

## Efeito do tratamento com Plasma Rico em Plaquetas sobre lesões do ligamento suspensor do boleto de equinos, induzidas experimentalmente\*

Maria Amélia Fernandes Figueiredo<sup>1+</sup>, Geraldo Eleno Silveira Alves<sup>2</sup>, Ana Flávia Ribeiro Machado Michel<sup>3</sup>, Alessandra Estrela Lima<sup>4</sup>, Amauri Arias Wenceslau<sup>5</sup>, Manoel Luiz Ferreira<sup>6</sup>, Rosana Maria Oliveira Clark<sup>7</sup> e Maria Consuelo Caribé Ayres<sup>8</sup>

**ABSTRACT.** Figueiredo M.A.F., Alves G.E.S., Michael A.F.M., Lima A.E., Wenceslau A.A., Ferreira M.L., Clark R.M.O. & Ayres M.C.C. [Effect of Platelet Rich Plasma therapy in the repair of experimental lesions of the suspensory ligament in horses.] Efeito do tratamento com Plasma Rico em Plaquetas sobre lesões do ligamento suspensor do boleto de equinos, induzidas experimentalmente. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.1):85-92, 2016. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz. Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900, Brasil. E-mail: mel@uesc.br

The relevance of Platelet Rich Plasma (PRP) as a regenerative therapy is increasing, particularly in equine sport medicine, but there is still lack of controlled studies demonstrating its action in treating ligament injuries. This study was designed to evaluate the effect of Platelet Rich Plasma therapy in the repair of experimental injuries in equine suspensory ligament (SL). PRP was evaluated for treatment of desmites surgically induced in the body of the SL in six horses. PRP was applied 14 days after induction of the lesions, in the thoracic and pelvic left limbs; right limbs constitute control. Sonographic examinations were performed weekly to monitor the dynamics of lesions Intensity Rate (IR), based on ecogenicity and cross-sectional area. Forty-six days after PRP treatment, samples of the ligaments were collected and evaluated for cellularity, vascularity and collagen content. The group treated with PRP presented reduced intensity rate (IR), improving ecogenicity in SL lesions. Treated group also presented higher neovascularity and type I collagen content. The number of fibroblasts was higher in treatment group, but it was not significant. The results suggests that PRP was effective in improving suspensory ligament repair in this study.

**KEY WORDS.** Collagen, desmitis, histopathology, picrosirius, ultrasound.

**RESUMO.** O tratamento com Plasma Rico em Plaquetas tem se difundido como terapia regenerativa na medicina esportiva, em especial na medicina

equina, sendo ainda insuficientes os estudos controlados que demonstrem a sua ação sobre lesões ligamentares de equinos. Objetivou-se avaliar o

\* Recebido em 21 de março de 2016.

Aceito para publicação em 9 de maio de 2016.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, DSc. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais (DCAA), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Jorge Amado Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900. <sup>+</sup> Autora para correspondência, E-mail: mel@uesc.br

<sup>2</sup> Médico-veterinário, DSc. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901. E-mail: geufmg@gmail.com

<sup>3</sup> Médica-veterinária, DSc. UESC, DCAA, Rodovia Jorge Amado Km 16, Ilhéus, BA 45662-900. E-mail: anaflavia@michel.com

<sup>4</sup> Médica-veterinária, DSc. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ), Departamento de Patologia e Clínicas (DPC), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Ademar de Barros 500, Salvador, BA 40170-110. E-mail: aestrela@gmail.com

<sup>5</sup> Médico-veterinário e Zootecnista, DSc. DCAA, UESC. Rodovia Jorge Amado Km 16, Ilhéus, BA 45662-900. E-mail: amauriwenceslau@hotmail.com

<sup>6</sup> Médico-veterinário, DSc. DCAA, UESC. Rodovia Jorge Amado Km 16, Ilhéus, BA 45662-900. E-mail: louis@uesc.br

<sup>7</sup> Médica-veterinária, DSc. DCAA, UESC., Rodovia Jorge Amado Km 16, Ilhéus, BA 45662-900. E-mail: rmoelark@uesc.br

<sup>8</sup> Médica-veterinária, DSc, EMVZ, DPC., UFBA, Av. Ademar de Barros 500, Salvador, BA 40170-110. E-mail: ayresmcc@gmail.com

efeito do tratamento com PRP sobre lesões experimentais do ligamento suspensor do boleto (LSB) em equinos, através de exames ultrassonográficos e histopatologia. As lesões foram induzidas cirurgicamente no corpo do LSB de seis equinos, nos quatro membros. O PRP foi aplicado 14 dias após a cirurgia nos membros torácico e pélvico esquerdos; os membros do lado direito constituíram controle, sendo tratados com solução salina. Os exames ultrassonográficos foram realizados semanalmente, avaliando-se o Índice de Intensidade da Lesão (IL) baseado na sua ecogenicidade e área transversal. As amostras para avaliação histológica foram coletadas cirurgicamente, 46 dias após o tratamento, e avaliadas quanto à celularidade, vascularização e caracterização do colágeno. O grupo tratado com PRP apresentou à ultrassonografia, menor IL que o grupo controle pela melhora no padrão ecogênico da lesão. À histopatologia o grupo tratado apresentou maior vascularização e percentual de colágeno do tipo I. A média do grupo tratado também foi superior quanto à contagem de fibroblastos, embora a diferença não tenha sido significativa. Os resultados sugerem a eficácia do PRP em auxiliar o reparo de lesões no LSB, nas condições deste experimento.

