horas na estufa entre 20 e 22°C (B).

Microscopia eletrônica de transmissão das plaquetas presentes no PRP

A ultraestrutura plaquetária foi avaliada nas alíquotas de PRP puro e ativadas com CaCl_2 a 10%, trombina e trombina associada ao CaCl_2 a 10%, mediante a utilização de microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito por Paes Leme et al. [54], com modificações. Para isso, cada tubo contendo 0,95 mL de PRP recebeu 0,1 mL de glutaraldeído (Glutaraldehyde EM grade 25%, Koch Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 10%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 520 g por 20 minutos, resultando em um conteúdo de aspecto gelatinoso (Figura 3A). A amostra de cada tubo foi removida e seccionada em fragmentos com volume aproximado de 1 mm³, que foram acondicionados em eppendorfs e fixados em solução de Karnovsky 0,1 M modificada [glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 2,5% e tampão fosfato (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 0,1 M com pH 7,4] por seis horas a 4°C.

Após três lavagens sucessivas com tampão fosfato 0,1 M por dez minutos cada, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio (Osmium tetroxide crystal 1 g, Koch Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 1%, em solução a 0,1 M por uma hora à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar. Após três lavagens sucessivas as amostras foram pré-contrastadas com acetato de uranila (Uranyl acetate 25 g, Koch Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 0,5% (Figura 3B) durante doze horas, a 4°C.

Posteriormente, as amostras foram lavadas por três vezes com tampão fosfato 0,1 M, sendo então iniciado o processo de desidratação em diluições sequenciais de acetona (Acetona PA, ACS F. Maia Indústria e Comércio Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil). Em

seguida as amostras foram infiltradas em mistura de acetona com resina Epoxy (Epoxy Embedding Kit, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) e, posteriormente, colocadas em moldes de silicone, onde foi realizada a inclusão em resina Epoxy. Os procedimentos de preparo da resina, de infiltração e de polimerização foram realizados segundo instruções do fabricante.

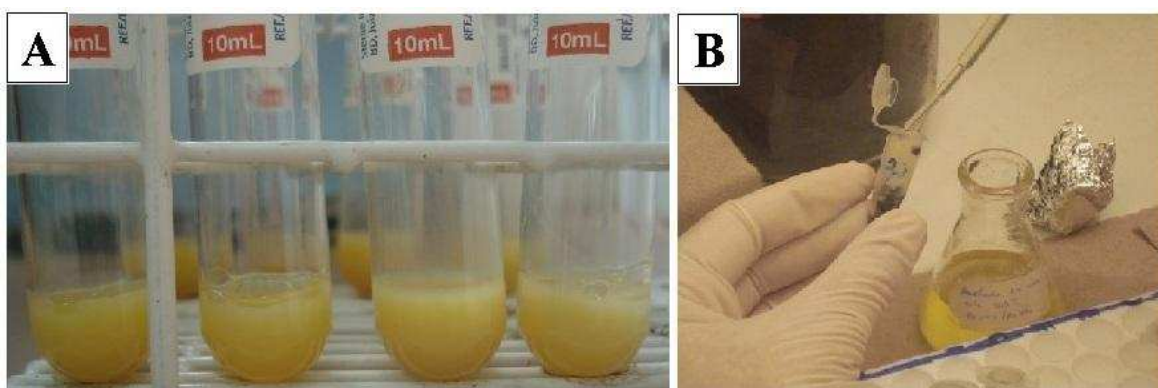


Figura 3-Amostras com aspecto gelatinoso após centrifugação com glutaraldeído a 10% (A) e pré-contratação com acetato de uranila a 0,5% (B).

As amostras foram incubadas em estufa a 45°C por 12 horas e, posteriormente, a 60°C por 36 horas para polimerização da resina. A presença de plaquetas nos cortes semifinos (0,25 a 0,5 μm), obtidos com ultramicrotomo (Sorvall MT2-B ultra microtome, Ivan Sorvall INC, Newtown, Conenecticut, USA) e navalha de vidro (Lâminas bioslide, Bioslide Technologies, Walnut, CA, EUA), foi comprovada mediante coloração com azul de toluidina (Azul de toluidina P.A. 25 g, Allkimia Comércio de Materiais para Laboratórios Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil). Em seguida, os blocos foram desbastados com a finalidade de diminuir a área de superfície a ser utilizada na confecção dos cortes ultrafinos (entre 80 e 100 nm de espessura), obtidos em ultramicrotomo com navalha de diamante (Diamond knife ultra 35°, Diatome, AG, Biel, Suíça). Os cortes foram montados em telas de cobre (Copper grid 200 mesh square, Koch Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil), com três repetições para cada amostra. Na sequência, cada tela foi contrastada em uma gota de acetato de uranila a 3%, por 20 minutos na ausência de luz. As telas foram então contrastadas em gotas de citrato de chumbo (Lead citrate 25 g, Koch Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 10% durante cinco minutos em ambiente com pastilhas de hidróxido de sódio para remoção do dióxido de carbono.

Após visualização e avaliação de todas as telas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM9, Zeiss do Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo; Tecnai G2-12 Spirit, 80 kV de tensão, Tecnai, Hillsboro, Oregon, USA), foi realizada a quantificação das plaquetas mediante observação de 10 malhas, com a finalidade de gerar uma porcentagem de plaquetas representativas da amostra. As malhas foram escolhidas ao acaso, exceto aquelas onde não havia corte tecidual, que não foram quantificados para obter uma melhor representação da amostra. Para evitar a avaliação em duplicata dos quadrantes, foi utilizado o recurso “*tracking*” do programa adotado para capturar as imagens (TIA Software, version 2.1.8, Tecnai, Hillsboro, Oregon, USA), que permite a marcação dos quadrantes e demonstra o caminho percorrido durante a análise da tela.

As plaquetas foram classificadas morfológicamente, conforme descrito por Wurzinger e Schmid-Schönbein [8] com modificação, em: 0 (em repouso): ligeiramente oval, com bordas lisas e organelas uniformemente dispersas no citoplasma; 1 (ativação incerta): forma arredondada, com organelas não centralizadas; 2 (totalmente ativada): forma oval irregular, com centralização de organelas e emissão de pseudópodes; 3 (dano irreversível): forma discóide, com organelas na periferia; e 4: com aspecto de ruptura.

As frequências das cinco diferentes morfologias das plaquetas (em repouso, ativação incerta, totalmente ativada, com dano irreversível e rompida) obtidas a partir das contagens na morfometria, foram corrigidas em função da concentração de plaquetas no sangue total e no PRP. O número corrigido de plaquetas, obtido para cada classe morfológica de cada animal, foi resultado da divisão do número total de plaquetas observadas na microscopia eletrônica de transmissão pelo número total de plaquetas no PRP multiplicado pela média geral de plaquetas no PRP (considerando todos os animais). Tal correção foi realizada com o objetivo de corrigir as diferenças inerentes aos animais (diferentes concentrações de plaquetas no sangue total de cada indivíduo, embora dentro da faixa de referência para a espécie) e à imprecisão da metodologia de obtenção do PRP (diferentes concentrações de plaquetas no PRP de cada indivíduo). Para a realização da análise estatística a partir dos quatro animais utilizados no experimento, foi adotado o maior valor de plaquetas para cada classificação morfológica.

Análise Estatística

Para as variáveis hematológicas (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais e plaquetas) e bioquímicas (PPT e fibrinogênio), foi realizada análise descritiva com mínimo e máximo. Para verificar se as frequências das diferenças encontradas entre os

tipos morfológicos das plaquetas, assim como entre os tratamentos, foram devidas ao acaso, ou seja, independentes, foi utilizado o teste de qui-quadrado, a 5% de significância. Esses testes foram processados no software Minitab versão 16, 2010 (<http://www.minitab.com/products/minitab>, State College, PA).

Resultados

Os valores das variáveis hematológicas e bioquímicas avaliadas quinze dias antes da realização do experimento foram de 26,50 a 33,50%, 9,3 a 11,2 g/mm³, 6.010.000 a 7.060.000 células/μL, 6.600 a 10.500 células/μL, 198.000 a 223.000 células/μL, 7,00 a 8,00 g/mm³ e 0,10 a 0,40 g/mm³, para o hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, plaquetas, PPT e fibrinogênio, respectivamente.

No dia da obtenção do PRP, a concentração das plaquetas no sangue total dos quatro animais foi de 145.000 a 188.000 células/μL. Já no PRP foi de 310.000 a 650.000 células/μL.

Na observação geral dos campos em microscopia eletrônica de transmissão havia presença de eritrócitos e leucócitos polimorfonucleares em todos os tratamentos (Figura 4). Leucócitos mononucleares foram detectados apenas nas amostras tratadas com trombina bovina. Agregado plaquetário foi observado ocasionalmente no PRP puro (controle) e no tratamento com trombina associada ao CaCl₂ a 10%.

Os valores máximos de plaquetas para cada classificação, considerando os quatro animais, após a correção do número de plaquetas obtido na morfometria podem ser observados no Apêndice 1. Na Tabela I são apresentadas as porcentagens das morfologias somente para o PRP puro e ativado com CaCl₂, pois no tratamento com trombina pura ou associada a CaCl₂ a 10%, não foram observadas plaquetas com aspectos que se enquadrassem na classificação adotada no presente estudo, conforme descrita por Wurzinger e Schmid-Schönbein [8]. Houve associação (P=0,03) entre o tipo morfológico de plaqueta e o tratamento.

Das plaquetas classificadas como totalmente ativadas e em repouso, 58% e 20%, respectivamente, foram observadas no PRP ativado com CaCl₂ a 10%, estando o restante no PRP puro.

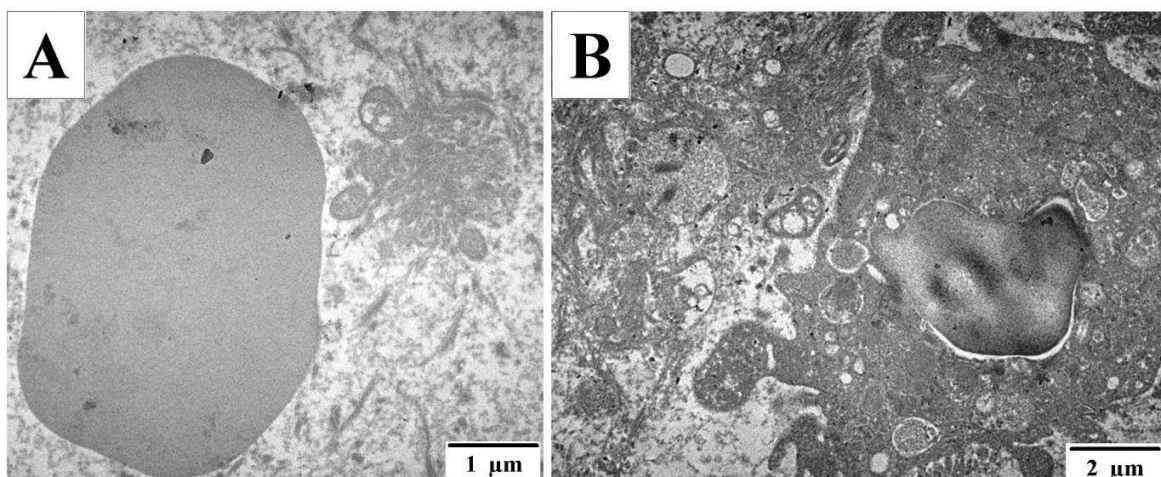


Figura 4-Eletronmicrografia de eritrócito (A) e leucócito polimorfonuclear (B) observados em todas as amostras de plasma rico em plaquetas.

Tabela I- Porcentagem de plaquetas em cada classificação morfológica obtida no PRP puro e no PRP ativado com CaCl_2

Classificação das plaquetas	PRP puro (%)	PRP + CaCl_2 a 10% (%)
Em repouso	41	20
Ativação incerta	49	54
Totalmente ativada	9	24
Dano irreversível	1	2

A Figura 5 mostra alguns tipos morfológicos de plaquetas presentes no PRP puro e no ativado com cloreto de cálcio a 10%. As amostras tratadas com trombina bovina pura, assim como com associação de trombina e CaCl_2 a 10%, apresentaram plaquetas com morfologia distinta, caracterizada por forma irregular, emissão de grandes pseudópodes filamentosos, aspecto de rompimento e grânulos íntegros tanto no citoplasma remanescente quanto no meio extracelular adjacente. Debris celulares e fibrina também foram observados entre as plaquetas (Figura 6).

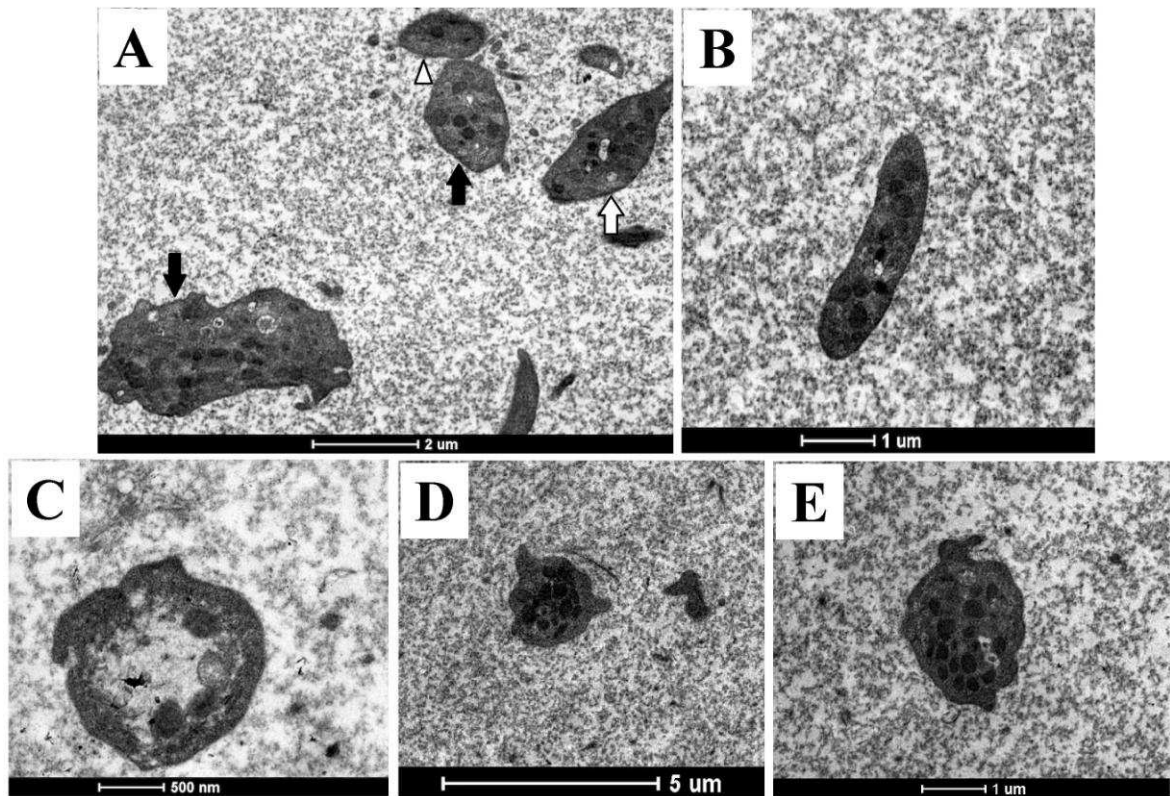


Figura 5-Eletronmicrografia demonstrando agregação plaquetária (cabeça de seta) e plaqueta com ativação incerta (seta preta), com borda irregular e descentralização dos grânulos. Adicionalmente, nota-se plaqueta com morfologia totalmente ativada (seta branca) (A). Plaqueta em repouso, em forma oval, bordas lisas e com grânulos dispersos aleatoriamente (B). Plaqueta com dano irreversível, com forma discóide e migração das organelas para a periferia (C). Plaqueta totalmente ativada, com forma irregular, emissão de pseudópodes e centralização dos grânulos (D, E).

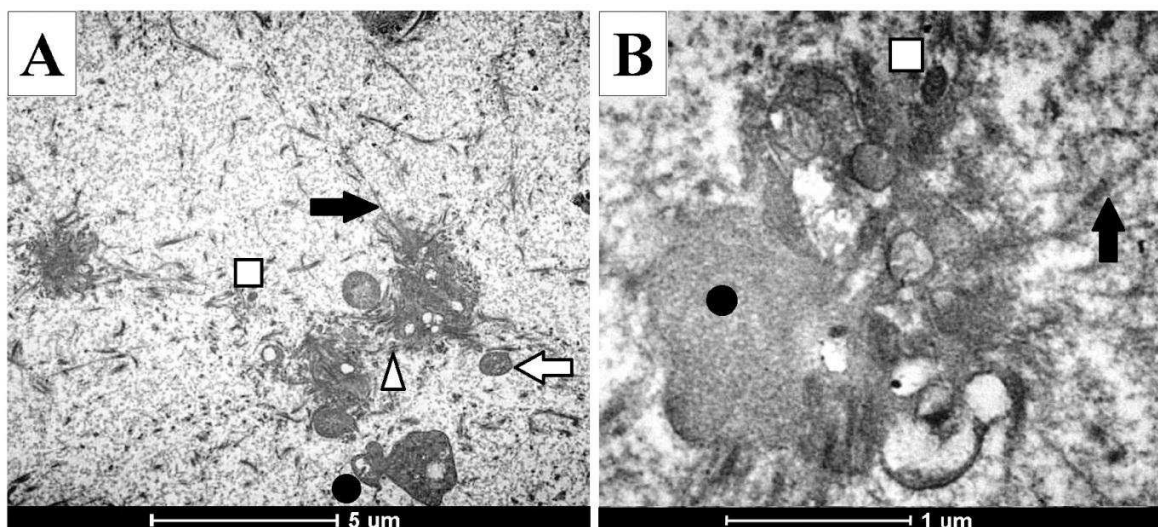


Figura 6-Eletronmicrografia de plaquetas com aspecto de rompimento observadas no plasma rico em plaquetas ativado com trombina pura ou associada ao CaCl_2 a 10%. Nota-se agregação plaquetária (cabeça de seta), formação de fibrina (seta preta) entre as plaquetas e debris celulares (seta branca) dispersos no plasma (A). Detalhe de plaqueta com rompimento, apresentando protusão citoplasmática (círculo) e grânulos íntegros dentro do citoplasma e no meio extracelular (quadrado), além de fibrina (seta preta) (B).

Discussão

Os valores das variáveis hematológicas e bioquímicas avaliadas quinze dias antes da realização do experimento estiveram dentro dos de referência para a espécie equina [55,56], indicando a higidez dos animais.

Todos os animais apresentaram no PRP contagens de plaquetas superiores a 300.000 células/ μL , quantidade considerada como adequada por Anitua et al. [30].

A presença de eritrócitos e polimorfonucleares em todos os tratamentos analisados em microscopia eletrônica de transmissão pode influenciar a eficiência do PRP no tecido lesionado que irá receber a terapia. A expressão de selectinas na membrana celular após ocorrer sua fusão com as membranas dos grânulos durante o processo de exocitose [21,57,58], pode ser responsável pela adesão entre plaquetas, leucócitos e monócitos. Entretanto, o PRP ideal não deve conter polimorfonucleares, uma vez que essas células podem potencializar a resposta pró-inflamatória fisiológica no tecido lesionado mediante a ativação de receptores de adesão a outras células do sistema imune, e secreção de quimiocinas e citocinas, que promoverão diferenciação celular [59]. Adicionalmente, os neutrófilos expressam enzimas que degradam a matriz extracelular, como as

metaloproteinases MMP-8 e MMP-9, e liberam espécies reativas de oxigênio que destroem tanto as células danificadas quanto as saudáveis [60].