**PALAVRAS-CHAVE.** Colágeno, desmíte, histopatologia, picrosírius, ultrassonografia.

## INTRODUÇÃO

Na era moderna, os esportes equestres crescem em interesse entre o público em geral, representando um segmento econômico importante. O equino utilizado em provas esportivas de alto desempenho trabalha sempre próximo ao limite da sua capacidade física, o que tem como consequência a ocorrência frequente de lesões. Enfermidades tendíneas e ligamentares causam grandes prejuízos, devido ao tempo prolongado necessário para o tratamento e ao fato do tecido resultante ter propriedades viscoelásticas diferentes do original, predispondo a recorrência (Crow et al. 2002, Carmona & Giraldo-Murillo 2007, Carmona et al. 2011, Zuffova et al. 2013).

A lesão do ligamento suspensor do boleto (LSB) ocorre em membros torácicos ou pélvicos de cavalos atletas, podendo levar à redução do desempenho antes que os sinais clínicos se manifestem e o tratamento seja instituído, e por isso tende ao agravamento e cronificação. A busca por alternativas que abreviem o tempo necessário para o tratamento e favoreçam a recuperação completa das lesões têm enfatizado as terapias celulares, incluindo o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) (Zuffova et al.

2013, Brossi et al. 2015, Romagnoli et al 2015). As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados dos megacariócitos que apresentam a propriedade de sintetizar, armazenar e liberar fatores de crescimento (FC) como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Insulínico Tipo I (IGF-I), e Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), que estimulam o metabolismo celular e atuam sobre a proliferação e diferenciação tecidual (Carmona & López 2011, Sundman et al. 2011). Acredita-se que o tratamento com PRP promova a recuperação da função de tendões e ligamentos após lesões, melhorando a qualidade do tecido neoformado, mas são muitas as variáveis e existem poucos estudos controlados que comprovem essa eficácia (Brossi et al. 2015).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do PRP sobre lesões experimentais do ligamento suspensor do boleto (LSB) em equinos, através de exames ultrassonográficos e análise morfológica e morfométrica do tecido de reparo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se seis éguas mestiças, híbridas, com idade média de cinco anos ( $\pm 3$ ), sendo as unidades experimentais os ligamentos suspensores do boleto (LSB) dos quatro membros. Para inclusão no experimento considerou-se como critérios a hígidez do aparelho locomotor e ligamento suspensório, atestado pelo exame clínico e ultrassonográfico, e concentração sanguínea de plaquetas acima de 100.000/ $\mu\text{L}$ . Os equinos foram mantidos confinados em baias e alimentados com feno de tifton e suplementação com ração comercial e sal mineral durante todo o período experimental, no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz, Salobrinho, Ihéus.

Lesões padronizadas foram induzidas cirurgicamente nos membros torácicos e pélvicos, sob anestesia geral inalatória e bloqueio anestésico local, retirando-se um fragmento de 5 mm de diâmetro do corpo do LSB, utilizando-se uma pinça de biópsia cutânea (Figura 1), conforme técnica proposta por Soares et al. (2010). Para

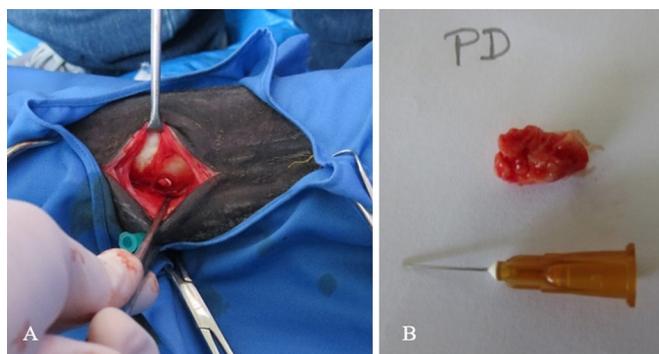


Figura 1. Exposição do LSB (A) para retirada do fragmento de 5mm (B) com pinça de biópsia cutânea.

preparo do PRP foi utilizada a técnica de dupla centrifugação em tubos modificada de Argüeles et al. (2008) obtendo-se concentração plaquetária mínima de 300.000 plaquetas/ $\mu$ L e concentração de leucócitos < 2.000/ $\mu$ L. O tratamento foi aplicado no 14<sup>o</sup> dia, consistindo de 2,5 mL de PRP nos membros torácico (MT) e pélvico (MP) esquerdos. O PRP foi aplicado por injeção intralesional guiada por ultrassom, com o equino em estação sob sedação com detomidina (1 $\mu$ g/kg IV) e bloqueio nervoso palmar e plantar alto com bupivacaína. Os membros contralaterais receberam solução salina, constituindo o controle.

Exames ultrassonográficos foram realizados no 10<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dia após a indução da lesão, utilizando-se transdutor linear multifrequencial operando na frequência de 7,5 MHz, conforme descrito por Denoix et al. (2008), para acompanhar a evolução do tratamento e obtenção de imagens padrão para avaliação da lesão. Os graus de ecogenicidade foram determinados subjetivamente em uma escala de 1 a 4 adaptada de Waselau et al. (2008), considerando-se: 1 < 50% da lesão anecóica; 2 = 50% da lesão anecóica; 3 > 50% da lesão anecóica; 4 = 100% da lesão anecóica. As imagens obtidas no 10<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dia foram utilizadas na determinação do índice de IL inicial e final. Para estabelecer o IL multiplicou-se o percentual da área transversal do ligamento ocupada pela lesão pelo grau de ecogenicidade da mesma.

Quarenta e seis (46) dias após o tratamento com PRP os animais foram submetidos a uma segunda intervenção cirúrgica para biópsia do tecido cicatricial na área da lesão. As amostras coletadas e processadas para microscopia foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) e picrosirius (Luna 1968). Foram avaliadas imagens de seis campos por lâmina em objetiva de 20x e 40x. A contagem de fibroblastos e de vasos por campo, e a avaliação qualitativa e quantitativa do colágeno sob luz polarizada foram realizados com o uso do aplicativo *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Springs, USA).

As variáveis paramétricas analisadas foram: ATL (área transversal do ligamento); ATLes (área transversal da lesão). Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC (One-way); com o modelo matemático das variáveis quantitativas analisadas:

$Y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$  onde:  $Y_{ij}$  = valor observado na unidade experimental que recebeu o tratamento  $i$ , repetição  $j$ ;  $m$  = efeito da média geral;  $t_i$  = efeito do tratamento  $i$ ;  $e_{ij}$  = erro aleatório (resíduo).

As variáveis não paramétricas (Eco, IL e percentual da área de lesão em função do tempo) foram avaliadas através do teste de Wilcoxon para diferenças entre pares ordenados e Kruskal-Wallis para diferença entre tratamentos (amostras não pareadas). Os dados sobre celularidade, vascularização, e percentual de colágeno tipo I foram avaliados por análise de variância, para determinação de diferenças entre os tratamentos e entre membros tratados e os controles, considerando  $p < 0,05$ .

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA sob protocolo 12/2011.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a indução da lesão não foram observados sinais evidentes de desconforto ou dor nos animais, que mantiveram seu comportamento e apetite normais, confirmando o descrito por Soares et al. (2010). Os protocolos utilizados para a biópsia e o pós-operatório foram, portanto, satisfatórios para garantir adequação aos critérios de bem-estar animal.

Imagens ultrassonográficas da lesão no 10<sup>o</sup> dia foram obtidas para comparação da evolução e dos resultados do tratamento, considerando-se que foi necessário aguardar o fim da fase inflamatória e a estabilização da lesão para quantificar o seu grau inicial. Este foi um requisito adotado para atender ao protocolo experimental, em que se optou por instituir o tratamento na fase proliferativa. Em casos da rotina clínica, porém o PRP tem sido utilizado tanto em lesões crônicas como agudas (Argüelles et al. 2008, Waselau et al. 2008, Carmona et al. 2009, Manzano et al. 2009, Carmona et al. 2011). Também se optou por utilizar uma única aplicação de PRP, embora seja citado na literatura o uso de uma a quatro aplicações com intervalos que variam de uma a duas semanas. A opção de tratamento único se deu devido ao curto período de avaliação após o tratamento (45 dias), em que mais de uma aplicação produziria interferência sobre o mecanismo de reparação e dificuldade na interpretação dos resultados observados.

As lesões produzidas foram facilmente identificadas ao exame ultrassonográfico, e apresentaram ecogenicidade que variou de predominantemente hipoecóica a anecóica (graus 3 e 4), localizada na porção central do ligamento (Figura 2). A área transversal das lesões também apresentou variação de 28,5 a 75,5 mm com média ( $\pm$  erro padrão) de 51,54 ( $\pm 14,81$ ).