Rinder et al. [21] estudando a adesão in vitro de plaquetas a leucócitos, observaram que 93% dos monócitos e 82% dos polimorfonucleares se ligaram às plaquetas quando estas foram ativadas por trombina bovina numa concentração final de 0,1 a 0,25 UI/mL, sendo essas porcentagens menores no PRP ativado com ADP ou sem ativação. Ainda na opinião desses autores, a trombina promove uma maior expressão da proteína de membrana GMP-140, que de acordo com Larsen et al. [57] é uma P-selectina responsável pela mediação da adesão de plaquetas ativadas a polimorfonucleares e monócitos. Esse fato pode explicar a observação, no presente estudo, de leucócitos mononucleares apenas no PRP tratado com trombina bovina, cuja concentração final de 20 UI/mL foi baseada em protocolos de ativação do PRP pré-estabelecidos [25] e concentrado de plaquetas [22], para uso como método terapêutico.

A agregação plaquetária, fenômeno caracterizado pela modificação morfológica das plaquetas após ativação, com desenvolvimento de pseudópodes, que se espalham pelo tecido lesionado [5], foi ocasionalmente observado no presente estudo, tanto no PRP puro quanto no ativado com trombina associada à CaCl_2 a 10%. Este foi um evento acidental, podendo ser decorrente da presença de hemoglobina livre [61] ou mesmo pelo estímulo mecânico durante o processo de centrifugação [62]. Embora hematócritos elevados também possam induzir a ocorrência de agregado plaquetário [62], esse fator não deve ter influenciado a ocorrência do agregado na presente pesquisa, já que os valores dessa variável estiveram, como mencionado anteriormente, dentro do padrão de referência para a espécie. Outras possíveis causas são a presença de fibrinogênio, do fator de Von Willebrand (vWf) e de proteínas adesivas secretadas pelos grânulos plaquetários quando as plaquetas se encontram em estágio ativado, que podem ser responsáveis pela formação de pontes entre elas [30]. Segundo Blair e Flaumenhaft [3], essas proteínas adesivas são responsáveis por promover interações plaqueta-plaqueta.

A ativação de plaquetas ocorre com a finalidade de ampliar a resposta inflamatória à lesão existente, de forma a promover uma recuperação mais rápida e eficaz. Entretanto, a ativação excessiva com formação incontrolável de agregados plaquetários é responsável por uma série de fenômenos tromboembólicos, principalmente dentro das artérias [6]. Nesse sentido, deve-se ter o máximo de cuidado durante o preparo do PRP para que não ocorra hemólise nem mistura das colunas de leucócitos ou de células vermelhas com o plasma durante a manipulação dos tubos centrifugados. Entretanto, por maior que seja a

cautela durante o processamento de obtenção do PRP, sempre existe a possibilidade de ocorrência de contaminação por falha humana ou durante o processo de centrifugação.

Tanto o PRP puro quanto o ativado com CaCl_2 a 10% possibilitaram a visualização de plaquetas totalmente ativadas, com forma arredondada, emissão de pseudópodes e organelas centralizadas. Essas características também foram observadas em outros estudos ultraestruturais com PRP não ativado farmacologicamente, para avaliar a morfologia de plaquetas *in vitro*, quando submetidas a forças de cisalhamento com a finalidade de se mimetizar o fluxo sanguíneo [8,63], e *in vivo*, quando expostas a toxinas liberadas durante sobrecarga por grãos, usada na indução experimental de laminite, com ou sem prévio tratamento com drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, que podem inibir a agregação plaquetária [54].

No presente estudo ficou demonstrada diferença entre os tratamentos na eficácia da desgranulação das plaquetas. O PRP puro e o ativado com CaCl_2 a 10% apresentaram padrão semelhante, embora o não ativado tenha demonstrado quantidade de plaquetas em repouso. Esse tipo morfológico de plaqueta é inerte, ou seja, não exerce função secretória, já que não libera fatores de crescimento, mas pode fazê-lo quando ativado pelo colágeno [5,6,10,11] e outras substâncias presentes no tecido lesionado, como adrenalina e serotonina [6], fibrina e plaquetas teciduais já ativadas após lesão de endotélio [64-66]. Portanto, PRP puro possui grande potencial para ativação e, conseqüentemente, desgranulação, dependendo da degradação e do tamanho da lesão.

O PRP sem ativador apresentou ainda um número elevado de plaquetas com ativação incerta. Não se conhece a capacidade dessas plaquetas promoverem a desgranulação, mas é possível que possam finalizar seu processo de ativação e tornarem-se totalmente ativadas no tecido onde o PRP será colocado, podendo, a partir de então, liberar o conteúdo de seus grânulos através da exocitose.

Plaquetas com dano irreversível foram observadas tanto no PRP puro quanto no ativado com CaCl_2 a 10%. Segundo Wurzinger e Schmid-Schönbein [8] esta forma é caracterizada por degeneração em forma de balão como consequência do influxo de líquido extracelular através da membrana plasmática não totalmente íntegra. A alteração de membrana poderia prejudicar a fusão dos grânulos com a mesma e, conseqüentemente, influenciar a quantidade de fatores de crescimento liberados. Portanto, essa morfologia pode ser considerada como inadequada quando se busca a obtenção de um PRP ideal.

No presente estudo, a maioria das plaquetas totalmente ativadas foi observada no PRP ativado com CaCl_2 a 10%. A adição de cloreto de cálcio ao componente rico em

plaquetas promove a formação de trombina natural, mimetizando o processo fisiológico de formação do coágulo, e permite a liberação de fatores de crescimento por um maior período, o que pode ser crucial na reparação e cicatrização tecidual [67]. Nessas plaquetas ativadas, os grânulos já devem estar prontos para sofrerem a desgranulação e liberação dos fatores de crescimento atuantes na reparação da lesão [4]. Em estudo *in vitro*, White et al. [68] utilizaram 0,2 mL de CaCl_2 a 0,025 M (0,277%) para ativar as plaquetas e estimular a formação de coágulos em PRP humano. Os autores investigaram a relação plaqueta-fibrina na formação de coágulos e foram capazes de evidenciar por avaliação ultraestrutural, alterações morfológicas nas plaquetas ativadas e sua capacidade em formar agregados.

A adição de trombina ao PRP resulta na formação de fibrina e provoca alterações morfológicas marcantes nas plaquetas, como mudança de forma, desenvolvimento de pseudópodes, centralização e fusão dos grânulos [69], assim como liberação de seus conteúdos [23,69]. Entretanto, a intensidade de ativação das plaquetas e, conseqüentemente, alterações na sua morfologia, pode ser influenciada pela concentração da trombina no PRP, conforme observado por White e Krumwiede [13] em estudo ultraestrutural *in vitro* de plaquetas de humanos expostas a diferentes concentrações de trombina. No presente estudo, o PRP ativado com trombina pura ou associada ao CaCl_2 a 10%, apresentaram plaquetas com morfologia que não se enquadrou na classificação adotada, caracterizada por uma forma irregular, com aspecto de rompimento e emissão de pseudópodes filamentosos, gerando grandes protrusões citoplasmáticas. Wurzinger et al. [63] encontraram formas semelhantes em estudo *in vitro* com PRP exposto à elevada força de cisalhamento (equivalente ou superior a 170 N/m^2 por 113 ms) em fluxo viscométrico.

Apesar do aspecto morfológico apresentado por essas plaquetas, os grânulos ainda podiam ser observados no interior de remanescentes citoplasmáticos, assim como na região adjacente. Isso não implica, necessariamente, desgranulação e liberação do conteúdo dos grânulos. Este fato pode ser considerado como prejudicial, pois o que garante a qualidade do PRP é a presença de fatores de crescimento no plasma, liberados após a exocitose dos grânulos plaquetários. Em estudo *in vitro*, de Clerck et al. [69] observaram que antes do início da retração do coágulo do PRP humano ativado com concentrações de trombina acima de 10 UI/mL, as plaquetas mostraram extensa formação de protrusões citoplasmáticas com grande propensão a deposição de fibrina, as quais se estendiam a uma zona central de fusão granular. Adicionalmente, com o desenvolvimento da retração do coágulo, foram formadas extensas aglomerações de plaqueta e fibrina, ocorrendo, aparentemente, desgranulação plaquetária. Por outro lado, White et al. [68] também

observaram essa morfologia ao avaliar a relação plaqueta-fibrina em coágulos de sangue humano após adição de 0,2 mL de CaCl_2 a 0,025 M (0,277%), denominando-as de formações de rosetas.

A adição de pequena quantidade de trombina humana diluída em solução de gluconato de cálcio ao PRP promove imediata coagulação [40], alterando a consistência do PRP líquido para gel [23], dificultando sua aplicação por meio de agulhas [40]. Nesses casos, a administração simultânea sem prévia mistura é uma boa alternativa [40], pois parece melhorar a desgranulação plaquetária e, possivelmente, a liberação de fatores de crescimento, além de promover a retenção de plaquetas na lesão [25]. Esta técnica foi utilizada por vários autores [22,25,27,40-42,46,59].

Por outro lado, devida importância deve ser dada à utilização da trombina bovina como agente ativador de plaquetas, visto que esta substância pode causar o desenvolvimento de anticorpos anti-trombina, anti-fator V e anti-fator XI, resultando em problemas que variam desde sangramento intenso a síndromes autoimunes [70,71]. Estudo *in vitro* realizado por Fufa et al. [29] revelou contração rápida e acentuada do coágulo gelatinoso ao se utilizar trombina bovina como agente ativador de PRP obtido a partir de sangue humano, o que pode inibir o preenchimento e a cicatrização de feridas.

Segundo Marx [72] e Pietrzak e Eppley [73], os fatores de crescimento são secretados ativamente dos α -grânulos durante os primeiros 10 minutos da coagulação, sendo que mais de 95% dos fatores presintetizados são liberados dentro da primeira hora [74]. Além disso, os que são secretados podem permanecer no coágulo de fibrina, sendo lentamente liberados durante a degradação do mesmo [59]. É possível que isto ocorra nos componentes ricos em plaquetas logo após a sua preparação. Assim, recomenda-se o uso imediato do concentrado de plaquetas [75] e PRP [72,76] após a sua preparação, sendo o tempo máximo para utilização de 8 horas, quando finalmente pode ocorrer a perda da sua estabilidade [72,76] e deficiência nas proteínas secretoras expressadas [73]. No presente estudo, após administração do agente ativador, o PRP foi colocado em estufa, já que se buscava uma otimização da desgranulação [31,37,38,53], essencial para a execução do estudo ultraestrutural cuja finalidade foi indicar o ativador de plaquetas mais adequado ao uso terapêutico do PRP.

Ainda que se tenha conhecimento de que o PRP deve ser ativado para que as plaquetas possam liberar o conteúdo de seus grânulos e formar coágulos, disponibilizando um veículo para conter as proteínas secretadas e manter sua presença no local da ferida [73], existe controvérsia sobre a necessidade ou não dessa ativação antes da sua

administração, particularmente com a trombina. Apesar da importância da utilização de agentes ativadores, sabe-se que o estresse mecânico causado pela centrifugação durante o preparo do plasma rico em plaquetas pode ativar algumas plaquetas [19,77], o que explica a presença desse tipo morfológico no PRP puro avaliado no presente estudo. Nesse sentido, vários experimentos já utilizaram PRP puro, ou seja, sem a prévia adição de agentes farmacológicos ativadores, em pesquisas realizadas tanto em equinos [45,47-49] quanto em humanos [50,51].

Como não existem estudos morfométricos de plaquetas presentes no PRP comparando diferentes substâncias ativadoras, os dados obtidos na presente pesquisa não puderam ser comparados. Adicionalmente, a hipótese não foi comprovada, uma vez que a morfologia das plaquetas visualizadas no PRP ativado com trombina não foram características de desgranulação. Levando em consideração que plaquetas totalmente ativadas apresentam maior probabilidade de realizar a desgranulação, com consequente liberação dos fatores de crescimento, um PRP que apresente maior proporção dessa morfologia é considerado como o mais adequado. A análise ultraestrutural realizada no presente estudo revelou que o PRP ativado com CaCl_2 a 10% é o ideal, pois apresentou a maior quantidade de plaquetas classificadas como totalmente ativadas. Entretanto, quando se necessita um PRP mais fluído, de fácil administração em tendões e ligamentos, o uso de CaCl_2 a 10% como ativador pode não ser viável, visto que sua adição promove a formação de um gel. Para tal aplicação recomenda-se o uso de PRP puro, que na presente pesquisa foi o segundo tratamento com maior percentagem de plaquetas totalmente ativadas. Adicionalmente, as plaquetas em repouso, também presentes no PRP puro, podem sofrer ativação no próprio tecido a ser administrado, havendo assim a liberação dos fatores de crescimento presentes nos grânulos plaquetários. Por outro lado, como pode ocorrer perda da estabilidade e deficiência nas proteínas secretoras expressas no PRP quando não utilizado rapidamente, é importante que se façam estudos ultraestruturais imediatamente após o seu preparo, assim como pesquisas que quantifiquem os fatores de crescimento no PRP ativado ou não farmacologicamente.

Conclusão

O cloreto de cálcio a 10% é uma substância ativadora adequada para plaquetas. Entretanto, o plasma rico em plaquetas (PRP) pode ser utilizado sem prévia ativação por agentes farmacológicos, por apresentar grande percentagem de plaquetas totalmente ativadas após os procedimentos de rotina para a sua obtenção.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG pelo suporte financeiro, a CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado e iniciação científica, respectivamente, assim como ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa e ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, por disponibilizar o laboratório para utilização.

Referências

- [1] Pretorius E, Briedenhann S, Marx J, Smit E, Merwe CVD, Pieters M, Franz C. Ultrastructural comparison of the morphology of three different platelet and fibrin fiber preparations. *Anat Rec* 2007;290:188-198.
- [2] Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91b:987-996.
- [3] Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009;23:177-189.
- [4] Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993;7:52-62.
- [5] Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffmann J, Pverdevest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Techn* 2006a;38:174-187.
- [6] Blockmans D, Deckmyn H, Vermylen J. Platelet activation. *Blood Rev* 1995;9:143-156.
- [7] Freson K, Labarque V, Thys C, Wittevrongel C, van Geet C. What's new in using platelet research? To unravel thrombopathies and other human disorders. *Eur J Pediatr* 2007;166:1203-1210.
- [8] Wurzinger LJ, Schmid-Schönbein H. The role of fluid dynamics in triggering and amplifying haemostatic reactions in thrombogenesis. *Monogr Atheroscler* 1990;15:215-226.
- [9] Schick PK, Yu BP. The role of platelet membrane phospholipids in the platelet release reaction. *J Clin Invest* 1974;54:1032-1039.
- [10] Camera M, Giesen PL, Fallon J, Aufiero BM, Taubman M, Tremoli E, Nemerson Y. Cooperation between VEGF and TNF-alpha is necessary for exposure of active tissue

factor on the surface of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:531-537.

[11] Furlan M. Sticky and promiscuous plasma proteins maintain the equilibrium between bleeding and thrombosis. *Swiss Med Wkly* 2002;132:181-189.

[12] Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* 2005;84:434-439.

[13] White JG, Krumwiede M. Further studies of the secretory pathway in trombin-stimulated human platelets. *Blood* 1987;69:1196-1203.

[14] Escolar G, White JG. The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells* 1991;17:467-485.

[15] Rendu F, Brohard-Brohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12:261-273.

[16] Reed GL. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:441-450.

[17] Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988;263:18205-18212.

[18] Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am. J. Sports Med.* 2009;37:2259-2272.

[19] Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22:547-557.

[20] Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cir Plast* 2009;24:212-218.

[21] Rinder HM, Bonan JM, Ault KA, Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 1991;78:1760-1769.

[22] Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 2004;75:93-99.

[23] Ouyang X, Qiao J. Effect of platelet-rich plasma in the treatment of periodontal intrabony defects in humans. *Chin Med J* 2006;119:1511-1521.

[24] Silva SB, Ferrigno CRA, Sterman FA, Baccarin DCB, Yazbek KVB, Muramoto C, Amaku M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. *Ciência Rural* 2007;37:1045-1051.

- [25] Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. 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* 2008;232:1515-1520.
- [26] Filgueiras RR. Uso de condrócitos heterólogos cultivados na reparação de falhas osteocondrais produzidas no joelho de coelho. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008: 1-68.
- [27] Murray MM, Spindler KP, Devin C, Snyder BS, Muller J, Takahashi M, Ballard P, Nanney LB, Zurakowski D. Use of collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *J Orthop Res* 2006;24:820-830.
- [28] Murray MM, Spindler KP, Abreu E, Muller JA, Nedder A, Kelly M, Frino J, Zurakowski D, Valenza M, Snyder BD, Connolly SA. Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 2007;25:81-91.
- [29] Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Sherwin K, Murray MM. Activation of platelet-rich plasma using type I collagen. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:684-690.
- [30] Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelet as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4-15.
- [31] Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci* 2006;81:237-245.
- [32] Argüelles D, Carmona JU, Climent F, Muñoz E, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in 5 horses. *Vet Rec* 2008;162:208-211.
- [33] Giacco F, Perruolo G, D'agostino E, Fratellanza G, Perna E, Misso S, Saldalamacchia G, Oriente F, Fiory F, Miele C, Formisano S, Beguinot F, Formisano P. Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor-1. *FASEB J* 2006;20:1763-1772.
- [34] Gimeno FL, Gatto S, Ferro J, Croxatto JO, Gallo JE. Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thromb J* 2006;4:1-7.
- [35] Carmona JU, Argüelles D, Climent F, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Sci* 2007;27:167-170.

- [36] de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HTM, Weinans H, Verhaar JAN, van Osch GJVM. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med* 2008;36:1171-1178.
- [37] Maia L, Souza MV, Alves GES, Ribeiro Júnior JI, Oliveira AC, Zandim BM, Silva YFRS. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica. *Pesq Vet Bras* 2009a;29:241-245.
- [38] Maia L, Souza MV, Ribeiro Júnior JI, Oliveira AC, Alves GES, Benjamin LA, Silva YFRS, Zandim BM, Moreira JCL. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J Equine Vet Sci* 2009b;29:618-623.
- [39] de Vos RJ, Weir A, van Schie HTM, Bierma-Zeinstra SMA, Verhaar JAN, Weinans H, Tol JL. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 2010;303:144-149.
- [40] Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cell and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis – a preliminary result of three cases. *Bone* 2004;35:892-898.
- [41] Everts PAM, Mahoney CB, Hoffmann JJML, Schönberger JP, Box HAM, van Zundert A, Knappe JTA. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors* 2006b;24:165-171.
- [42] Gandhi A, Doumas C, O'connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2006;38:540-546.
- [43] Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks. *Acta Orthop* 2006;77:806-812.
- [44] 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.
- [45] McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res* 2009;27:1033-1042.
- [46] Sutter WW, Kaneps AJ, Bertone AL. 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* 2004;65:924-930.

- [47] Smith JJ, Ross MW, Smith RKW. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006;19:43-47.
- [48] Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. Platelet Rich Plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007;25:230-240.
- [49] Bosch G, van Schie HTM, Groot MW, Cadby JA, van De Lest CHA, Barneveld A, van Weeren PR. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res* 2009;28:211-217.
- [50] Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 2006;34:1774-1778.
- [51] Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, Nagae M, Arai Y, Kawata M, Toshikazu K. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol* 2008;215:837-845.
- [52] Rees HM, Ecker EE. An improved method for counting blood platelets. *J Am Med Assoc* 1923;80:621-622.
- [53] Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang* 2003;85:283-289.
- [54] Paes Leme FO, Wurzinger LJ, Vasconcelos AC, Alves GES. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arq Bra Med Vet Zootec* 2006;58:149-157.
- [55] Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Appendix I SI Units. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, ed. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. Amsterdam: Academic Press, 2008: 916-916.
- [56] Grondin TM, Dewitt SF. Normal hematology of the horse and donkey. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, ed. *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010: 821-828.
- [57] Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989;59:305-312.
- [58] Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, Andrian UH. Platelet-Mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* 1996;273:252-255.