O índice de Intensidade da Lesão (IL) foi obtido pela multiplicação do percentual da área transversal do ligamento ocupada pela lesão pelo grau de ecogenicidade. Os dados referentes ao IL das lesões no 10<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias estão expostos na Tabela 1. Ao fim do período experimental observou-se que o Grupo Tratado (GT) apresentou menor IL (0,91  $\pm$  0,57) comparado ao GC (1,08  $\pm$  0,49).

Considerando-se os números gerais, ocorreu aumento da área transversal do ligamento, tanto no GT quanto no GC. Esse aumento ocorreu de forma progressiva no período que durou o experimento, com maior variação no GT, enquanto no GC esse aumento foi mais discreto. A área transversal da lesão (ATL) acompanhou essa tendência, de modo que quando se considera a área relativa

da lesão, esta se manteve relativamente estável durante todo o período experimental. A tendência ao aumento da área transversal do ligamento também foi relatada por Soares et al. (2010) ao avaliar a técnica para indução das lesões experimentais. Em estudos clínicos, o aumento na área transversal do ligamento é considerado um aspecto negativo na evolução do tratamento, uma vez que está associado ao edema e à degeneração do ligamento. Neste trabalho, apesar do aumento na espessura do ligamento, não se observou sinal de aumento do edema, que se traduz na perda de ecogenicidade à imagem ultrassonográfica. O curto período de avaliação não permitiu observar a reorganização das fibras em arranjo longitudinal, um dos parâmetros ultrassonográficos indicados por Denoix et al. (2008), porém neste aspecto deve-se considerar a natureza da lesão produzida, que constituiu da extração mecânica de um fragmento. Na desmiste de ocorrência natural ocorre rompimento de fibras e liberação de enzimas que produzem a degradação da matriz por processos químicos. Esta diferença é salientada por Soares et al. (2009) ao propor a técnica utilizada para avaliação de reparo tecidual. A maior variação observada no grupo tratado pode ser consequência dos efeitos do PRP sobre a atividade fibroblástica, uma vez que não se observou sinal de inflamação ou edema no período observado. Essa ação seria mediada principalmente pelo Fator de crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Insulínico Tipo I (IGF-I), e fator de crescimento epidérmico (EGF) que estimulam a migração e mitose dos fibroblastos e a síntese de matriz extracelular (Carmona & López 2011, López & Carmona 2014).

A análise dos fragmentos do LSB obtidos no momento da indução da lesão experimental confirmou a integridade do tecido antes do experimento. Todos os animais apresentaram ligamento constituído por fibrócitos entre feixes densos e paralelos de colágeno maduro, orientados na mesma direção (Figura 3; A e B). Após 46 dias de tratamento, os animais do grupo tratado com PRP apresentaram tendão composto por fibroblastos ativos, com núcleo ovalado e citoplasma volumoso e maior quantidade de vasos sanguíneos, característico da fase proliferativa do reparo. O tecido apresentava-se menos organizado, sem orientação paralela das células (Figura 3; C e D). No grupo controle o tendão apresentava-se menos vascularizado e com orientação aleatória das fibras (Figura 3; E e F).

O grupo tratado com PRP apresentou maior média de fibroblastos e densidade de vasos sanguí-

neos, característico da fase proliferativa do reparo (Tabela 2). No grupo controle o tendão apresentou-se menos vascularizado.

A neovascularização é um dos sinais característicos do reparo tecidual e é mediado pelo FC vasculo-endotelial (VEGF) e pelo PDGF presente no PRP (Anitua et al. 2005, Bosch et al. 2011, López & Carmona 2014). Bosch et al. (2011) testaram o efeito de uma única aplicação de PRP em lesões criadas cirurgicamente em equinos, avaliando a vascularização por ultrassonografia com *Color Doppler* e imunohis-

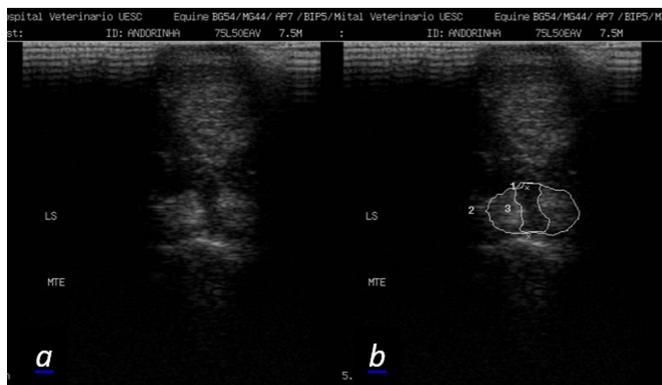


Figura 2. Imagem ultrassonográfica transversal do terço médio da região metacarpiana de equino, dez dias após a cirurgia (a), com delineamento da área transversal do LSB e da área da lesão (b) com ecogenicidade grau 3.

Tabela 1. Índices de Intensidade das Lesões ao exame ultrassonográfico, considerando-se o grupo tratado com PRP (GT) e Grupo Controle (GC).

Grupos	Período (dias)		
	10° (lesão inicial)	30°	60°
GT	1,37±0,60 <sup>a</sup>	1,29±0,45 <sup>a</sup>	0,91±0,57 <sup>b</sup>
GC	1,11±0,32 <sup>a</sup>	1,21±0,37 <sup>a</sup>	1,08±0,49 <sup>a</sup>

Letras diferentes em linhas significa diferença estatística do parâmetro avaliado ao 10°, 30° e 60° dias. (p<0,05); Teste de Wilcoxon.

Tabela 2. Comparação no número de fibroblastos e vasos sanguíneos por campo, no grupo tratado com PRP (GT) e no grupo controle tratado com NaCl a 0,9% (GC).

Grupos experimentais	Número de animais	Fibroblastos/campo	Vasos/campo
GT	6	54,00±17,75 <sup>a</sup>	27,06±20,40 <sup>b</sup>
GC	6	43,86±14,51 <sup>a</sup>	9,53±5,16 <sup>c</sup>

Letras diferentes significa diferença estatística do parâmetro avaliado, entre tratamentos e respectivos controles. (p<0,05) / ANOVA.

Tabela 3. Percentual de colágeno do tipo I (% Col-I) em relação ao do tipo III, no 60° dia após a lesão inicial, em LSB tratados com solução salina (GC) quando comparados aos membros contralaterais tratados com PRP (GT);

GT (n=6)	GC (n=6)
41,79 <sup>a</sup> (27,14)	18,34 <sup>b</sup> (11,15)

(p<0,05); ANOVA.

toquímica, demonstrando que os membros tratados com PRP apresentaram maior neovascularização. O estímulo à vascularização é proposto como a razão para o prolongado efeito terapêutico de uma única aplicação de PRP, uma vez que o período de ação dos fatores de crescimento é limitado. Neste trabalho não foi utilizado nenhum tipo de agente ativador externo no PRP antes da sua aplicação.

A tipificação do colágeno objetivou identificar a

presença de fibras do tipo I, característica do tecido tendíneo e ligamentar, e do tipo III, típica da fase inicial do processo do reparo (de MOS et al. 2008). A quantificação do colágeno com base na birrefringência pode subestimar os valores reais, porque varia conforme o ângulo de incidência da luz. Este problema é minimizado quando se utiliza a luz com incidência circular, como utilizado neste trabalho. Como enfatizado por Rich e Whittaker (2005), a téc-