- [59] Woodell-May JE, Pietrzak WS. Platelet-Rich plasma in orthopedics. In: PIETRZAK WS, ed. Orthopedic biology and medicine: musculoskeletal tissue regeneration, biological materials and methods. Totowa: Hamana Press, 2008: 547-568.
- [60] Scott A, Khan KM, Roberts CR, Cook JL, Duronio V. What do we mean by the term “inflammation”? A contemporary basic science update for sports medicine. *Br J Sports Med* 2004;38:372-380.
- [61] Wurzinger LJ, Blasberg P, Schmid-Schönbein H. Hemolysis and in vitro thrombus formation. In: Stoltz JF, Drouin P, ed. Hemorheology and diseases. Paris: Doin, 1980: 529-533.
- [62] Weiss DJ, Evanson OA, McClenahan D, Fagliari J, Walcheck B. Shear-induced platelet activation and platelet-neutrophil aggregate formation by equine platelets. *Am J Vet Res* 1998;59:1243-1246.
- [63] Wurzinger LJ, Opitz R, Blasberg P, Schmid-Schonbein H. Platelet and coagulation parameters following millisecond exposure to laminar shear stress. *Thromb Haemost* 1985;54:381-386.
- [64] Molloy T, Wang Y, Murrell GAC. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;33:381-394.
- [65] Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 2004;37:865-877.
- [66] Hope M, Saxby TS. Tendon healing. *Foot Ankle Clin N Am* 2007;12:553-567.
- [67] Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:521-528.
- [68] White JG, Krivit W, Vernier R. The platelet-fibrin relationship in human blood clots: an ultrastructural study utilizing ferritin-conjugated anti-human fibrinogen antibody. *Blood* 1965;5:241-257.
- [69] de Clerck F, Borges M, Gaetano G, Vermeylen J. Dissociation of clot retraction from platelet granule fusion and degranulation: an ultrastructural study of Reptilase - human platelet-rich plasma clots. *Br J Haematol* 1975;29:341-348.
- [70] Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:93-103.
- [71] Lawson JH. The clinical use and immunologic impact of thrombin in surgery. *Semin Thromb Hemost* 2006;32:98-110.
- [72] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-496.

- [73] Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005;16:1043-1054.
- [74] Kevy S, Jacobson M. Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel, in *Proceedings. 27th Annual Meeting of Service Biomaterials* 2001.
- [75] Roukis TS, Zbonis T, Tiernan B. Autologous platelet-rich plasma for wound and osseous healing: a review of the literature and commercially available products. *Adv Ther* 2006;23:218-237.
- [76] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225-228.
- [77] Landi EP, Marques Júnior JFC. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. *Rev Bra Hematol Hemoter* 2003;25:39-46.

CAPÍTULO II

Imunoistoquímica de TIMP-1 e TGF- β 1, histologia e morfometria de tendão de equino tratado com plasma rico em plaquetas

Redigido conforme as normas do periódico Research in Veterinary Science
(Ainda serão realizadas algumas modificações para atender as normas)

ZANDIM, Bruna Mota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinopatia em equinos: ultraestrutura plaquetária, histologia e imunoistoquímica tendínea.** Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-Orientadoras: Marlene Isabel Vargas Viloria e Andrea Pacheco Batista Borges.

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi verificar o efeito terapêutico do plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento da tendinopatia do tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS), mediante a realização de estudos histológico e imunoistoquímico (TIMP-1 e TGF- β 1), nas fases inflamatória e de proliferação do processo de reparação. Cinco dias após indução da tendinopatia por colagenase, os membros torácicos de seis equinos foram tratados via intralesional com PRP ou NaCl a 0,9%. Biópsia foi realizada três ou 16 dias após tratamentos. Em ambas as fases e tratamentos, a área da lesão estava preenchida por tecido de granulação contendo fibras colágenas esparsas com perda do paralelismo, fibroblastos com morfologia variada e endotendão hipertrofiado, sendo essas características mais acentuadas na fase de proliferação, sem haver diferença entre tratamentos. A marcação do TFDS foi negativa para TGF- β 1, e positiva para TIMP-1 em alguns membros, sem diferença entre tratamentos e fases do reparo tendíneo.

Palavras chave- Cavalos; Componentes ricos em plaquetas; Fatores de crescimento; Estruturas tendíneas; Anatomia patológica; Quantificação morfométrica.

Immunohistochemistry of TIMP-1 and TGF- β 1, histology and morphometry in equine tendon treated with platelet-rich plasma

ZANDIM, Bruna Mota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Platelet-rich plasma in the treatment of tendinopathy in horses: platelet ultrastructure, histology and immunohistochemical analyses of tendon.** Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-advisers: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Andrea Pacheco Batista Borges.

Abstract

The aim of this research was to investigate the therapeutic effect of platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of superficial digital flexor (SDF) tendinopathy, through histological and immunohistochemical (TIMP-1 and TGF- β 1) studies, in inflammatory and proliferative phases of healing. Five days after the tendinopathy induction with collagenase, the forelimbs of six gelding were intralesional treated with PRP or saline. Biopsy was performed three or sixteen days after treatments. In both phases and treatments, the injured area was filled by a granulation tissue containing sparse collagen fibers with loss of parallelism, fibroblasts with variable morphology, and endotenon hypertrophy, being these characteristics more pronounced in the proliferation phase, with no difference between groups. The SDF tendon was immunonegative stained for TGF- β 1, and immunopositive stained for TIMP-1 in some samples, but no difference was detected between treatments and stages of tendon repair.

Keywords: horses; components rich in platelets; growth factors; tendon structures; pathology anatomy; morphometric quantification.

1. Introdução

O tendão é um conjunto de tecidos responsável pela sustentação do aparelho locomotor, composto por fibras colágenas principalmente do tipo I, proteoglicanos, glicoproteínas, água (Wang, 2006; Thorpe et al., 2010), condrócitos, células sinoviais e endoteliais e, principalmente, fibroblastos e fibrócitos, também conhecidos como tenoblastos e tenócitos (Kannus, 2000). Os fibroblastos se alinham em fileiras entre os feixes de fibras colágenas, sendo responsáveis pela síntese de proteínas da matriz extracelular, além da remodelação dessa matriz durante a reparação do tendão (Wang, 2006). Embora a diferença exata entre fibroblastos e fibrócitos ainda não esteja bem documentada no tendão (Cowin e Doty, 2007), os fibrócitos surgem com o avançar da

idade do tecido, à medida que os fibroblastos vão amadurecendo, se transformando e se tornando muito alongados (Kannus, 2000).

Estruturalmente, o tendão é caracterizado por uma unidade hierárquica, composta de moléculas de colágeno, fibrilas, feixes de fibras e fascículos, dispostos paralelamente, ao longo do eixo do tendão (Sharma e Maffulli, 2005; Wang, 2006; Dahlgren, 2007). As moléculas de colágeno se agrupam para formar as fibrilas, enquanto as fibras são constituídas de fibrilas envoltas pelo endotendão, uma delgada camada de tecido conjuntivo que contém vasos sanguíneos e linfáticos, além de nervos. Feixes de fibras formam os fascículos, e o conjunto de fascículos é envolvido pelo epitendão, que é uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo contendo suplemento sanguíneo, linfático e nervoso para o tendão (Kasterlic et al., 1978; Sharma e Maffulli, 2005; Cowin e Doty, 2007). Os tendões são envolvidos ainda por uma terceira camada de tecido conjuntivo, denominada de paratendão (Sharma e Maffulli, 2005; Wang, 2006; Cowin e Doty, 2007). O epitendão e o paratendão compõem o chamado peritendão (Wang, 2006), que reduz a fricção com o tecido adjacente (Schatzker e Branemark, 1969).

Até recentemente, o termo tendinite era normalmente utilizado para as anormalidades crônicas dos tendões, porém sugerindo a presença de processo inflamatório (Alfredson, 2003; Maffulli et al., 2003). Entretanto, estudos histológicos mostraram que esses casos eram acompanhados de reparação tecidual anormal e degeneração, sendo que a melhor terminologia, defendida por alguns autores, é a tendinopatia, quando existe quadro clínico de dor, edema e redução do desempenho (Alfredson, 2003; Maffulli et al., 2003; Wang et al., 2006).

Esta afecção é bastante frequente no tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS) de equinos (O'Meara et al., 2010), estrutura mais importante no armazenamento de energia durante a locomoção da espécie (Batson et al., 2003). Estudo epidemiológico realizado por Singer et al. (2008) em animais utilizados em competições de um dia ou concurso internacional completo revelou que 21% (N=83) dos animais não puderam participar do evento completo devido a lesões. Dentre elas, as que acometeram os tendões e ligamentos foram as mais comuns (43,4%), sendo o TFDS afetado em 33,3% dos casos. Devido às frequentes lesões, dimensão e posição superficial, o TFDS do equino é considerado um excelente modelo para o estudo das tendinopatias, inclusive de atletas humanos (Crass et al., 1992; Goodship e Birch, 2001; van Schie et al., 2000).

Terapia alternativa para o tratamento de tendinopatias, o plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena e econômica de fatores de crescimento, que ficam contidos

nos grânulos plaquetários, sendo considerados responsáveis pelo efeito dessa terapia na modulação e na aceleração dos processos de reparação tecidual (de Mos et al., 2008; Alsousou et al. 2009; Bosch et al., 2009; Foster et al., 2009). Esses fatores são condutores ou moduladores essenciais na regulação dos eventos celulares envolvidos na reparação por influenciarem significativamente a deposição da matriz extracelular e propiciarem a quimiotaxia para o local da lesão (Werner e Grose, 2003; Sutter et al., 2004; Everts et al., 2006a; Woodell-May e Pietrzak, 2008), recrutando plaquetas e leucócitos (Harrison e Cramer, 1993; Werner e Grose, 2003; Woodell-May e Pietrzak, 2008), além de promoverem neovascularização, proliferação e diferenciação celular (Werner e Grose, 2003; Sutter et al., 2004; Everts et al., 2006a), e apresentarem outras funções, como, por exemplo, o controle da morte celular (Werner e Grose, 2003). Entre as principais substâncias presentes nas plaquetas se destacam o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (Werner e Grose 2003; Pietrzak e Eppley, 2005; Everts et al., 2006a), que mostrou ter efeitos intensos na reparação tecidual (O'Kane e Ferguson, 1997), com aumento na produção de colágeno e viabilidade celular (Molloy et al., 2003). Metaloproteinases (MMP-1, -2 e -9) e seus inibidores teciduais (TIMP-1 e -4) (Blair e Flaumenhaft, 2009) também são descritos como presentes nos grânulos plaquetários.

Alguns dos principais desafios no tratamento de lesões tendíneas e ligamentosas são o longo período de reparação tecidual, e a qualidade das propriedades estrutural, organizacional e mecânica do tecido cicatricial, que normalmente é mais fraco em relação ao sadio (Molloy et al., 2003; Argüelles et al., 2008; O'Meara et al., 2010). Como consequência, ocorre um alto índice de recidiva. O'Meara et al. (2010) constataram, em estudo epidemiológico, recorrência de lesão no TFDS de 53% dos animais da raça Puro Sangue Inglês, após tratamento com IGF-1 intralesional, termocauterização ou desmotomia do ligamento acessório superior.

Embora o PRP pareça ser uma terapia promissora, a realização de estudos controlados ainda é escassa, particularmente na espécie equina. As poucas pesquisas realizadas utilizaram PRP ou concentrado de plaquetas (CP) como tratamento intralesional em desmite do ligamento suspensório (Waselau et al., 2008), tendinopatia do TFDS (Argüelles et al., 2008; Bosch et al., 2009; Maia et al., 2009a,b), em feridas de pele (Carter et al., 2003; Monteiro et al., 2009) e osteoartrite (Carmona et al., 2007, 2009). Estudos *in vitro* também foram realizados para avaliar o efeito do PRP em culturas de tendões (Schnabel et al., 2007; McCarrel e Fortier, 2009) e ligamentos (Smith et al., 2006; McCarrel e Fortier, 2009).

Em equinos, alguns estudos demonstraram que o PRP tem efeito benéfico quando empregado no tratamento intralesional, tanto in vivo (Carter et al., 2003; Argüelles et al., 2008; Waselau et al., 2008; Bosch et al., 2009) quanto in vitro (Smith et al., 2006; Schnabel et al., 2007; McCarrel e Fortier, 2009). Entretanto, outras pesquisas não encontraram diferença do PRP para a solução salina (Maia et al., 2009a,b; Monteiro et al., 2009). Adicionalmente, estudo recentemente realizado em humanos demonstrou que o PRP não teve efeito no tratamento de tendinopatias crônicas no tendão calcâneo comum (de Vos et al., 2010), que é uma estrutura funcionalmente semelhante ao TFDS de equinos (Crass et al., 1992). Em função do exposto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito terapêutico do PRP no tratamento da tendinopatia do TFDS, mediante estudos histológico e imunoistoquímico (TIMP-1 e TGF- β 1), realizados nas fases inflamatória e de proliferação/fibroplasia. A hipótese é que o PRP seja uma terapia eficaz no tratamento de lesões tendíneas, por promover uma reparação mais uniforme e organizada, apresentar ação anti-catabólica sobre a matriz tendínea e elevar a presença de TGF- β 1.

2. Material e métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) sob protocolo número 34/2009. 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.

2.1. Seleção e manejo dos animais

Foram utilizados seis equinos mestiços hígdos, machos castrados, com idade entre 5 e 16 anos ($13 \pm 4,05$ anos). Durante o processo de seleção, todos os animais foram submetidos a exame físico geral (frequências cardíaca e respiratória, tempo de enchimento capilar, temperatura corporal, coloração das mucosas, hidratação e motilidade intestinal), e específico do aparelho locomotor (estático e dinâmico), bem como exame ultrassonográfico da região metacárpica palmar dos membros torácicos.

Trinta dias antes da indução da tendinopatia, os animais foram colocados em baias individuais de 20 m² e alimentados diariamente com feno de tifton 85 (*Cynodon nlemfuensis*), capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado e ração (Total Alimentos S/A, Três Corações, MG, Brasil). Sal mineral (Nutrihorse plus, Nutriplan, Juiz de Fora, MG, Brasil) e água foram deixados ad libitum. Duas semanas antes da indução da

tendinopatia, os animais foram pesados, banhados com carrapaticida (Ultimate, Pffizer Saúde Animal, Belo Horizonte, MG, Brasil) e vermifugados por via oral com moxidectina (Equest, Fort Dodge, Mogi Mirim, SP, Brasil), na dose única de 0,2 mg/kg, para a eliminação de ecto e endoparasitas, respectivamente. Nesse mesmo período foi realizado hemograma completo, além da determinação da proteína plasmática total (PPT) e do fibrinogênio.

2.2. Indução da tendinopatia

A tendinopatia do TFDS foi induzida experimentalmente, conforme descrito por Nixon et al. (2008) com modificações, em ambos os membros torácicos de todos os animais, mediante administração de 2.090 unidades de digestão tecidual de colagenase (Collagenase type 1: C-0130, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) diluída em 0,3 mL de água Milli-Q.

Após tricotomia, o ponto médio palmar entre a face distal do osso acessório do carpo e a extremidade apical dos ossos sesamóides proximais, foi definido com o auxílio de uma régua. Entretanto, quando a região de indução coincidiu com a localização do ramo comunicante dos nervos palmares, a administração da colagenase foi realizada 1 cm distal a ele, para não comprometer essa estrutura anatômica, de forma que o local da lesão variou entre 13 a 15 cm distal ao osso acessório do carpo. Uma vez definido o local, o tendão foi examinado ultrassonograficamente em plano transversal com um transdutor linear de 7,5 MHz (Medison do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) para mensurar a distância da superfície da pele até o centro do TFDS por aspecto visual (Fig. 1), conforme descrito por Maia et al. (2009b).

Para a administração de colagenase, os animais foram sedados com 1 mg/kg de xilazina a 10% (Sedazine, Fort Dodge, Mogi Mirim, SP, Brasil) via intravenosa. Foram realizados antissepsia local e bloqueio dos nervos palmares lateral e medial na região metacárpica proximal, utilizando-se 3 mL de lidocaína a 2% (Cloridrato de lidocaína, Hipolador, Borges Sabará, MG, Brasil), sem vasoconstritor. Após nova antissepsia local, a solução de colagenase foi injetada via intratendínea, guiada pelo ultrassom, utilizando-se agulha hipodérmica de 21 gauge (Becton Dickinson and Company Rutherford, New Jersey, USA).

Após indução da tendinopatia, uma marcação com caneta para pele (Texta Finline 700, Livraria Sol, São Paulo, SP, Brasil) e um ponto de sutura simples separado foram realizados na pele dorsal de cada membro torácico para identificar a altura da lesão localizada na superfície palmar, facilitar o reconhecimento do local de aplicação dos

tratamentos, assim como a obtenção da amostra de tendão durante a biópsia. Em seguida, foi aplicada bandagem compressiva na região metacárpica, que permaneceu por 24 horas. No período compreendido entre a indução da tendinopatia e o tratamento, os animais permaneceram em repouso nas baias.



Fig. 1-Mensuração da distância da superfície da pele até o centro do tendão do músculo flexor digital superficial na imagem ultrassonográfica (corte transversal) antes da indução da tendinopatia.

2.3. Protocolo laboratorial para obtenção do PRP

Baseado no método descrito por Argüelles et al. (2006), algumas modificações foram realizadas para a obtenção do PRP. Para esse propósito, foram coletados 81 mL de sangue de cada animal por punção da veia jugular externa em 18 tubos vacutainer (0,5 mL de anticoagulante e 4,5 mL de sangue total) com 3,8% de citrato de sódio (0,199 mol/L) (Becton Dickinson and Company Rutherford, New Jersey, USA). Além disso, outros 4,5 mL de sangue total foram obtidos em tubo contendo EDTA (Becton Dickinson and Company Rutherford, New Jersey, USA) para determinação da contagem sanguínea de plaquetas, que foi realizada automaticamente (HumaCount plus, Human do Brasil, Recife, PE, Brasil).

As amostras de sangue obtidas com citrato de sódio foram homogeneizadas e centrifugadas a 120 g por cinco minutos. Na sequência, foram descartados 50% da coluna sobrenadante, com o propósito de se usar um plasma com uma concentração de plaquetas maior na segunda centrifugação. Do plasma restante nos 18 tubos, foram coletados 1,1 mL próximo à camada leucocitária, perfazendo um total de 20 mL acondicionados em dois

tubos estéreis de polipropileno sem anticoagulante (Becton Dickinson and Company Rutherford, New Jersey, USA). Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a 240 g por cinco minutos. Após esta segunda centrifugação, o plasma se apresentou dividido em duas frações: o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) e a fração remanescente, denominada plasma rico em plaquetas. Finalmente, um volume de aproximadamente 75% do plasma pobre em plaquetas obtido de cada tubo foi descartado e o restante foi acondicionado em um novo tubo estéril sem anticoagulante, perfazendo um total de 5 mL de PRP. Uma fração foi utilizada para contagem manual de plaquetas (método de Rees e Ecker, 1923), pois a contagem automática seria prejudicada, ou até mesmo impossibilitada, devido à existência de agrupamentos plaquetários no PRP.