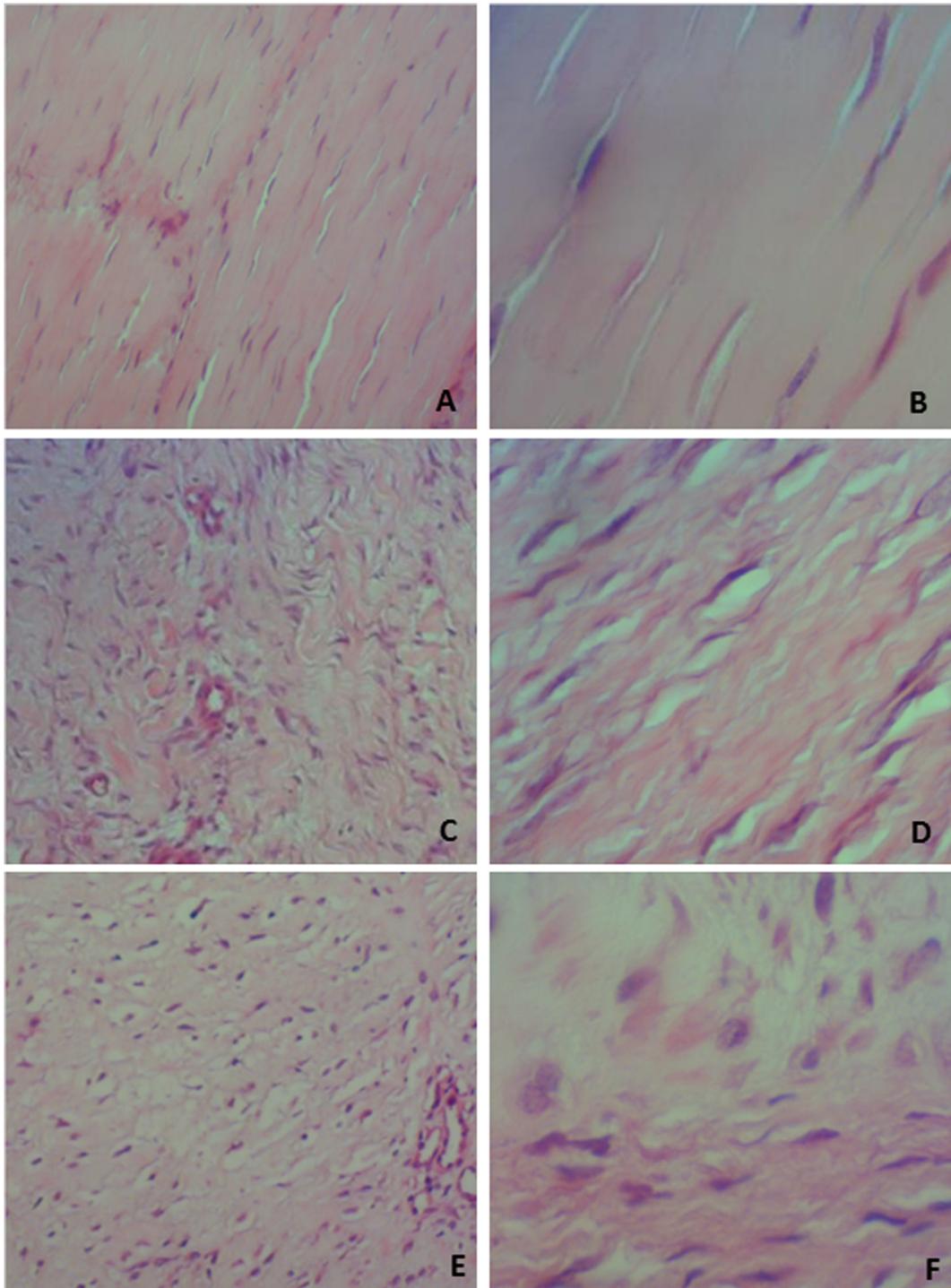


Figura 3 Imagens de lâminas histológicas do LSB de equinos; íntegro (A, B); após 60 dias da indução da lesão e 45 dias de tratamento com PRP (Grupo Tratado: C, D) e solução NaCl 0,9% (Grupo Controle: E, F); HE; 20x (A, C, E) e 40x (B, D, F)