2.4. Tratamento

Todos os animais foram tratados por via intralesional cinco dias após a indução da tendinopatia, sendo realizados dois tratamentos: plasma rico em plaquetas (PRP) ou solução salina (NaCl) a 0,9%. Após tricotomia, sedação, determinação da distância da pele até o centro do tendão, bloqueio dos nervos palmares medial e lateral e antisepsia local, foi realizada a aplicação intralesional do PRP ou NaCl a 0,9% (Solução fisiológica sanobiol, Laboratório Sanobiol Ltda, Pouso Alegre, MG, Brasil). Em um dos membros, escolhido aleatoriamente, foi administrado um total de 1,8 mL de PRP, divididos em alíquotas de 0,6 mL, aplicadas com agulhas hipodérmicas de 21 gauge no local da lesão, assim como 0,5 cm proximal e 0,5 cm distal ao sítio de administração da colagenase (Fig. 2). No membro contralateral, foram administradas três alíquotas de 0,6 mL de salina (controle), no mesmo padrão descrito para o PRP. Foi aplicada bandagem compressiva na região metacárpica, que permaneceu por 24 horas. No período compreendido entre o tratamento e as biópsias, os animais ficaram em repouso nas baias. Não foi realizada nenhuma atividade física progressiva controlada, pois as biópsias foram realizadas após três ou 16 dias.

Os animais não foram medicados com anti-inflamatório após indução da tendinopatia, nem após aplicação do PRP ou salina, pois essa substância poderia comprometer a avaliação do tratamento com PRP e interferir nos exames clínico e ultrassonográfico que precederam as biópsias.

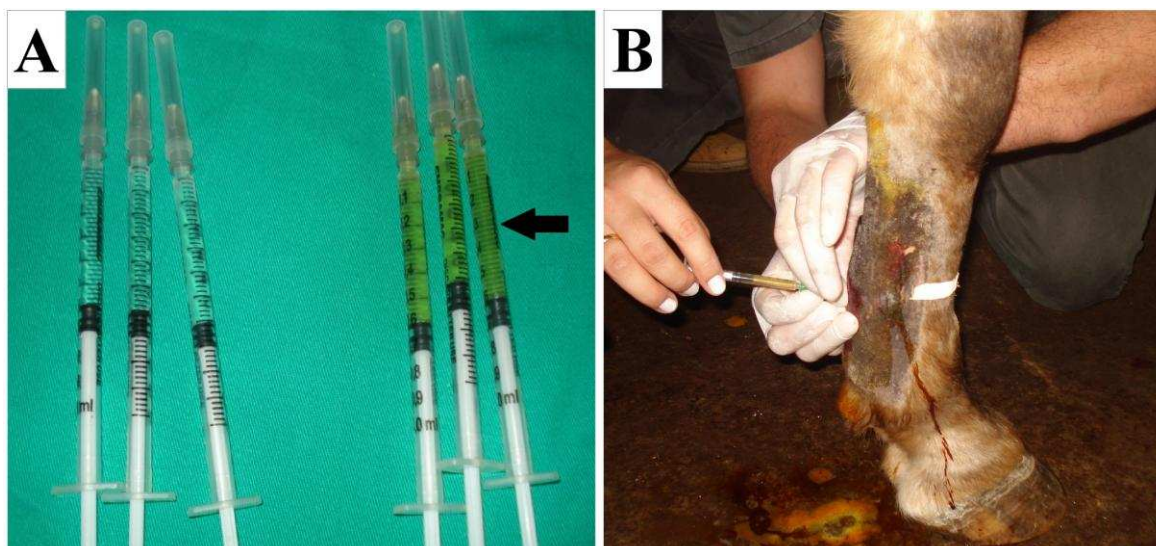


Fig. 2-Seringas contendo NaCl a 0,9% e PRP (seta) (A) para aplicação intralesional (B) em três regiões, distanciadas em 0,5 cm.

2.5. Avaliação clínica e ultrassonográfica

Os animais foram monitorados semanalmente mediante realização de hemograma completo, além da determinação da proteína plasmática total (PPT) e do fibrinogênio. Adicionalmente, foi feito exame físico geral, assim como específico do aparelho locomotor, antes (T0) e após 24 (T1) e 48 (T2) horas da indução da tendinopatia. Também foram examinados antes (T3) e após 24 (T4) e 48 (T5) horas da aplicação de PRP ou salina e, finalmente, foram avaliados semanalmente (T6 e T7) até serem soltos a pasto. O exame físico consistiu de verificação da presença de edema, aumento de temperatura local (Speirs, 1999) e dor à palpação (Redding et al., 1999), classificados como ausente, discreta, moderada ou intensa (Redding et al., 1999; Speirs, 1999), com escores de 0 a 3, respectivamente. O grau de claudicação foi classificado de 0 a 5 (Kester, 1991). Para a confirmação e monitoração da tendinopatia, assim como acompanhamento da resposta ao tratamento, foram avaliados por ultrassonografia: paralelismo das fibras colágenas (Alves et al., 2001), ecogenicidade (Genovese et al., 1986), área transversal do tendão (ATT) e área transversal da lesão (ATL) (Marr et al., 1993; Smith e Webbon, 1994).

2.6. Biópsia

Para a avaliação da reparação tendínea nas fases inflamatória e de proliferação, os tendões de três animais escolhidos por sorteio, foram biopsiados três dias após aplicação do PRP ou da salina. Já nos demais animais a biópsia foi realizada aos 16 dias.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram tricotomizados e submetidos a jejum hídrico e alimentar por 12 horas. Após medicação pré-anestésica com 1 mg/kg de xilazina a 10% por via intravenosa, eles foram anestesiados com a associação de 1 g de tiopental sódico (Tiopentax, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil) com éter gliceril guaiacolato a 10% (EGG, Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil). A anestesia foi mantida com isofluorano (Isoforine, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil).

Com o animal em decúbito lateral esquerdo sobre mesa cirúrgica e antissepsia local, foi realizada incisão cutânea próximo-distal de aproximadamente 3 cm nos planos lateral (membro torácico direito) e medial (membro torácico esquerdo). Após divulsão romba do tecido subcutâneo, abertura do paratendão e exposição do TFDS, foi efetuada avaliação macroscópica das estruturas anatômicas locais, sendo verificada a coloração do TFDS, assim como a ocorrência de aderência, classificada como ausente, discreta, moderada ou intensa (Foland et al., 1992). Uma vez localizada a área da lesão, foi realizada a excisão do TFDS envolvendo toda a sua espessura (Fig. 3), com obtenção de um fragmento com aproximadamente 1 cm³, que foi acondicionado em frasco com solução de formol neutro tamponado a 10% para exames histológico e imunoistoquímico.

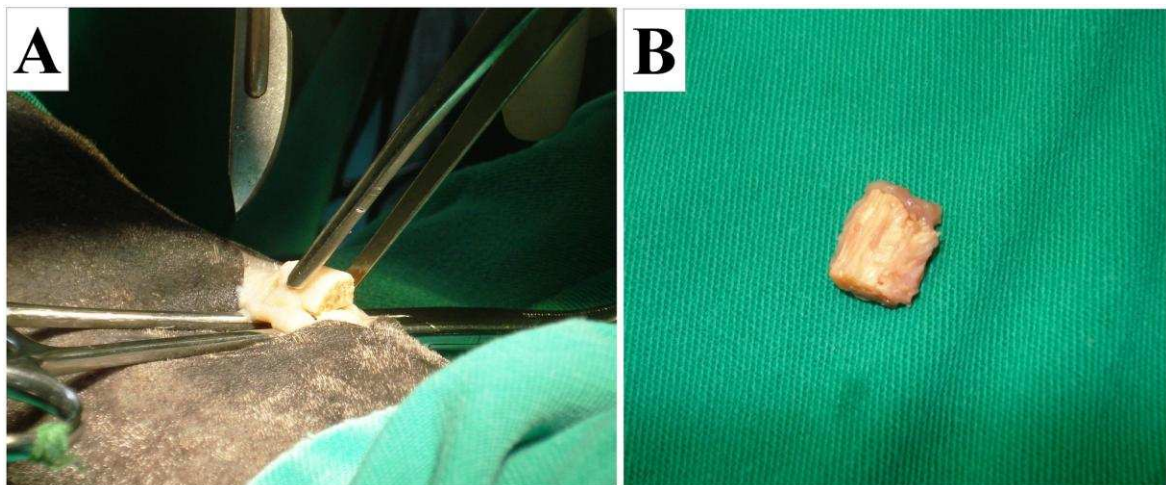


Fig. 3-Remoção de um fragmento do TFDS, envolvendo toda a sua espessura (A). Amostra tendínea removida, medindo aproximadamente 1 cm³ (B).

Após a biópsia, foi realizada tenorrafia utilizando fio poligalactina 910 (Vicryl, Eletro-Light Ltda, Manaus, AM, Brasil) 2-0 no padrão locking-loop modificado, para evitar uma possível ruptura do tendão durante o período pós-operatório (Maia et al.,

2009b). A síntese do tecido subcutâneo foi feita com o mesmo fio no padrão simples contínuo, enquanto a pele foi suturada com náilon 00 (Mononylon, Brasuture Indústria Comércio Importação e Exportação Ltda, São Sebastião da Gama, SP, Brasil) no padrão “U” deitado separado.

Após procedimento cirúrgico, foi aplicada bandagem compressiva na região metacárpica. Durante o período pós-operatório, os animais foram mantidos em baias e tiveram suas feridas limpas com gaze embebida em água corrente e suas bandagens renovadas a cada dois dias até a remoção dos pontos 14 dias após a cirurgia, quando então foram soltos a pasto. Meloxicam (Maxicam gel, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos, SP, Brasil) foi administrado diariamente por via oral, na dose de 0,6 mg/kg, durante sete dias.

2.7. Histologia

O processamento das amostras para histologia seguiu os métodos rotineiros do Laboratório de Histopatologia do DVT-UFV. Os fragmentos colhidos foram fixados em solução de formol neutro tamponado a 10% por quarenta e oito horas, desidratados em concentrações crescentes de álcool (Álcool etílico absoluto, Ricie, São Paulo, SP, Brasil), diafanizados em xilol (Xilol, Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), infiltrados e incluídos em parafina (Parafina histológica 56-58°C, LabSynth, Diadema, SP, Brasil). Cada bloco, representando uma amostra nos planos transversal e longitudinal, foi seccionado em micrótomo (Leica RM 2125RT, Aotec Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) para obter cortes de 4 µm de espessura. Após serem desparafinados, diafanizados e reidratados, os cortes foram corados pelas técnicas hematoxilina-eosina (HE) (Hematoxilina-eosina Easy Path, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda, São Paulo, SP, Brasil), Picrosirius Red (Picrosirius Red Easy Path, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e tricrômico de Masson (Tricrômico de Masson Easy Path, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda, São Paulo, SP, Brasil), segundo as indicações do fabricante. Em seguida, os cortes foram desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula (Precision, Ribeirão Preto, SP, Brail) e meio de montagem rápida (Entellan, Merck, Darmstadt, Germany).

A análise histológica foi conduzida em microscópio de luz (Olympus CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), acoplado à câmera fotográfica (Olympus U-CMAD3 SC20, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), assim como em microscópio de luz polarizada (Olympus BX 50, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), também acoplado à câmera fotográfica (Olympus Q-

Color 3, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), por três avaliadores sem conhecimento sobre os tratamentos aos quais as lâminas pertenciam, conforme realizado por Bosch et al. (2009) e Maia et al. (2009b).

A caracterização celular e organização da matriz tendínea foram determinadas nos fragmentos corados com HE. Para isso, após avaliação e caracterização geral de todo o fragmento tecidual, foram analisadas as características dos fibroblastos (formato do núcleo), a presença de hemorragia, o tipo de infiltrado inflamatório e a organização tecidual (linearidade e ondulação das fibras colágenas), usando os critérios semiquantitativos descritos por Nixon et al. (2008), com algumas modificações. Para cada variável, foi realizada uma análise descritiva e foram estabelecidos valores médios a partir dos escores obtidos pelos três observadores (Tabela 1). Adicionalmente, análise morfométrica foi usada para avaliar quantitativamente a densidade de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo do endotendão, fibras colágenas e fibroblastos [cujas formas foram determinadas segundo Nixon et al. (2008)]. Para isso, em cada amostra, seis fotomicrografias obtidas sob objetiva de 10x foram escolhidas aleatoriamente e colocadas sob uma gradícula com 352 interseções confeccionada pelo programa Power Point (Fig. 4).

A coloração pelo tricrômico de Masson foi usada como auxílio na avaliação da vascularização e organização do tecido conjuntivo, enquanto a de Picrosirius Red foi utilizada para complementar a análise das ondulações das fibras colágenas (paralelismo e organização) e fornecer informações sobre os tipos de colágeno (I e III).

Tabela 1-Sistema de pontuação adotado para as variáveis histológicas avaliadas para classificar a reparação tendínea

Variáveis	Pontuação e critério de avaliação	
Forma dos fibroblastos (corte longitudinal)	1	Linear (normal)
	2	Ligeiramente oval
	3	Moderadamente arredondado
	4	Totalmente arredondado
Hemorragia	1	Ausente
	2	Esparso ou desigual
	3	Múltiplas áreas
	4	Predominantemente hemorrágica
Tipo de infiltrado inflamatório	1	Linfócito
	2	Neutrófilo
	3	Macrófago
	4	Eosinófilo
Linearidade das fibras colágenas	1	Linear
	2	> 50% linear
	3	20 a 50% linear
	4	Sem áreas lineares
Ondulações das fibras colágenas	1	Grosseiras
	2	Predominantemente delgadas
	3	< 50% com formação de ondulações
	4	Sem formação de ondulações; completo desarranjo

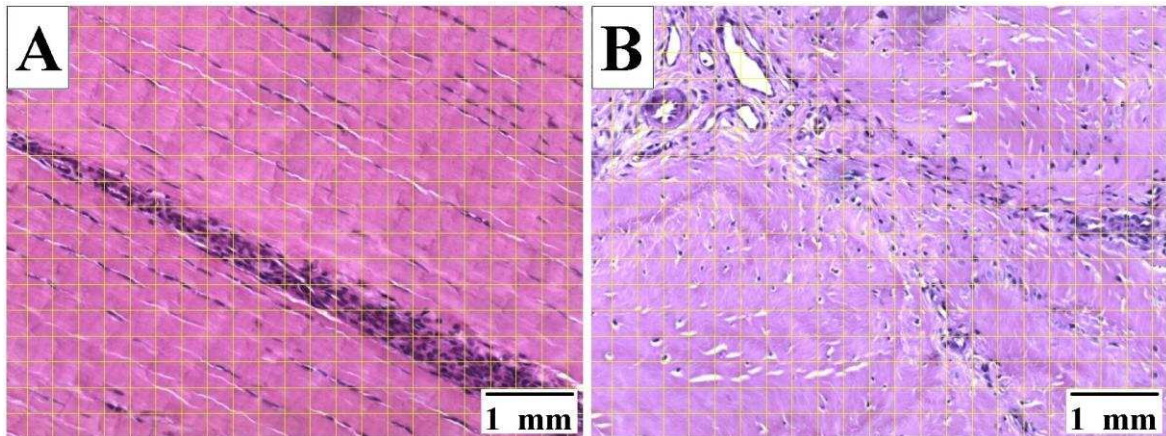


Fig. 4-Fotomicrografias de demonstração do método utilizado para realização da morfometria. Imagens nos corte longitudinal (A) e transversal (B) sob gradícula com 352 interseções (HE).

2.8. Imunoistoquímica

Os blocos previamente preparados para histologia foram cortados com 4 μm de espessura nos planos transversal e longitudinal, para análise da presença de TIMP-1 e TGF- β 1 através da técnica de imunoperoxidase indireta, adaptada de Valente (2007). Após serem colocados em lâminas de vidro previamente preparadas com polilisina (Poly-L-lysine solution, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), esses cortes foram desparafinados, diafanizados e reidratados.

Bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando peróxido de hidrogênio (Peróxido de hidrogênio P.A. 29%, Synth, Diadema, SP, Brasil) em solução metanólica (Álcool Metílico P.A. 90,9%, Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) a 3%. Após lavagens sequenciais em tampão fostato-salina (PBS) pH 7,4, foi realizada a recuperação antigênica com tripsina (Gibco trypsin powder 1:250, Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) (1 mg/mL de PBS pH 7,4).

Posteriormente, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com soro normal de cabra (concentração de 1:10 em PBS pH 7,4), e a marcação com os anticorpos primários anti-TIMP-1 (Rabbit anti-human TIMP-1 polyclonal antibody AB770, Millipore Corporate, Billerica, Massachusetts, USA) e anti-TGF- β 1 (Rabbit anti TFG- β 1, Santa Cruz Biotechnology, Distribuidora Interprise Brazil, São Paulo, SP, Brasil) em lâminas separadas (Fig. 5A).

Após a marcação com o anticorpo secundário (Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated AP 132P, Millipore Corporate, Billerica, Massachusetts, USA) (Fig. 5B), foi

feita a revelação com solução de diaminobenzidina (3-3' Diaminobenzidina 99%, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e peróxido de hidrogênio e PBS pH 7,4. Finalmente, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina na diluição 1:9 (Hematoxilina de Harris Easy Path, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda, São Paulo, SP, Brasil), desidratação, diafanização e montagem da lâmina com meio de montagem rápida (Entellan, Merck, Darmstadt, Germany).

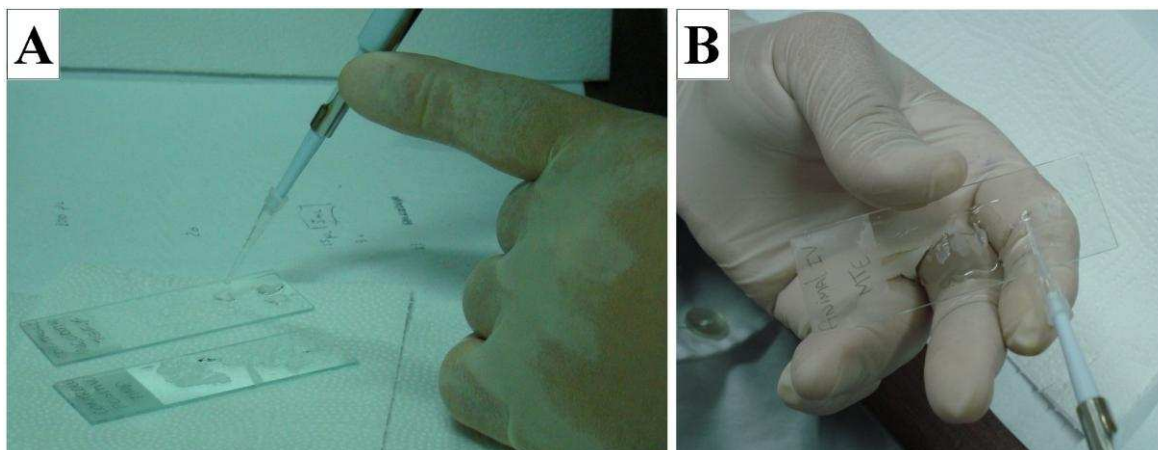


Fig. 5-Adição dos anticorpos primários anti-TIMP-1 e anti-TGF- β 1 em lâminas separadas, com a solução cobrindo todo o corte de tecido (A) e marcação com anticorpo secundário (B).

Os controles positivo e negativo da técnica foram realizados em TFDS coletado de equino sem quadro de tendinopatia, conforme descrito por Nixon et al. (2008). Para o controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos pelo mesmo volume de PBS pH 7,4, sendo o restante do processamento seguido como previamente mencionado. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica (Digi-pro 5.0M, Nikon, Tokyo, Japan), observando-se presença ou ausência da marcação de células.

2.9. Análise Estatística

Foi realizado um experimento em parcelas subdivididas, com seis animais (parcelas) que foram avaliados, aleatoriamente, durante as fases inflamatória (três dias após tratamentos) e de proliferação (dezesseis dias após tratamentos) dias após o tratamento, sob o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para cada animal, a escolha do tratamento por membro foi feita ao acaso. Para as variáveis hematológicas (hematócrito,

hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais e plaquetas) e bioquímicas (PPT e fibrinogênio), foi realizada análise descritiva com média e desvio-padrão.

Os dados referentes às variáveis físicas (edema, aumento de temperatura local e dor à palpação) foram avaliados por meio da análise de variância a 5% de probabilidade, estudado através de variável dummy (tratados com PRP=1, tratados com salina=0). Foram construídos gráficos de linhas das características avaliadas na ultrassonografia (ATT, ATL, ecogenicidade da lesão e paralelismo das fibras colágenas) ao longo do tempo.

Os resultados obtidos na histologia, morfometria e imunoistoquímica (escores e porcentagens) foram submetidos ao teste F da análise de variância a 5% de probabilidade para verificar o efeito do tratamento (PRP ou NaCl a 0,9%) e das fases de reparação (inflamatória e de proliferação/fibroplasia), além da interação entre eles. Adicionalmente, foi realizada a análise de correlação entre as variáveis verificadas na morfometria, com nível de significância de até 10%. As análises foram conduzidas no software Minitab versão 16, 2010 (<http://www.minitab.com/products/minitab>, State College, PA).

3. Resultados

3.1. Plasma rico em plaquetas

A quantidade de plaquetas no sangue total usado para preparar o PRP variou entre 149.000 e 177.000 (164.500 ± 9.813) células/mm³. No PRP, a concentração variou entre 320.000 e 430.000 (368.333 ± 39.707) células/mm³. Nenhuma complicação associada à aplicação intralesional do PRP foi observada.

3.2. Avaliação clínica e ultrassonográfica

Os valores obtidos nas variáveis hematológicas e bioquímicas avaliadas durante o experimento estão descritas nas Tabela 2.

Tabela 2-Médias e desvios-padrão das variáveis hematológicas e bioquímicas avaliadas durante o período experimental

Tempo	0	1	2	3	4	5
Hematócrito (%)	33,3±4,7	34,6±3,2	33,2±6,1	32,6±6,5	32, 7±3,9	29,73±6,2
Hemoglobina (g/mm³)	11,5±1,6	12,2±1,1	11,4±1,9	11,4±2,0	11,5±1,3	10,4±2,1
Eritrócitos (10⁶ células/mm³)	7,2±1,2	7,8±1,0	7,2±1,5	7,3±1,5	7,2±1,2	6,9±1,3
Leucócitos Totais (células/mm³)	8.633±1.880	7.733±1.686	6.383±2.055	6.733±1.944	6.367±1.193	5.633±1.776
Plaquetas (células/mm³)	183.667±57.225	129.667±41.176	164.167±15.145	163.833±12.838	164.000±21.260	150.500±17444
PPT (g/mm³)	8,0±0,8	8,1±0,6	7,6±0,5	8,2±0,4	7,8±0,6	7,6±0,5
Fibrinogênio (g/mm³)	0,5±0,2	0,6±0,2	0,4±0,1	0,5±0,2	0,5±0,1	0,5±0,2

Tempos: 0=três dias antes da indução da tendinopatia; 1=dois dias depois da indução da tendinopatia; 2=um dia antes dos tratamentos; 3=uma semana após os tratamentos; 4=duas semanas após os tratamentos; 5=três semanas após os tratamentos. PPT=proteína plasmática total. Valores apresentados na forma de média±desvio-padrão.

Nas 48 horas após administração da collagenase no TFDS de ambos os membros torácicos, os animais desenvolveram inflamação aguda, caracterizada pela presença de edema intenso (escore 3), dor à palpação (ausente a intensa) e aumento de temperatura local (discreto a intenso). Claudicação (graus 1 a 2) foi observada em apenas dois animais, estando totalmente ausente antes do tratamento. Nas 48 horas após aplicação do PRP ou NaCl a 0,9%, foi observado edema (discreto a intenso), dor à palpação (ausente a intensa), aumento de temperatura local (ausente a discreto) e claudicação (grau 1) presente em apenas um animal. Não houve diferença entre os tratamentos no que se refere às variáveis avaliadas durante o exame físico.

Avaliações clínicas adicionais foram realizadas em apenas três animais, já que os demais já haviam sido biopsiados. Edema (discreto a intenso) esteve presente até o momento da cirurgia, realizada 16 dias após o tratamento (fase de proliferação). Dor à palpação (inicialmente intensa, reduzindo para discreta) permaneceu em dois animais até uma semana antes do procedimento cirúrgico, enquanto claudicação esteve ausente em todos os equinos. Nenhum deles apresentou aumento de temperatura local. Informações adicionais podem ser obtidas no Apêndice 2.

Poucas alterações foram observadas nas avaliações ultrassonográficas realizadas 24 horas após aplicação da collagenase. Essas alterações se caracterizavam pela perda parcial de paralelismo das fibras colágenas observada em 8 membros (66,67%) e redução do padrão isoecóico em 25% (83,33%) e 50% (16,67%). No exame realizado 48 horas após a indução da tendinopatia, foram observados perda parcial do paralelismo das fibras colágenas (paralelismo parcial), redução da ecogenicidade entre 25% a 75%, e edema peritendíneo.

Após a administração do PRP ou da salina, as imagens obtidas com 24 h revelaram que o TFDS de quatro (33,33%) membros apresentou adequado paralelismo (paralelismo total), estando o restante (66,67%) com perda parcial. Ocorreu redução de 25% (83,33%) a 75% (16,67%) do padrão isoecóico, e edema peritendíneo em cinco membros (41,67%). Nas imagens obtidas com 48 horas após os tratamentos, foi possível observar perda parcial do paralelismo em todos os membros e redução de 75%, 50% ou 25% do padrão isoecóico em um (8,33%), oito (66,67%) e três membros (25,00%), respectivamente. A evolução, ao longo do tempo, das variáveis avaliadas por ultrassonografia está demonstrada na Fig. 6. Informações adicionais estão disponíveis no Apêndice 3.

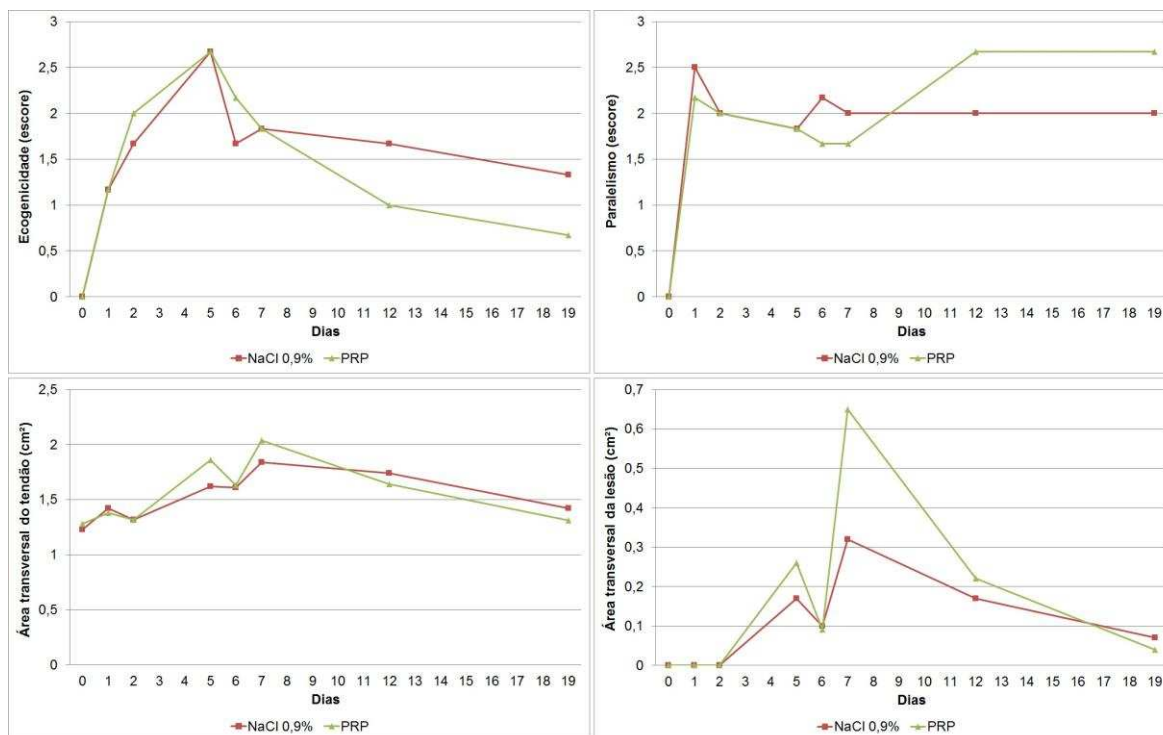


Fig. 6-Evolução dos valores médios obtidos na ecogenicidade, paralelismo e áreas transversais do tendão e da lesão avaliados por ultrassonografia ao longo do tempo. Os dias 0, 1 e 2 foram os ultrassons realizados imediatamente antes da indução da tendinopatia, assim como 24 e 48 horas após a mesma, respectivamente. Os dias 5, 6 e 7 representam os tempos anteriormente mencionados, mas nesse caso com relação ao tratamento. Os dias 12 e 19 correspondem as avaliações adicionais realizadas em apenas três animais, com 1 e 2 semanas após o tratamento, respectivamente.

3.3. Biópsia

Na avaliação macroscópica realizada durante as biópsias, nenhum membro apresentou sinal de infecção. Formação de aderências entre o TFDS e o peritendão ou tendão do músculo flexor digital profundo (TFDP) esteve presente em todos os membros, independentemente do tratamento. A intensidade variou de discreta a moderada na fase inflamatória, e de moderada a intensa na fase de proliferação. A exceção de um tendão tratado com PRP, os demais apresentaram, em ambas as fases, coloração avermelhada.

Nas 48 horas após a biópsia, foram observados edema, dor à palpação e aumento de temperatura local de gravidade intensa, além de claudicação (graus 3 a 4). Nas avaliações semanais subseqüentes, ocorreu redução gradual na severidade dessas variáveis clínicas. Três semanas após o procedimento cirúrgico, os animais estavam pastando livremente, sem claudicação, dor ou aumento de temperatura local.

3.4. Histologia

Na observação histológica geral das lâminas coradas com HE e tricrômico de Masson foi possível distinguir as regiões das lesões em ambos os membros torácicos, que se diferenciaram em tamanho e características, dependendo da fase inflamatória ou de proliferação. Não foram observadas áreas acelulares.

Nos tendões dos animais biopsiados três dias após o tratamento (fase inflamatória), a área da lesão estava preenchida por tecido conjuntivo denso (Fig. 7A,B), com fibras colágenas discretamente esparsas, e grande número de fibroblastos lineares e arredondados (ao redor do endotendão e dispersos na matriz tendínea). Foi observada perda da organização e do paralelismo das células, e afinidade tintorial diferenciada (corado em maior intensidade por hematoxilina, indicando maior presença de núcleos), além de espessamento e neovascularização acentuada do endotendão. Essa área lesionada foi maior no membro tratado com NaCl a 0,9% de um animal (33,33%) e semelhante entre ambos os membros nos demais equinos (66,67%). A exceção de dois tendões tratados com PRP, que apresentaram infiltrado eosinofílico intenso, todos os demais apresentaram discreto infiltrado inflamatório do tipo misto (66,67%). Não foram observados focos hemorrágicos.

Na biópsia realizada 16 dias após o tratamento (fase de proliferação/fibroplasia), a área da lesão estava preenchida por tecido conjuntivo denso (Fig. 7C,D) com fibras colágenas moderadamente esparsas, intensa neovascularização e grande quantidade de células blásticas (fibroblastos arredondados), principalmente ao redor do endotendão. Embora houvesse desorganização e falta de paralelismo das fibras colágenas e fibroblastos, era nítida a tendência desse tecido em se organizar, sendo observadas regiões de diferenciação tecidual dentro da área da lesão, que foi maior em apenas duas amostras, sendo uma no TFDS tratado com PRP e a outra com NaCl a 0,9%. Diferentemente da solução salina, nos tendões tratados com PRP foi observado aumento da vascularização e cordões celulares de fibroblastos com forma arredondada, mas ainda sem reparo tecidual. Da mesma forma que na fase inflamatória, o infiltrado do tipo misto prevaleceu (83,33%), e apenas um membro tratado com PRP apresentou infiltrado eosinofílico (16,67%).

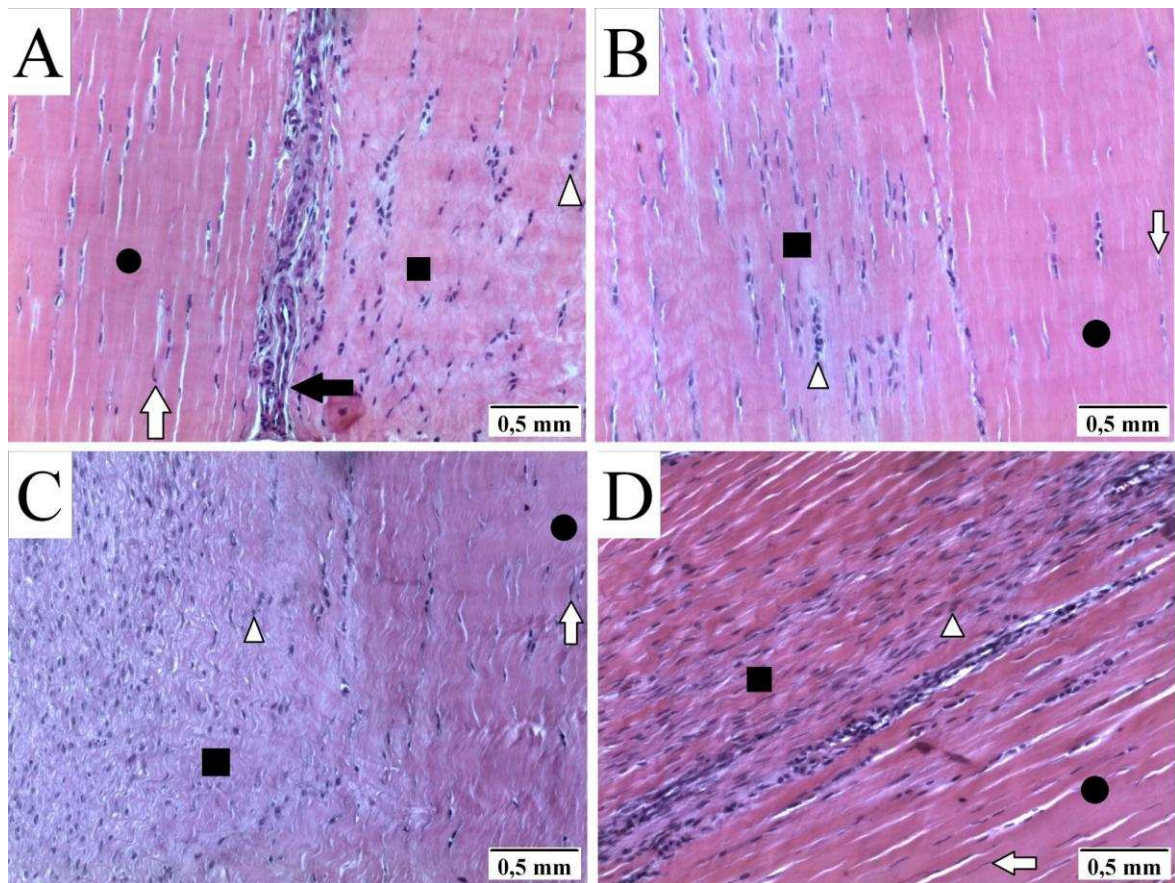


Fig. 7-Fotomicrografias de corte longitudinal (HE). TFDS biopsiado nas fases inflamatória (A,B) e de proliferação (C,D), após infiltração do PRP (A,C) ou salina (B,D). Observa-se tecido conjuntivo denso normal (círculo) com fibroblastos alongados (seta branca) e a área da lesão (quadrado), com maior densidade de fibroblastos, cujos núcleos apresentam formatos alongados ou arredondados (cabeça de seta). Intensa neovascularização (seta preta) pode ser observada no endotendão.

Também foi observada metaplasia condróide focal (83,33%), caracterizada por presença de células morfologicamente semelhantes à condrócitos (Fig. 8A), com tamanhos diferentes, independentemente se o membro foi tratado com PRP ou salina. Adicionalmente, em três membros tratados com NaCl a 0,9% (25,00%), foi observado atividade miofibroblástica, sendo um na fase inflamatória e os demais na de proliferação/fibroplasia (Fig. 8B).

Os valores médios de pontuação obtida pelos três observadores, na análise semiquantitativa das variáveis histológicas analisadas, para classificação da reparação tendínea (fases inflamatória e de proliferação) estão demonstrados na Tabela 3. Não houve

diferença entre as médias dos tratamentos e nem entre as fases do processo de reparação, como também ausência de interação entre eles.

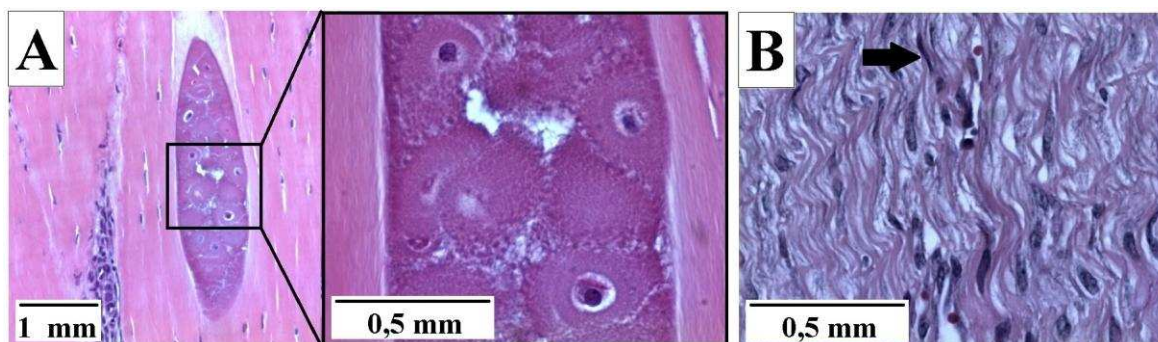


Fig. 8-Fotomicrografia de corte longitudinal (HE). TFDS tratado com PRP biopsiado na fase inflamatória com presença de metaplasia condróide focal (A). TFDS tratado com NaCl a 0,9% biopsiado na fase de proliferação/fibroplasia com detalhe da atividade miofibroblástica (seta), observada em área de proliferação tecidual(B).