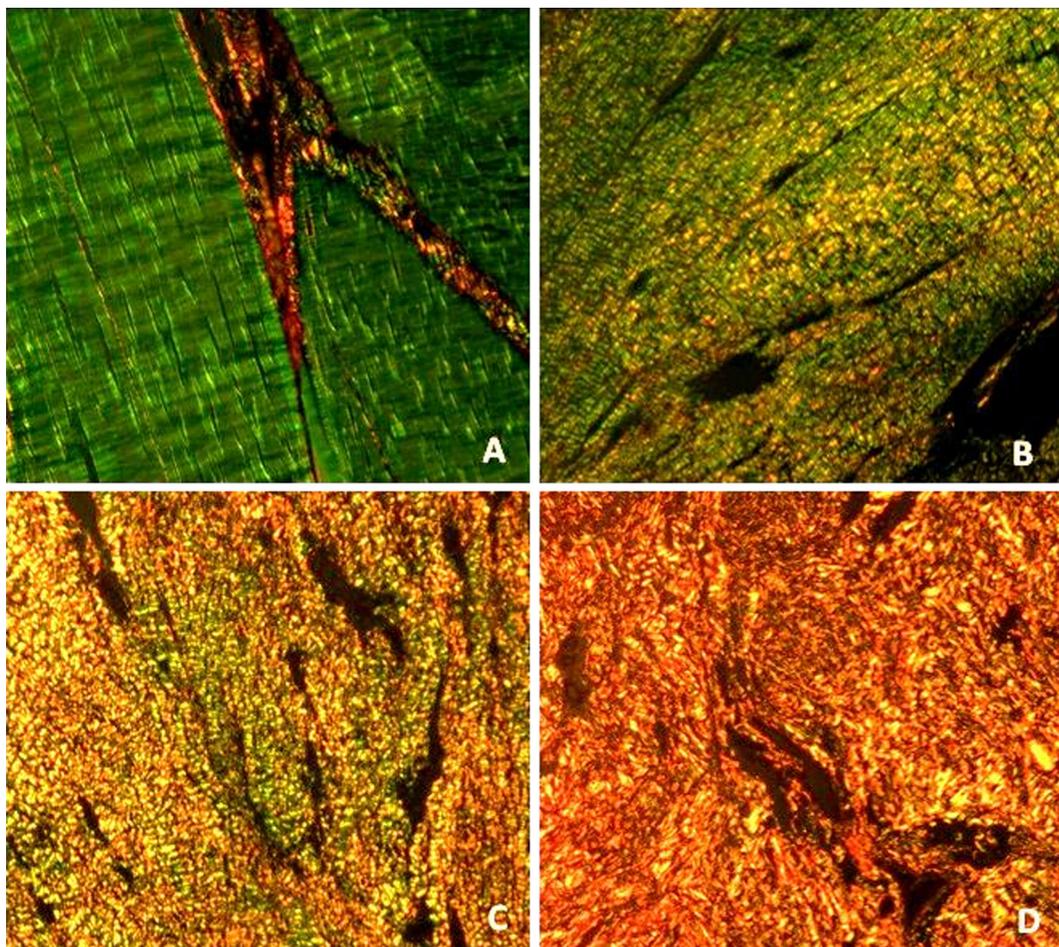


Figura 4. Fotomicrografias do LSB de equino íntegro ou com lesão e tratado com PRP ou NaCl 0,9%, coradas com Picrosirius-Red; 10x. A) Ligamento íntegro apresentando grande quantidade de colágeno tipo I com intensa birrefringência verde. B) LSB após 60 dias da indução da lesão e 46 dias de tratamento com PRP apresentando fibras colágenas de coloração predominantemente verde com arranjo aleatório das fibras ou C) coloração predominantemente amarelada e arranjo aleatório das fibras. D) LSB do grupo controle, após 60 dias da indução da lesão e 45 dias de tratamento com NaCl 0,9%. Ligamento apresentando fibras colágenas de coloração predominantemente alaranjada, com arranjo aleatório.

nica propicia variar o ângulo de incidência da luz e assim revelar detalhes que ficariam ocultos na incidência linear fixa. Ainda assim, a técnica leva à imprecisão na quantificação do colágeno, por isso optou-se por expressar os valores em percentual sobre o valor total dos dois tipos de colágeno avaliados. Os valores foram expressos em porcentagem do colágeno tipo I, e estão indicados na Tabela 3.

À microscopia de luz polarizada, as amostras coletadas na 1ª biópsia apresentaram fibras de coloração verde de aspecto delgado e arranjo longitudinal em ondas característico do ligamento íntegro (Figura 4A), constituído de colágeno do Tipo I na proporção de 85% (Rich & Wittaker 2005). As amostras coletadas após 60 dias apresentaram maior proporção de coloração amarela ou alaranjada (Figura 4B), com arranjo aleatório. Ligamentos tratados com PRP (Figura 4C e D) apresentaram maior proporção de colágeno tipo I ( $p < 0,05$ ) comparados aos que receberam placebo (Tabela 3).

Paoloni et al. (2011) encontraram maior proporção de colágeno tipo I em tecido tendíneo e ligamentar cultivados em meio com PRP. Mos et al. (2008) associaram a maior quantidade de células observada em cultivos de tendão humano com PRP ativado e não ativado, com a maior deposição de colágeno do tipo I. Os mesmos autores citaram que nos casos de evolução para tendinose e formação de cicatriz existe tendência desta relação se inverter para predominância de colágeno do tipo III.

Os ligamentos tratados com PRP apresentaram maiores médias de celularidade e vascularização, respectivamente, do que os seus controles. Esses resultados sugerem efeito positivo do PRP utilizado no processo de reparo, uma vez que essas variáveis tendem a melhorar a deposição de colágeno e o metabolismo tecidual. Esse efeito foi observado também na caracterização das fibras colágenas presentes, verificando-se predominância do tipo I nos ligamentos tratados com PRP.

As áreas de lesão ao 60º dia apresentaram arranjo aleatório das fibras, resultado distinto ao observado por Dolkart et al. (2014), que utilizaram modelo murino. O fato do metabolismo de roedores ser sabidamente mais intenso do que de animais de grande porte pode explicar a diferença desses resultados. Os mesmos autores não encontraram diferença significativa no grau de vascularização entre tendões tratados e controle, que pode ser também reflexo de um estágio mais avançado de maturação tecidual. É conhecido que a instituição do exercício gradual dos animais no período de recuperação favorece este alinhamento e conseqüentemente, maior resistência ao ligamento. O exercício não foi aplicado neste estudo, pois também existe a associação entre a carga mecânica imposta aos fibroblastos e o estímulo à produção do FC PDGF- $\beta$ , que estimula a deposição de colágeno do tipo 1, e poderia haver confundimento sobre a influência da terapia física e o efeito dos tratamentos. Na reabilitação de cavalos atletas, é indicada a instituição de um programa de exercícios controlados no período de recuperação de lesões tendíneas e ligamentares para favorecer o alinhamento das fibras e prover resistência ao tecido neoformado, além de haver evidências de que o estímulo mecânico inibe a expressão de citocinas catabólicas e a degeneração da matriz extracelular (Waselau et al. 2008, Abellanet 2009).

## CONCLUSÕES

Os ligamentos tratados com PRP apresentaram melhores resultados aos 60 dias após a indução, no que se refere ao índice de intensidade das lesões ao exame ultrassonográfico. O estabelecimento de um índice de intensidade permitiu sintetizar as variáveis relativas à lesão e minimizar a variabilidade inerente à técnica da ultrassonografia, salientando a diferença entre os resultados.