Tabela 3-Médias da pontuação obtida em escores, referentes às variáveis histológicas avaliadas para classificação da reparação tendínea nas fases inflamatória e de proliferação

Fase	Forma dos fibroblastos		Hemorragia		Tipo de infiltrado inflamatório		Linearidade das fibras colágenas		Ondulações das fibras colágenas	
	PRP	NaCl	PRP	NaCl	PRP	NaCl	PRP	NaCl	PRP	NaCl
Inflamatória	1,6	1,6	1,0	1,0	2,2	1,5	1,6	1,8	2,8	2,5
Proliferação	1,6	1,1	1,1	1,1	2,3	1,8	2,1	1,2	2,3	2,6

Durante a realização da morfometria, foi observada uma grande variação entre as secções histológicas de uma mesma amostra, no que diz respeito à proporção de tecido tendíneo normal e com lesão. Os valores obtidos para as variáveis avaliadas na morfometria, nos cortes longitudinal e transversal, estão descritos nos Apêndices 4 e 5, respectivamente. Para a morfometria realizada nas imagens obtidas nos planos longitudinal e transversal, onde foram quantificados tenócitos (linear/normal, ligeiramente oval, moderadamente arredondado e totalmente arredondado), vaso sanguíneo e tecido conjuntivo do endotendão, infiltrado inflamatório e fibras colágenas, não houve diferença entre PRP e NaCl a 0,9% e entre as fases (inflamatória e de proliferação). Apenas no corte longitudinal, a fibra colágena se relacionou negativamente com fibroblasto ligeiramente

oval ($r = - 0,90$) e moderadamente arredondado ($r = - 0,95$), que se correlacionaram positivamente entre si ($r = - 0,90$).

Tanto nos tendões tratados com PRP quanto com NaCl a 0,9%, a avaliação descritiva geral do tecido corado pela técnica de Picrosirius Red permitiu a identificação da região da lesão, caracterizada por áreas menos organizadas e com grande quantidade de fibras colágenas do tipo III entremeadas às fibras do tipo I (Fig. 9). Essas lesões foram mais extensas, e apresentaram maior desorganização tecidual e quantidade de colágeno tipo III, nas amostras obtidas na fase de proliferação. Por outro lado, áreas em processo de organização, com grande quantidade de colágeno do tipo I, foram especialmente observadas nos tendões tratados com PRP, que também apresentaram feixes de fibras com melhor orientação.

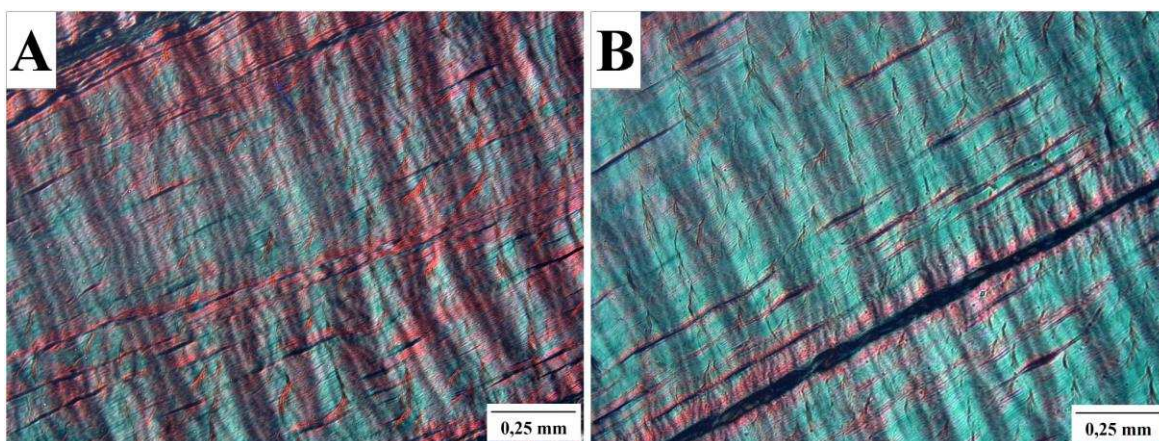


Fig. 9- Fotomicrografias de corte longitudinal do TFDS biopsiado na fase de proliferação (Picrosirius Red). Tecido tendíneo sadio (A), e do local da lesão (B) após tratamento com PRP. Observa-se a presença de colágeno tipo I (cor vermelha) e tipo III (cor verde). O tecido de reparação apresenta fibras desorganizadas e com maior proporção de fibras colágenas do tipo III.

3.5. Imunoistoquímica

Na Fig. 10 é apresentado alguns dos resultados obtidos na imunoistoquímica. A marcação do TFDS tratado com PRP ou NaCl a 0,9% para TGF- β 1 foi negativa em ambas as fases. Já para o TIMP-1, a marcação foi positiva em um (33,33%) membro tratado com PRP e dois (66,67%) com salina, na fase inflamatória. Na fase de proliferação/fibroplasia a marcação para TIMP-1 ocorreu em um (33,33%) TFDS tratado com PRP e outro (33,33%) com salina. As células marcadas com TIMP-1 tinham núcleos grandes e arredondados, e se

concentravam no endotendão, não havendo diferença entre os tratamentos, nem entre as fases da reparação tendínea avaliadas e nem interação entre eles.

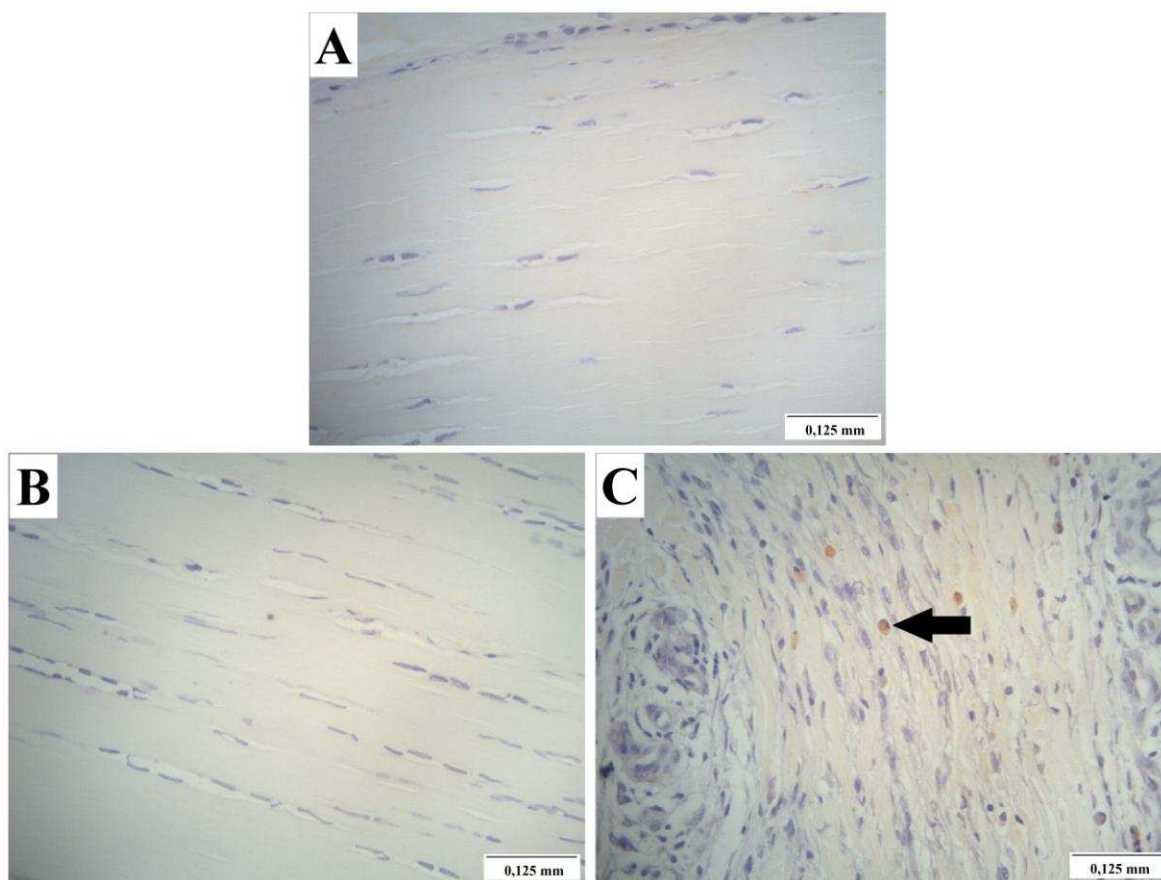


Fig. 10-Fotomicrografias de corte longitudinal de tendões tratados com PRP, com ausência de marcação para TGF- β 1 (A) e TIMP-1 (B), caracterizada pela presença de apenas células com núcleos arroxeados, corados pela Hematoxilina de Harris. Demonstração da marcação positiva para TIMP-1 em tendão tratado com PRP (C), onde se observa a presença de células positivas com citoplasma corado de marrom escuro (seta).

4. Discussão e conclusão

As alterações referentes às variáveis avaliadas nos exames físico (edema, aumento de temperatura local e dor à palpação) e ultrassonográfico (ecogenicidade, paralelismo e áreas transversais do tendão e da lesão), após a indução da tendinopatia pela administração da colagenase, foram semelhantes às relatadas por outros autores (Williams et al., 1984; Spurlock et al., 1989; Alves et al., 2001; Fernandes et al., 2003; Marxen et al., 2003, 2004; Barreira, 2005; Dahlgren et al., 2005; Sharma e Maffulli, 2005; Nixon et al., 2008; Maia et al., 2009a,b), sendo a dose de 2.090 unidades de digestão tecidual de colagenase, suficiente

para mimetizar o quadro de ocorrência natural no tendão do músculo flexor digital superficial. Edema, aumento da temperatura local e dor à palpação ocorreram em ambos os membros após os tratamentos (PRP ou NaCl a 0,9%) sem diferença entre eles, como também observado por Bosch et al. (2009) após 23 semanas da aplicação intralesional dessas substâncias no TFDS lesionado cirurgicamente. Esses achados físicos indicam uma reagudização do quadro, decorrente do desenvolvimento de um novo foco de inflamação, possivelmente devido à destruição mecânica das fibras colágenas imaturas ou previamente danificadas pela colagenase administrada para a indução da tendinopatia (Maia et al., 2009b). O mesmo foi relatado no TFDS de equinos com lesão tendínea induzida experimentalmente com colagenase, infiltrado via intralesional com PRP (Maia et al., 2009a,b), glicosaminoglicanos polissulfatados (Marxen et al., 2004), solução salina (Marxen et al., 2004; Maia et al., 2009a,b) ou células mesenquimais da fração mononuclear da medula óssea (Barreira, 2005). A redução da intensidade das variáveis avaliadas nas duas semanas subsequentes ao tratamento também foi relatada por Maia et al. (2009a) e se deve à redução do processo inflamatório local.

A concentração de plaquetas presentes no PRP (320.000 a 430.000 células/mm³) foi considerada adequada, sendo maior do que a quantidade mínima (300.000 células/mm³) recomendada por Anitua et al. (2004), superior a obtida em alguns estudos realizados em equinos (Carmona et al., 2007; Schnabel et al., 2007; Argüelles et al., 2008), e semelhante a encontrada por Maia et al. (2009b).

Os valores das variáveis hematológicas e bioquímicas avaliadas durante o experimento estiveram dentro dos limites de referência para a espécie equina (Kaneko et al., 2008; Grondin e Dewitt, 2010). A diminuição dos leucócitos totais no tempo 1, em relação ao tempo 0 (antes da indução da tendinopatia), indica uma possível migração dessas células para o local da injúria.

Nas avaliações ultrassonográficas realizadas após aplicação da colagenase, o edema peritendíneo, o aumento na ATT e na ATL, a perda de paralelismo e a redução da ecogenicidade sugerem um efeito progressivo, característico da atividade dessa enzima. Sabe-se que a colagenase é uma enzima bacteriana que atua em múltiplos locais ao longo da triple hélice do colágeno, liberando tropocolágeno (Dahlgren et al., 2005), além de promover destruição de células e matriz não-colágena, com consequente ruptura das fibras (Spurlock et al., 1989; Foland et al., 1992). Achados semelhantes foram observados em outros estudos após aplicação intratendínea de colagenase (Alves et al., 2001; Dahlgren et al., 2005; Marxen et al., 2004; Maia et al., 2009a,b). Segundo Marr et al. (1993), a redução

da ecogenicidade é resultante principalmente de hemorragia intratendínea, separação de fibras e edema, que são alguns dos resultados da ação da colagenase.

O curto período compreendido entre a aplicação dos tratamentos e a realização das biópsias para exames histológico e imunoistoquímico não foi suficiente para monitorar a evolução das variáveis ultrassonográficas estudadas (ecogenicidade, paralelismo e áreas transversais do tendão e da lesão). O mesmo ocorreu no experimento realizado por Barreira (2005), ao avaliar por ultrassonografia o TFDS de seis equinos com tendinite induzida por colagenase, e tratados ou não após 12 dias com células mesenquimais da fração mononuclear da medula óssea por um período de 48 dias.

A ausência de complicações associadas à aplicação intralesional do PRP também foi relatada por outros autores que estudaram esse método terapêutico (Waselau et al., 2008; Cole et al., 2010). A falta de sinal de infecção peritendínea, como a exsudação purulenta, indica que não houve contaminação durante a aplicação de colagenase, PRP ou salina, ou mesmo nos procedimentos de preparação do PRP, fato também descrito por Maia (2008) em TFDS de equinos biopsiados 36 dias após aplicação intralesional de PRP ou salina em lesões induzidas com colagenase (1 mL, 2,5 mg/mL). A ausência de infecção também foi relatada em tendão por Barreira (2005) em biópsias realizadas 48 dias após indução de tendinite por colagenase (0,5 mL, 2,5 mg/mL), e 36 dias após implante ou não de células da fração mononuclear da medula óssea no local da lesão.

A coloração avermelhada no TFDS e estruturas anatômicas adjacentes, independente do tratamento, é resultante da ocorrência de hemorragia, também observada por Nixon et al. (2008), sem diferença de coloração entre os membros infiltrados com tampão PBS ou células mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Adicionalmente, a adesão do TFDS ao peritendão, observada durante os procedimentos cirúrgicos também foi relatada em pôneis 60 dias após indução de tendinite do TFDS com colagenase (Williams et al., 1984). Esse achado também foi relatado em equinos por Maia et al. (2009b), Foland et al. (1992) e Marxen et al. (2003; 2004), com 48, 84 e 150 dias, respectivamente, após a indução da lesão.

Aderência entre o TFDS e o tendão do músculo digital profundo (TFDP), presente em todos os membros, independente do tratamento, foi um achado observado por Foland et al. (1992) e Maia et al. (2009b) em equinos que receberam hialuronato de sódio e PRP, respectivamente, após lesão tendínea induzida por colagenase, não havendo diferença entre os tendões tratados e o controle. Segundo Foland et al. (1992) essa aderência, que não é desejável, pode resultar do crescimento desordenado e excessivo do tecido de granulação.

Adicionalmente, pode ser decorrente da estimulação da proliferação e migração extrínseca de fibroblastos do peritendão, que contribuem tanto para a síntese do novo tecido tendíneo quanto para a formação de aderência deste com os tecidos adjacentes (Marxen et al., 2003). Adicionalmente, a aderência pode ocorrer quando há rompimento da bainha sinovial, permitindo que os tenócitos do tecido adjacente invadam o local de reparação (Sharma e Maffulli, 2005). Entretanto, esse fato não deve ter influenciado a ocorrência desse achado no presente estudo, já que não existe bainha sinovial na região metacárpica do TFDS onde foi realizada a lesão e a administração do PRP ou salina. Essas aderências entre os tendões são sempre dolorosas (Fortier, 2005) e podem ser um fator limitante para a carreira atlética do equino com tendinite na região palmar do TFDS, pois restringe o movimento desse tendão (Rantanen, 2008). É possível que esse achado não ocorresse se os animais tivessem sido submetidos à atividade física controlada. De acordo com Fortier (2005), aderência pode ser prevenida em equinos submetidos a procedimento cirúrgico, se exercitados ao passo, a partir de um a dois dias após a cirurgia. Por outro lado, apesar de adotar atividade física controlada, Maia et al. (2009b) relataram a ocorrência de aderência entre o TFDS e peritendão tanto nos membros infiltrados com PRP (16,67%), quanto com NaCl a 0,9% (33,33%), assim como entre TFDS e TFDP em um membro infiltrado com salina (8,33%).

As colorações utilizadas para verificar o processo de reparação do TFDS permitiram uma análise satisfatória das variáveis. A avaliação histológica referente às fases inflamatória e de proliferação tendínea revelou, independente do tratamento realizado, um processo cicatricial desordenado, com desorganização e neovascularização no endotendão, hiper celularidade fibroblástica e presença de poucas células inflamatórias. A análise de correlação demonstrou que quanto menor a quantidade de fibras colágenas, maior foi a de tenócitos, infiltrado inflamatório e de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo do endotendão, características compatíveis com um tendão com proliferação tecidual típica do processo de reparação. Adicionalmente, revelou que quanto mais vasos sanguíneos e tecido conjuntivo no endotendão, maior foi a quantidade de fibroblastos e infiltrado inflamatório, o que reforça a presença de um tecido tendíneo em reparo. A intensa neovascularização deve ser resultante do acentuado estímulo à angiogênese, possivelmente decorrente da ação de fatores de crescimento com efeito angiogênico, possíveis de ser encontrados no PRP, como o TGF- β 1 (O'Kane e Ferguson, 1997; Werner e Grose, 2003), mas também os fatores de crescimento epidermal (EGF), semelhante a insulina (IGF) (Werner e Grose, 2003), e o vascular endotelial (VEGF) (Marsolais e Frenette, 2005). Quadro semelhante foi relatado

por Dahlgren et al. (2005) no TFDS de equinos necropsiados semanalmente após indução de tendinite com 2.097 unidades de digestão tecidual de colagenase, não submetida a tratamento. Esses autores observaram aumento gradual na celularidade e mudança na morfologia celular de tenócitos arredondados (1 e 2 semanas) para lineares (8 e 24 semanas), além de endotendão mais espessado devido ao acúmulo de vasos e elementos celulares, principalmente no centro das lesões e na área imediatamente ao seu redor.

As características histológicas observadas na biopsia realizada três dias após o tratamento com PRP ou salina, revelou que o processo cicatricial se encontrava na categoria tecido de granulação inicial, descrita por van Schie et al. (2003), que estudaram TFDS com lesão aguda de ocorrência natural. Segundo os autores, esse tipo tecidual é constituído principalmente por grande número de fibroblastos arredondados, infiltrado inflamatório mononuclear, vasto número de proliferações vasculares, e ausência de distribuição regular de células ou de arranjo longitudinal dos elementos fibrilares. Já o tecido tendíneo obtido 16 dias após os tratamentos, é semelhante ao tecido de granulação avançado relatado pelos mesmos autores em TFDS de equino com lesão espontânea em fase subaguda, caracterizado pela presença de fibroblastos arredondados, componentes fibrilares com padrão de ondulação irregular e espessura variável e incompleta organização em feixes, além de aumento da vascularização nos septos.

A observação, em ambas as fases e ambos os tratamentos, de fibroblastos arredondados próximos ao endotendão hipertrofiado e com intensa neovascularização, indica uma migração extrínseca de fibroblastos, enquanto aqueles dispersos na matriz tendínea ou em forma de cordões celulares remetem uma proliferação intrínseca, sendo ambos responsáveis pelo aumento da celularidade. Segundo Manske e Lesker (1984), a reparação tendínea pode ocorrer de forma intrínseca, através da proliferação de fibroblastos do endo e do epitendão ou extrínseca, pela invasão de células via hematógena ou dos tecidos circunvizinhos, principalmente do peritendão. O aumento da densidade fibroblástica já havia sido relatado não apenas em tendinopatia tratada com PRP (Bosch et al., 2009; Maia et al., 2009b), mas também com hialuronato de sódio (Foland et al., 1992), ultrassom terapêutico (Fernandes et al., 2003), laser terapia (Machado et al., 2000) e ondas de choque (Chen et al., 2004). Entretanto, o mesmo ocorre em tendões infiltrados com salina (Foland et al., 1992; Maia et al., 2009b), o que corrobora os achados obtidos na análise morfométrica realizada no presente estudo, que não revelou diferença entre os tratamentos. Por outro lado, Bosch et al. (2009) observaram que tendões tratados com PRP apresentaram maior atividade metabólica em relação ao controle, devido ao aumento da

celularidade e da vascularização. Na opinião desses autores, o principal efeito do PRP no processo de reparação da lesão tendínea é um efeito tardio sobre a proliferação e migração celular, e, conseqüentemente, a atividade metabólica geral.

A ausência de diferença entre o tratamento com PRP e a salina no que se refere a organização tecidual do TFDS também foi relatada por Maia et al. (2009b) em biópsias do TFDS, realizadas 48 dias após tendinopatia induzida por colagenase, tratada com 2,5 mL de PRP, 12 dias após aplicação da enzima. Essa semelhança histológica, não implica, necessariamente, que os tecidos que receberam PRP e salina sejam iguais. Bosch et al. (2009) observaram melhor organização da rede de colágeno no TFDS biopsiado 23 semanas após infiltração com dose única de 3 mL de PRP ou salina na lesão induzida cirurgicamente no centro do tendão. Apesar de não encontrarem diferença histológica entre os tratamentos no que diz respeito ao padrão geral do tecido, esses autores relataram melhor resposta das variáveis bioquímicas (quantificação de fatores de crescimento PDGF-BB, TGF- β e IGF-1, glicosaminoglicanos sulfatados, DNA, colágeno e ligações cruzadas) e biomecânicas (elasticidade e força máxima necessária para a ruptura tendínea) avaliadas, no membro tratado com o componente rico em plaquetas.

Smith et al. (2006) observaram efeito anabólico nos fibroblastos do ligamento suspensório de equinos sadios, quando PRP foi adicionado em culturas in vitro. Adicionalmente, vários estudos demonstraram que o PRP influencia o reparo de tendão em cães (Murray et al., 2006), suínos (Murray et al., 2007) e ratos (Kajikawa et al., 2008). Em pacientes humanos, a administração de PRP para tratamento de tendinose crônica do “cotovelo” (Mishra e Palveko, 2006) e como auxílio na reconstituição cirúrgica do tendão calcâneo comum (Sánchez et al., 2007), resultou em redução da dor e mais rápido retorno ao treinamento, respectivamente. Por outro lado, estudo recentemente realizado por de Vos et al. (2010) revelou que a administração de PRP não resultou em maior melhoria da dor e da atividade física, em portadores de tendinopatia crônica do tendão calcâneo comum, quando comparado com o grupo que recebeu solução salina.

Esses resultados controversos corroboram a afirmativa de que o processo de reparação tendínea representa um paradigma interessante para a ciência médica, tanto veterinária quanto humana, pois embora a maioria dos tendões tenha capacidade de cicatrizar espontaneamente após uma lesão, o tecido formado é quase sempre mecanicamente pior e, portanto, menos capaz de desempenhar as funções de um tendão normal, sendo também mais suscetível a recidivas (Mast, 1997; Molloy et al., 2003; Smith et al., 2006). Nesse sentido, existe uma busca contínua do desenvolvimento de um

tratamento que promova a regeneração ou síntese de novo, ou seja, aumento ou modulação do processo normal de reparação tendínea, de forma a evitar a formação de tecido cicatricial fibroso, característico da cicatriz (Smith et al., 2006). É possível que resultados histológicos diferentes aos obtidos no presente estudo possam ser observados se os animais forem submetidos à atividade física progressiva, como observado por Bosch et al. (2009), em equinos submetidos a exercício controlado, a partir da terceira semana após tratamento do TFDS com PRP.

A neovascularização observada no endotendão de ambos os tratamentos, cuja intensidade foi maior nas áreas da lesão, é um achado importante, pois indica estímulo local à angiogênese e pode favorecer a reparação tendínea. Em tendões bem vascularizados, o tecido pode se recuperar rapidamente, mas naqueles que são hipo ou avasculares, o processo de reparação é mais demorado, aumentando as chances de que uma força prejudicial seja aplicada e ocorra uma nova injúria (Pufe et al., 2005). O padrão da neovascularização observado no presente estudo corrobora os achados de Maia et al. (2009b). Embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre PRP e salina em relação à vascularização, as vantagens do efeito angiogênico do PRP via intralesional já haviam sido relatadas no ligamento cruzado cranial de cães (Murray et al., 2006), no tendão calcâneo comum de ratos (Aspenberg e Virchenko, 2004), bem como no tendão patelar de coelhos (Lyras et al., 2009). Estudo realizado em ratos por Kajikawa et al. (2008), em tendão patelar direito tratado com PRP, demonstrou aumento do número de células derivadas da circulação sanguínea, ou seja, o PRP estimulou a mobilização dessas células de 3 a 7 dias após o aparecimento das lesões. Esses resultados sugerem uma rápida ação do PRP nos primeiros dias após a sua aplicação, reforçando a necessidade de estudos abrangendo as diferentes fases do processo de reparação, para comprovação ou não da eficácia da terapia. Há relatos de que os fatores de crescimento presentes nesse componente rico em plaquetas trabalham em conjunto (Mishra e Pavelko, 2006), promovendo a melhoria do tecido, com aumento da produção do colágeno, migração de fibroblastos e macrófagos, assim como da angiogênese local (Bennett e Schultz, 1993, Klein et al., 2002, Werner e Grose, 2003; Kisucka et al., 2006).

A presença de atividade miofibroblástica nos membros tratados com salina também foi observada em ovinos por Weiler et al. (2002), em ligamento cruzado cranial reconstituído cirurgicamente com fragmento do tendão calcâneo comum. Fibroblastos que expressam α -actina de músculo liso são conhecidos como miofibroblastos (Sharma e Maffulli, 2005), e especula-se que eles exerçam um papel na homeostase da rede de matriz

extracelular de tendões e ligamentos e, conseqüentemente, podem ser responsáveis pela formação de aderências (Weiler et al., 2002). Portanto, a presença de miofibroblastos pode ter contribuído para a formação de aderências nos membros tratados com salina.

A metaplasia condróide observada em 83,33% dos membros dos equinos utilizados no presente estudo pode ser devido à idade dos animais, que variou de 13 a 16 anos. Este achado também foi verificado em estudos com TFDS sadios (Webbon, 1978; Crevier-Denoix et al., 1998) e lesionados (Marxen et al., 2003; Maia et al., 2009b), sendo considerado comum em animais idosos (Webbon, 1978, 1986; Crevier-Denoix et al., 1998), em áreas submetidas a compressão (Crevier-Denoix et al., 1998) onde o tendão possui uma matriz condróide (Vogel e Koob, 1989). Na realidade, pode ser uma adaptação funcional a cargas compressivas (Benjamin e Ralphs, 1998) e/ou decorrente de estresse em regiões não submetidas a cargas de tração (Almekinders et al., 2003; Pufe et al., 2005; Kjaer et al., 2006). Segundo de Mos et al. (2009), os fatores de crescimento, como TGF- β , podem influenciar a diferenciação condrogênica.

Nos fragmentos histológicos obtidos a partir dos tendões biopsiados na fase de proliferação, o padrão de distribuição das fibras colágenas, caracterizado por fibras esverdeadas (tipo III) entremeadas nas fibras avermelhadas (tipo I), é indicativo de que estava havendo síntese de novo de colágeno, sendo também observado por Maia et al. (2009b) em TFDS biopsiado 36 dias após infiltração intralesional com PRP ou NaCl a 0,9%, e por Fenwick et al. (2001) em tendão calcâneo comum de pacientes humanos com tendinopatia crônica de ocorrência natural. A expressão de colágeno tipo III é proporcionalmente maior imediatamente após a lesão (Dahlgren et al., 2005), conforme observado no presente estudo. Com a progressão do processo de reparação tecidual, as fibrilas de colágeno do tipo III, de menor diâmetro, mais frágeis e menos organizadas, são substituídas pelas do tipo I, que são mais espessas e mais resistentes à tração (Dahlgren, 2007). Tendões com grande quantidade de colágeno do tipo III são menos elásticos e, portanto, passíveis de recidivas (Sharifi et al., 2009).

Embora fosse esperada uma maior presença de TGF- β 1 na fase de proliferação, principalmente aquele liberado pelos macrófagos durante a resolução da inflamação, a ausência de marcação imunoistoquímica de TGF- β 1 nos tendões submetidos a ambos os tratamentos e nas duas fases do processo de reparação avaliadas, sugerem que não houve uma atividade pró-inflamatória intensa que levasse a uma maior atividade de fatores anti-inflamatórios como o TGF- β 1, corroborando a discreta presença de infiltrado inflamatório observada no exame histológico. Outra possível explicação é que os tempos de coleta das

amostras tendíneas (3 e 16 dias após o tratamento) não foram adequados para demonstrar a atividade desse fator de crescimento mediante avaliação imunistoquímica. Nesse sentido, a realização de biópsias 48 horas e três semanas após a aplicação intratendínea de PRP poderiam demonstrar resultados diferentes dos obtidos no presente estudo. Fenwick et al. (2001) também não encontraram marcação para este fator de crescimento em células teciduais de tendão calcâneo comum, proveniente de pacientes humanos com tendinopatia crônica. Entretanto, utilizando a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA), Everts et al. (2006b) encontraram altas concentrações de TGF- β 1 no PRP humano após ativação com trombina autóloga. Adicionalmente, Schnabel et al. (2007) relataram aumento na expressão gênica de moléculas da matriz (colágenos do tipo I e III e proteína oligomérica da matriz cartilaginosa), sem incremento concomitante da expressão das moléculas catabólicas (MMP-3 e MMP-9) após a adição de PRP à cultura celular de TFDS de equinos, sinalizando que há um controle da atividade tecidual, provavelmente decorrente da presença de elevadas concentrações de fatores de crescimento anabólicos, como o TGF- β 1. Esse fator de crescimento, que é uma citocina com atividade biológica relacionada com a reparação tecidual, estimula a supressão da atividade das proteinases e o aumento na atividade de inibidores de metaloproteinases (Bennett e Schultz, 1993; Werner e Grose, 2003).

Esses resultados contraditórios reforçam a necessidade de estudos *in vivo*, determinando a concentração do TGF- β 1 no tendão em processo de reparação. Na metodologia adotada no presente estudo, foram consideradas células marcadas para TGF- β 1, caracterizadas pela coloração marrom produzida pela peroxidase. Entretanto, essa cor também foi observada dispersa na matriz tendínea, mas não foi incluída como marcação positiva para esse fator de crescimento, devido à impossibilidade de comprovar sua presença no meio extracelular. Sabe-se que a marcação extracelular pode ser causada pela presença do fator de crescimento, mas também pode resultar de reação inespecífica. Chang et al. (1997) observaram a marcação dessa proteína tanto na matriz tendínea (forma extracelular) quanto nos tenócitos (forma intracelular) no tendão flexor de coelhos em processo de reparação após transecção. Estudo *in vivo* realizado por Natsu-ume et al. (1997), nos ligamentos patelares de ambos os membros de ratos lesionados cirurgicamente e com reparo natural, demonstrou que inicialmente o TGF- β 1 estava extracelular, provavelmente devido à desgranulação de plaquetas. Em um estágio mais avançado da reparação esse fator de crescimento foi associado a fibroblastos, que segundo os autores foi

reflexo da síntese de mais TGF- β 1 (síntese de novo), estimulada pela lesão tecidual e pelo processo reparativo.

Na realidade, são conhecidas três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), potencialmente produzidas pela maioria das células ativadas na reparação de feridas, principalmente pelas plaquetas (Chang et al., 1997). Existem evidências de regulação diferenciada das isoformas de TGF- β (Falanga et al., 1991; Flanders et al., 1993; 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 e Grose, 2003), sendo responsável por acelerar o processo de reparação (Pierce et al., 1989). Baseado no fato de que a isoforma TGF- β 2 é predominante na matriz fibrilar tanto do tendão calcâneo comum sadio quanto do patológico (Fenwick et al., 2001), os resultados obtidos na presente pesquisa não permitem inferir a ausência total de TGF- β com base apenas na determinação do TGF- β 1. Em estudo *in vitro* realizado por Klein et al. (2002), ficou demonstrado que a adição das três isoformas de TGF- β , isoladamente, em células distintas (fibroblastos da bainha, epitendão ou do endotendão), oriundas de tendões de coelhos, diminuiu o número de células na cultura, em relação ao grupo controle e aumentou a produção de colágeno tipos I e III. Portanto, como as três isoformas de TGF- β estão presentes no reparo de feridas, é importante a identificação e mensuração de todas elas no processo de reparação tendíneo.

As metaloproteinases são enzimas proteolíticas capazes de degradar não apenas diferentes tipos de colágeno, mas também outros componentes da matriz extracelular responsáveis pela função tendínea (Dahlgren, 2007). Como a ação dessas enzimas é regulada pela secreção de vários inibidores, a presença de marcação imunoistoquímica para TIMP-1 nos fibroblastos dos tendões tratados com PRP ou solução salina, biopsiados na fase inflamatória e de proliferação tecidual, sugere que havia uma tendência de controle da atividade catabólica das metaloproteinases, com redução da degradação da matriz tendínea produzida pelos fibroblastos no tecido em reparação.

A ausência de diferença entre os tratamentos no que se refere à presença de TIMP-1 não confirma a hipótese de que a combinação de fatores de crescimento presente no PRP apresenta ação anti-catabólica sobre a matriz tendínea. É possível que a lesão induzida no tendão não tenha provocado um estímulo suficientemente grande para que ocorresse a deposição de matriz tendínea, e a inativação das metaloproteinases pelos inibidores. Outra possibilidade é de que, contrariando o tempo de até poucas semanas para a fase

inflamatória do processo de reparação tendínea (Dahlgren, 2007), as amostras biopsiadas três dias após a realização dos tratamentos já não se encontravam mais nessa fase da reparação, que de acordo com Riley et al. (2002), tem como uma de suas características a intensa atividade das metaloproteinases, e a necessidade do seu controle. Esse fato poderia explicar a ausência de diferença entre os fragmentos tendíneos biopsiados três e 16 dias após os tratamentos.

Não existem, até o presente momento, estudos científicos detectando ou quantificando a presença de TIMP-1 em tendões de equinos. Portanto, não foi possível comparar os resultados obtidos com os de outras pesquisas. Por outro lado, de Mos et al. (2008) demonstraram, em experimentos *in vitro* com cultura de fibroblastos humanos tratada com PRP, estímulo a proliferação celular e a produção de colágeno, assim como discreto aumento na expressão de enzimas que degradam a matriz (MMP-1, MMP-3 e MMP-13) e de fatores de crescimento endógeno (VEGF-A e TGF- β 1). Nesse sentido, é importante estabelecer uma relação quantitativa da presença de metaloproteinases e dos seus inibidores no tecido, de forma a permitir uma melhor base comparativa entre tratamentos.

Brew et al. (2000) ressaltaram que existem dúvidas quanto à forma de atuação do TIMP-1 e à sua especificidade em relação às diversas metaloproteinases, indicando a importância da realização de experimentos onde também sejam avaliadas as outras isoformas de TIMP, e até mesmo as próprias metaloproteinases, para que se possa determinar de forma mais precisa, a intensidade de ação dessas enzimas no tendão em processo de reparação, após tratamento intralesional com plasma rico em plaquetas.

Em conclusão, as avaliações histológica e imunoistoquímica de tendões biopsiados três e dezesseis dias após tratamento intralesional com PRP, correspondendo às fases inflamatória e de proliferação, revelam que uma única aplicação desse componente rico em plaquetas, cinco dias após a indução de tendinopatia, não influencia o processo de reparação, nem a presença de TIMP-1 e TGF- β 1 nas células presentes no reparo.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, para comprovar ou não a eficácia dessa terapia de baixo custo e fácil aquisição, ainda são necessários estudos controlados que avaliem o tecido tendíneo em diferentes intervalos de tempo entre a aplicação do PRP e a biópsia. Além de avaliações bioquímicas e biomecânicas em diferentes fases do processo de reparação, se fazem necessários estudos quantitativos que determinem a concentração de fatores de crescimento não apenas no PRP, mas também no tecido que recebeu este componente rico em plaquetas.

Agradecimentos

À FAPEMIG pelo suporte financeiro e concessão de bolsa de iniciação científica, à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à empresa Ourofino Agronegócio pelo fornecimento do anti-inflamatório não-esteroidal utilizado na pesquisa.

Referências

- Alfredson, H., 2003. Chronic midportion Achilles tendinopathy: an update on research and treatment. *Clin. Sports Med.* **22**, 727-741.
- Almekinders, L.C., Weinhold, P.S., Maffulli, N., 2003. Compression etiology in tendinopathy. *Clin. Sports Med.* **22**, 703-710.
- 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. *J. Bone Joint Surg.* **91b**, 987-996.
- Alves, A.L.G., Rodrigues, M.A.M., Borges, A.S., Nicoletti, J.L.M., Thomassian, A., Hussni, C.A., 2001. Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea equina: avaliação clínica e ultra-sonográfica. *Rev. Educ. Cont. CRMV-SP* **4**, 19-27.
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T., 2004. Autologous platelet as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* **91**, 4-15.
- 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., Viñals, 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.
- Aspenberg, P., Virchenko, O., 2004. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop. Scand.* **75**, 93-99.
- Barreira, A.P.B., 2005. Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 1- 86.

- Batson, E.L., Paramour, R.J., Smith, T.J., Birch, H.L., Patterson-Kane, J.C., Goodship, A.E., 2003. Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions? *Equine Vet. J.* **35**, 314-318.
- Benjamin, M., Ralphs, J.R., 1998. Fibrocartilage in tendons and ligaments - an adaptation to compressive load. *J. Anat.* **193**, 481-494.
- Bennett, N.T., Schultz, G.S., 1993. Growth factors and wound healing: part II - role in normal and chronic wound healing. *Am. J. Surg.* **166**, 74-81.
- Blair, P., Flaumenhaft, R., 2009. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* **23**, 177-189.
- Bosch, G., van Schie, H.T.M., Groot, M.W., Cadby, J.A., van de Lest, C.H.A., Barneveld, A., van Weeren, P.R., 2009. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J. Orthop. Res.* **28**, 211-217.
- Brew, K., Dinakarandian, D., Nagase, H., 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 267-283.
- 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., Prades, M., 2009. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. *Arch. Med. Vet.* **41**, 175-179.
- Carter, C.A., Jolly, D.G., Wonden, 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.
- Chang, J., Most, D., Stelnicki, E., Siebert, J.W., Longaker, M.T., Hui, K., Lineaweaver, 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.
- Chen, Y., Wang, C., Yang, K.D., Kuo, Y., Huang, H., Huang, Y., Sun, Y., Wan, F., 2004. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF-beta 1 and IGF-I expression. *J. Orthop. Res.* **22**, 854-861.
- Cole, B.J., Seroyer, S.T., Filardo, G., Bajaj, S., Fortier, L.A., 2010. Platelet-rich plasma: where are we now and where are we going. *Sports Health* **2**, 203-210.