O PRP promoveu proliferação de fibroblastos e neovascularização nos ligamentos tratados. A deposição de colágeno do tipo I também foi maior no grupo tratado, sinalizando um melhor padrão de reparação nos ligamentos tratados. Esses resultados sugerem efeito positivo do PRP na qualidade do tecido neoformado. O curto período de avaliação do tratamento limita a interpretação dos resultados a longo prazo. A avaliação da evolução futura das lesões seria fundamental para verificar a capacidade do PRP em prevenir a degeneração do ligamento suspensor do boleto e potencializar o reparo.

**Agradecimentos.** Ao *Equus* (Grupo de Estudos em Equídeos da UESC), à Prof. Dra. Fabiana Lessa (UESC), a

MSc. Müller Ribeiro (UFBA) e Laboratórios de Histotecnologia e Microscopia Eletrônica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, BA).

## REFERÊNCIAS

- Anitua E., Andia I., Ardanza B. Nurden P. & Nurden A.T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, 91:4-15, 2005.
- Argüelles D., Carmona J.U., Climent F., Munoz E. & Prades M. Autologous platelet concentrates as treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Veterinary Record*, 162:208-11, 2008.
- Bosch G., Moleman M., Barneveld A., Weerem P.R. van & Schie H.T.M. van. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 21:554-61, 2011.
- Brossi P.M., Moreira J.J., Machado T.S.L. & Baccarin R.Y.A. Platelet-rich Plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research*, 98:11, 2015.
- Carmona J.U. & Giraldo-Murillo C. Fisiopatología y tratamiento convencional de la osteoartritis en el caballo. *Revista de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia*, 1:60-73, 2007.
- Carmona J.U., Prades M. & Argüelles D. Concentrados autólogos de plaquetas como tratamiento de lesiones de tejidos blandos del aparato locomotor en caballos, *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41:77-82, 2009.
- Carmona J.U. & López C. Tendinopatía del tendón flexor digital superficial y desmopatía del ligamento suspensorio en caballos: fisiopatología y terapias regenerativas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43:203-14, 2011.
- Carmona J.U., López C. & Giraldo C.E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43:1-10, 2011.
- Denoix J.M., Coudry Y.V. & Jacquet S. Ultrasonographic procedure for a complete examination of the proximal third interosseous muscle (proximal suspensory ligament) in the equine forelimbs. *Equine Veterinary Education*, 3:148-153, 2008.
- Dolkart O., Chechik O., Zarafat Y., Brosh T., Alhajajra F. & Maman E. A single dose of platelet-rich plasma improves the organization and strength of a surgically repaired rotator cuff tendon in rats. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 134:1271-77, 2014.
- López C. & Carmona J.U. Platelet-Rich Plasma as an adjunctive therapy for the management of a severe chronic distal limb wound in a foal. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34:1128-1133, 2014.
- Luna L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw Hill, New York, 1968.
- Manzano A.F., Del Arco M.V. & Liorente I.S. Factores de crecimiento plaquetarios en el tratamiento de la tendinitis del tendón flexor digital superficial de un caballo de carreras. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3:253-60, 2009.
- Mos M. de, Windt A.E. van der, Jahr H., Schie H.T.M. van, Verhaar J.A.N. & Orch G.J.V.M. van. Can Platelet-Rich Plasma Enhance Tendon Repair? A Cell Culture Study. *American Journal of Sports Medicine*, 36:1171-78, 2008.
- Paoloni J., de Vos R.J. & Hamilton B. Platelet-Rich Plasma Treatment for Ligament and Tendon Injuries. *Clinical Journal of Sports Medicine*, 21:37-45, 2011.
- Rich L. & Wittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 22:97-104, 2005.
- Romagnoli N., Rinnovati R., Ricciardi G., Lambertini C., Spinella G. & Spadari A. Clinical Evaluation of Intralesional Injection of Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Proximal Suspensory Ligament Desmitis in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35:141-6, 2015.

- Soares A.S., Alves G.E.S., Lago L.A., Spadeto Junior O., Moreira D.O. & Faleiros R.R. Modelo de indução de lesão no ligamento suspensório equino com utilização de punch para biópsia cutânea. *Ciência Rural*, 40:1121-27, 2010.
- Sundman E.A., Cole B.J. & Fortier L.A. Growth Factor and Catabolic Cytokine Concentrations Are Influenced by the Cellular Composition of Platelet-Rich Plasma. *American Journal of Sports Medicine*, 39:2135-40, 2011.
- Waselau M., Sutter W.W., Genovese R.L. & Bertone A.L. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232:1515-20, 2008.
- Zuffova K., Krisova S. & Zert Z. Platelet rich plasma treatment of superficial digital flexor tendo lesions in Racing Thoroughbreds. *Veterinarni Medicina*, 58:230-9, 2013.