- Cowin, C.C., Doty, S.B., 2007. Tendon and ligament. In: Cowin, C.C., Doty, S.B. Tissue mechanics. New York: Springer, 559-594.
- Crass, J.R., Genovese, R.L., Render, J.A., Bellon, E.M., 1992. Magnetic resonance, ultrasound and histopathologic correlation of acute and healing equine tendon injuries. *Vet. Radiol. Ultrasound* **33**, 206-216.
- Crevier-Denoix, N., Collobert, C., Sanaa, M., Bernard, N., Joly, C., Pourcelot, P., Geiger, D., Bortolussi, C., Bousseau, B., Denoix, J.M., 1998. Mechanical correlations derived from segmental histologic study of the equine superficial digital flexor tendon, from foal to adult. *Am. J. Vet. Res.* **59**, 969-977.
- Dahlgren, L.A., 2007. Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clin. Tech. Equine Pract.* **6**, 168-173.
- Dahlgren, L.A., Mohammed, H.O., Nixon, A.J., 2005. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J. Orthop. Res.* **23**, 84-92.
- de Mos, M., van der Windt, A.E., Jahr, H., van Schie, H.T.M., Weinans, H., Verhaar, J.A.N., van Osch, G.J.V.M., 2008. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am. J. Sports Med.* **36**, 1171-1178.
- de Vos, R.J., Weir, A., van Schie, H.T.M., Bierma-Zeinstra, S.M.A., Verhaar, J.A.N., Weinans, H., Tol, J.L., 2010. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* **303**, 144-149.
- Everts, P.A.M., Knape, J.T.A., Weibrich, G., Schönberger, J.P.A.M., Hoffmann, J., Pverdevest, E.P., Box, H.A., van Zundert, A., 2006a. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J. Extra Corpor. Techn.* **38**, 174-187.
- Everts, P.A.M., Mahoney, C.B., Hoffmann, J.J.M.L., Schönberger, J.P., Box, H.A., van Zundert, A., Knape, J.T.A., 2006b. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors* **24**, 165-171.
- 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.
- Fenwick, S.A., Curry, V., Harrall, R.L., Hazleman, B.L., Hackney, R., Riley, G.P., 2001. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in chronic tendinosis. *J. Anat.* **199**, 231-240.

- Fernandes, M.A.L., Alves, G.E.S., Souza, J.C.A., 2003. Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de equinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico de dois protocolos. *Arq. Bra. Med. Vet. Zootec.* **55**, 1-11.
- Flanders, K.C., Winokur, T.S., Holder, M.G., Sporn, M.B., 1993. Hyperthermia induces expression of transforming growth factor-betas in rat cardiac cells in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **92**, 404-410.
- Foland, J.W., Trotter, G.W., Powers, B.E., Wringley, R.H., Smith, F.W., 1992. Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 2371-2376.
- Fortier, L.A., 2005. Indications and techniques for tenoscopic surgery of the digital flexor tendon sheath. *Equine Vet. Educ.* **17**, 218-224.
- Foster, T.E., Puskas, B.L., Mandelbaum, B.R., Gerhardt, M.B., Rodeo, S.A., 2009. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am. J. Sports Med.* **37**, 2259-2272.
- Genovese, R.L., Rantanen, N.W., Hauser, M.L., Simpson, B.R., 1986. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **2**, 145-226.
- Goodship, A.E., Birch, H.L., 2001. Exercise effects on the skeletal tissues. In: Clayton, H., Back, W. *Equine Locomotion*. London: Saunders, 227-250.
- Grondin, T.M., Dewitt, S.F., 2010. Normal hematology of the horse and donkey. In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed. Ames: Blackwell Publishing, 821-828.
- Harrison, P., Cramer, E.M., 1993. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* **7**, 52-62.
- Kajikawa, Y., Morihara, T., Sakamoto, H., Matsuda, K., Oshima, Y., Yoshida, A., Nagae, M., Arai, Y., Kawata, M., Toshikazu, K., 2008. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J. Cell. Physiol.* **215**, 837-845.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. Appendix I SI Units. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. Amsterdam: Academic Press, 916-917.
- Kannus, P., 2000. Structure of the tendon connective tissue. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **10**, 312-320.
- Kasterlic, J., Galeski, A., Baer, E., 1978. The multicomposite structure of tendon. *Connect. Tissue Res.* **6**, 11-23.

- Kester, W.O., 1991. Definition and classification of lameness. In: Kester W.O. Guide for veterinary services and judging of equestrian events. 4th ed. Lexington: American Association of Equine Practitioners, 19-19.
- Kisucka, J., Butterfield, C.E., Duda, D.G., Eichenberger, S.C., Saffaripour, S., Ware, J., Ruggeri, Z.M., Jain, R.K., Folkman, J., Wagner, D.D., 2006. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 855-860.
- Kjaer, M., Magnusson, P., Krogsgaard, M., Möller, J.B., Olesen, J., Heinemeier, K., Hansen, M., Haraldsson, B., Koskinen, S., Esmarck, B., Langberg, H., 2006. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J. Anat.* **208**, 445-450.
- Klein, M.B., Yalamanchi, N., Pham, H., Longaker, M.T., Chang, J., 2002. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *J. Hand Surg. Am.* **27**, 615-620.
- Lin, T.W., Cardenas, L., Soslowky, L.J., 2004. Biomechanics of tendon injury and repair. *J. Biomech.* **37**, 865-877.
- Lyras, D., Kazakos, K., Verretas, D., Polychronidis, A., Simopoulos, C., Botaitis, S., Agrogiannis, G., Kokka, A., Patsouris, E., 2009. Immunohistochemical study of angiogenesis after local administration of platelet-rich plasma in a patellar tendon defect. *Int. Orthop.* **34**, 143-148.
- Machado, M.V.M., Vulcano, L.C., Hussni, C.A., Alves, A.L.G., 2000. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em equinos: estudo histológico e ultra-sonográfico. *Arch. Vet. Sci.* **5**, 111-115.
- Maffulli, N., Wong, J., Almekinders, L.C., 2003. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin. Sports Med.* **22**, 675-692.
- Maia, L., 2008. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e histológica. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1-78.
- Maia, L., Souza, M.V., Alves, G.E.S., Ribeiro Júnior, J.I., 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.I., Oliveira, A.C., Alves, G.E.S., Benjamin, L.A., Silva, Y.F.R.S., Zandim, B.M., Moreira, J.C.L., 2009b. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J. Equine Vet. Sci.* **29**, 618-623.

Manske, P.R., Lesker, P.A., 1984. Biochemical evidence of flexor tendon participation in the repair process—an in vitro study. *J. Hand Surg.* **9**, 117-120.

Marr, C.M., McMillan, I., Boyd, J.S., Wright, N.G., Murray, M., 1993. Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon injury. *Equine Vet. J.* **25**, 23-29.

Marsolais, D., Frenette, J., 2005. Inflammation and tendon healing. *Méd. Sci.* **21**, 180-186.

Marxen, S., Lacerda Neto, J.C., Canola, J.C., Moraes, J.R.E., Ribeiro, G., 2004. Intralesional polysulphated glycosaminoglycan as treatment of equine collagenase induced tendinitis: clinical, ultrasonographic and histopathologic evaluation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **56**, 701-708.

Marxen, S., Neto, J.C.L., Moraes, J.R.E., Ribeiro, G., Neto, A.Q., 2003. Efficacy of polysulphated glycosaminoglycan in the intratendinous treatment of experimental equine tendinitis. *Bras. J. Morphol. Sci.* **20**, 43-46.

Mast, B.A., 1997. Healing in other tissues. *Surg. Clin. North. Am.* **77**, 529-547.

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.

Mishra, A., Pavelko, T., 2006. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am. J. Sports Med.* **34**, 1774-1778.

Molloy, T., Wang, Y., Murrell, G.A.C., 2003. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* **33**, 381-394.

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.

Murray, M.M., Spindler, K.P., Abreu, E., Muller, J.A., Nedder, A., Kelly, M., Frino, J., Zurakowski, D., Valenza, M., Snyder, B.D., Connolly, S.A., 2007. Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J. Orthop. Res.* **25**, 81-91.

Murray, M.M., Spindler, K.P., Devin, C., Snyder, B.S., Muller, J., Takahashi, M., Ballard, P., Nanney, L.B., Zurakowski, D., 2006. Use of collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine. *ACL. J. Orthop. Res.* **24**, 820-830.

Natsu-ume, T., Nakamura, N., Shino, K., Toritsuka, Y., Horibe, S., Ochi, T., 1997. Temporal and spatial expression of transforming growth factor-beta in the healing patellar ligament of the rat. *J. Orthop. Res.* **15**, 837-843.

- Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E., Ward, D.L., 2008. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* **69**, 928-937.
- O'Kane, S., Ferguson, M.W., 1997. Transforming growth factor betas and wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 63-78.
- O'Meara, B., Bladon, B., Parkin, T.D.H., Fraser, B., Lischer, C.J., 2010. An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet. J.* **42**, 322-326.
- Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Lingelbach, J., Masakowski, V.R., Gramates, P., Deuel, T.F., 1989. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **6**, 2229-2233.
- Pietrzak, W.S., Eppley, B.L., 2005. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J. Craniofac. Surg.* **16**, 1043-1054
- Pufe, T., Petersen, W.J., Mentlein, R., Tillmann, B.N., 2005. The role of vasculature and angiogenesis of degenerative tendons disease. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **15**, 211-222.
- Rantanen, N.W., 2008. Musculoskeletal ultrasonography. *Comp. Equine* **3**, 356-364.
- Redding, W.R., Booth, L.C., Pool, R.R., 1999. The effects of polysulphated glycosaminoglycan on the healing of collagenase induced tendinitis. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **12**, 48-55.
- Rees, H.M., Ecker, E.E., 1923. An improved method for counting blood platelets. *J. Am. Med. Assoc.* **80**, 621-622.
- Riley, G.P., Curry, V., Degroot, J., van El, B., Verzijl, N., Hazleman, B.L., Bank, R.A., 2002. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol.* **21**, 185-195.
- Sánchez, M., Anitua, E., Azofra, J., Azofra, J., Andía, I., Padilla, S., Mujika, I., 2007. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am. J. Sports Med.* **35**, 245-251.
- Schatzker, J., Branemark, P.I., 1969. Intravital observations on the microvascular anatomy and microcirculation of the tendon. *Acta. Orthop. Scand. Suppl.* **126**, 1-23.
- 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.

- Sharifi, D., Kazemi, D., Latifi, H., 2009. Evaluation of tensile strength of the superficial digital flexor tendon in horses subjected to transcutaneous electrical neural stimulation therapeutic regimen. *Am. J. Appl. Sci.* **6**, 816-819.
- Sharma, P., Maffulli, N., 2005. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**, 187-202.
- Singer, E.R., Barnes, J., Saxby, F., Murray, J.K., 2008. Injuries in the event horse: training versus competition. *Vet. J.* **175**, 76-81.
- 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.
- Smith, R.K.W., Webbon, P.M., 1994. The crosssectional areas of normal equine digital flexor tendons determined ultrasonographically. *Equine Vet. J.* **26**, 460-465.
- Speirs, V.C., 1999. Sistema musculoesquelético. In: Speirs, V.C. Exame clínico de equinos. 1st ed. Porto Alegre: Artmed, 109-181.
- Spurlock, G.H., Spurlock, S.L., Parker, G.A., 1989. Ultrasonographic, gross, and histologic evaluation of a tendonitis disease model in the horse. *Vet. Radiol.* **30**, 184-188.
- 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.
- Thorpe, C.T., Clegg, P.D., 2010. A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Vet. J.* **42**, 174-180.
- Valente, F.L., 2007. Histomorfometria e expressão imunoistoquímica de RANKL em fêmur e vértebra de ratos com osteoporose secundária. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1-51.
- van Schie, H.T.M., Bakker, E.M., Jonker, A.M., van Weeren, P.R., 2000. Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. *Am. J. Vet. Res.* **61**, 210-219.
- van Schie, H.T.M., Bakker, E.M., Jonker, A.M., van Weeren, P.R., 2003. Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. *Am. J. Vet. Res.* **64**, 366-375.

- Villiger, P.M., Kusari, A.B., Ten Dijke, P., Lotz, M., 1993. IL-1 beta and IL-6 selectively induce transforming growth factor beta isoforms in human articular chondrocytes. *J. Immunol.* **151**, 3337-3344.
- Vogel, K.G., Koob, T.J., 1989. Structural specialization in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.* **115**, 267-293.
- Wang, J.H.C., 2006. Mechanobiology of tendon. *J. Biomech.* **39**, 1363-1382.
- Wang, J.H.C., Iosifidis, M.I., Fu, F.H., 2006. Biomechanical basis for tendinopathy. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **443**, 320-332.
- 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.
- Webbon, P.M., 1978. A histological study of macroscopical normal equine digital flexor tendons. *Equine Vet. J.* **10**, 253-259.
- Webbon, P.M., 1986. Preliminary study of tendon biopsy in the horse. *Equine Vet. J.* **18**, 383-387.
- Weiler, A., Unterhauser, F.N., Bail, H.J., Huning, M., Haas, N.P., 2002. Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *J. Orthop. Res.* **20**, 310-317.
- Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* **83**, 835-870.
- Williams, I.F., McCullagh, K.G., Godship, A.E., Silver, I.A., 1984. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Res. Vet. Sci.* **36**, 326-338.
- Woessner Jr, J.F., 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5**, 2145-2154.
- Woodell-May, J.E., Pietrzak, W.S., 2008. Platelet-Rich plasma in orthopedics. In: Pietrzak, W.S. *Orthopedic biology and medicine: musculoskeletal tissue regeneration, biological materials and methods*. 1st ed. Totowa: Hamana Press, 547-568.

Apêndice 1

Valores plaquetários máximos obtidos a partir da correção da contagem de plaquetas no plasma rico em plaquetas ativado ou não, em cada classificação morfológica adotada para o teste estatístico

Classificação das plaquetas	PRP puro	CaCl₂ a 10%	Trombina bovina	Trombina bovina + CaCl₂ a 10%
0: em repouso	57,00	13,95	0	0
1: ativação incerta	68,68	37,20	0	0
2: totalmente ativada	12,00	16,50	0	0
3: dano irreversível	1,16	1,50	0	0
4: Rompida*	0	0	215,33	94,43

*: Alteração morfológica encontrada no presente estudo, mas não relatada na classificação adotada.

Apêndice 2

Médias das variáveis edema, dor à palpação e aumento de temperatura local, avaliadas no exame físico realizado ao longo do tempo, dos membros tratados com plasma rico em plaquetas (PRP) ou NaCl a 0,9%

T	Edema		Dor à palpação		Aumento de temperatura local		Claudicação	
	PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	3,00	3,00	1,83	2,17	1,67	2,00	0,33	0,33
2	3,00	2,83	1,83	2,17	1,00	1,00	0,17	0,33
3	2,67	2,33	2,17	2,00	0,00	0,00	0,17	0,33
4	2,83	2,67	1,83	1,67	1,00	1,00	0,33	0,17
5	2,67	2,50	0,83	1,50	0,00	0,00	0,17	0,00
6	1,67	2,33	0,67	2,33	0,00	0,00	0,00	0,00
7	1,00	1,33	0,33	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00

T=tempo; T0= imediatamente antes da indução da tendinopatia; T1= 24h após indução da tendinopatia; T2= 48 horas após indução da tendinopatia; T3= imediatamente antes dos tratamentos; T4= 24h após os tratamentos; T5= 24h após os tratamentos; T6= 1 semana após os tratamentos (apenas de três animais); e T7= 2 semanas após os tratamentos (apenas de três animais).

Apêndice 3

Médias das variáveis ecogenicidade, paralelismo, área transversal do tendão (ATT) e da lesão (ATL), avaliadas por ultrassonografia realizada ao longo do tempo, dos membros tratados com plasma rico em plaquetas (PRP) ou NaCl a 0,9%

T	ATT		ATL		Paralelismo		Ecogenicidade	
	PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%
0	1,28	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1,38	1,42	0,00	0,00	2,17	2,50	1,17	1,17
2	1,32	1,32	0,00	0,00	2,00	2,00	2,00	1,67
3	1,86	1,62	0,26	0,17	1,83	1,83	2,67	2,67
4	1,63	1,61	0,09	0,10	1,67	2,17	2,17	1,67
5	2,04	1,84	0,65	0,32	1,67	2,00	1,83	1,83
6	1,64	1,74	0,22	0,17	2,67	2,00	1,00	1,67
7	1,31	1,42	0,04	0,07	2,67	2,00	0,67	1,33

T=tempo; T0= imediatamente antes da indução da tendinopatia; T1= 24h após indução da tendinopatia; T2= 48 horas após indução da tendinopatia; T3= imediatamente antes dos tratamentos; T4= 24h após os tratamentos; T5= 24h após os tratamentos; T6= 1 semana após os tratamentos (apenas de três animais); e T7= 2 semanas após os tratamentos (apenas de três animais).

Apêndice 4

Valores das variáveis histológicas resultantes da morfometria realizada a partir dos cortes longitudinais, nos membros tratados com plasma rico em plaquetas (PRP) ou NaCl a 0,9%

Variável	Repetições	Fase inflamatória		Fase de proliferação	
		PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%
Fibroblasto linear	1	89	50	84	134
	2	217	114	133	190
	3	175	180	150	63
	\bar{x}	160,33	114,67	122,33	129
	s	65,25	65	34,27	63,65
Fibroblasto ligeiramente oval	1	48	53	73	88
	2	65	29	71	154
	3	61	67	32	28
	\bar{x}	58	49,67	58,67	90
	s	8,89	19,22	23,12	63,02
Fibroblasto moderadamente arredondado	1	19	26	16	22
	2	26	4	43	58
	3	20	14	12	8
	\bar{x}	21,67	14,67	23,67	29,33
	s	3,79	11,02	16,86	25,79
Fibroblasto totalmente arredondado	1	7	2	0	5
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	\bar{x}	2,33	0,67	0	1,67
	s	4,04	1,15	0	2,89

Continuação do Apêndice 4:

Variável	Repetições	Fase inflamatória		Fase de proliferação	
		PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%
Fibra colágena	1	1775	1874	1810	1767
	2	1795	1813	1744	1545
	3	1702	1769	1771	1841
	\bar{x}	1757,33	1818,67	1775	1717,67
	s	48,95	52,73	33,18	154,04
Vaso sanguíneo do endotendão	1	40	15	29	18
	2	3	55	49	62
	3	66	33	49	45
	\bar{x}	36,33	34,33	42,33	41,67
	s	31,66	20,03	11,55	22,19
Tecido conjuntivo do endotendão	1	134	92	100	78
	2	6	97	72	103
	3	88	49	98	127
	\bar{x}	76	79,33	90	102,67
	s	64,84	26,39	15,62	24,5

\bar{x} = média; s = desvio-padrão

Apêndice 5

Valores das variáveis histológicas resultantes da morfometria realizada a partir dos cortes transversais, nos membros tratados com plasma rico em plaquetas (PRP) ou NaCl a 0,9%

Variável	Repetições	Fase inflamatória		Fase de proliferação	
		PRP	NaCl a 0,9%	PRP	NaCl a 0,9%
Fibroblasto	1	129	122	152	175
	2	264	106	163	243
	3	145	235	109	114
	\bar{x}	179,33	154,33	141,33	177,33
	s	73,76	70,32	28,54	64,53
Infiltrado inflamatório	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	34	0	0	0
	\bar{x}	11,33	0,00	0,00	0,00
	s	19,63	0,00	0,00	0,00
Fibra colágena	1	1744	1695	1817	1750
	2	1693	1605	1543	1676
	3	1581	1694	1771	1786
	\bar{x}	1672,67	1664,67	1710,33	1737,33
	s	83,38	51,68	146,73	56,08
Vaso sanguíneo do endotendão	1	77	78	44	57
	2	53	98	108	69
	3	83	70	86	79
	\bar{x}	71,00	82,00	79,33	68,33
	s	15,87	14,42	32,52	11,02
Tecido conjuntivo do endotendão	1	162	215	99	130
	2	102	303	298	124
	3	269	113	146	133
	\bar{x}	177,67	210,33	181,00	129,00
	s	84,60	95,09	104,01	4,58

\bar{x} = média; s = desvio-padrão