

PAULA ANDREA RAMÍREZ RAMOS

**Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao uso do LASER terapêutico
em desmiste proximal do ligamento suspensor do boleto**

São Paulo

2013

PAULA ANDREA RAMÍREZ RAMOS

**Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao uso do LASER terapêutico
em desmíte proximal do ligamento suspensor do boleto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2827
FMVZ

Ramírez Ramos, Paula Andrea
Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao uso do LASER terapêutico em desmíte proximal do ligamento suspensor do boleto / Paula Andrea Ramírez Ramos. -- 2013.
121 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Equino. 2. Desmíte. 3. Plasma rico em plaquetas (PRP). 4. LASER terapêutico.
5. Ultrassonografia. I. Título.

ERRATA

RAMIREZ RAMOS, P.A. Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao uso do LASER terapêutico em desmíte proximal do ligamento suspensor do boleto. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

| Página | Parágrafo | Onde se lê | Leia-se |
|------------------------|-----------|------------|---------|
| Ficha catalográfica | 1º | 121 f | 117 p. |
| Resumo | 1º | 121 f. | 117 p. |
| Abstract | 1º | 121 f. | 117 p. |



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeito do implante autólogo do plasma rico em plaquetas associado ao laser de baixa intensidade na reparação das tendinites e desmites em eqüinos”, protocolado sob o nº 2284/2011, utilizando 12 (doze) equinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research “Effect of autologous plasma rich platelets associated with low level laser on repair of horses tendonitis and desmitis”, protocol number 2284/2011, utilizing 12 (twelve) equines, under the responsibility Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RAMÍREZ RAMOS, Paula Andrea

Título: Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao uso do LASER
terapêutico em desmite proximal do ligamento suspensor do boleto

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATORIA

“Quien me enseñó que el camino que se elija, debe ser caminado con amor”.

A Carlos

A gente muda o mundo, com a mudança da mente.

GP

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. **Raquel Yvonne Arantes Baccarin**, pela confiança e compreensão.

A **Ana Guiomar Reis**, porque trabalhando junto, confirmamos que em equipe sempre é melhor. *“Anita, amiga, hasta el infinito, en nuestros corazones”*.

A **Daniela Pereira**, por todo o amor e a ajuda incondicional.

A **Rosendo** por estar sempre disposto a nós ajudar

À **FAPESP** pelo incentivo financeiro e proporcionar condições de desenvolver este projeto.

Ào programa **PEC-PG, Cnpq**, pela bolsa de mestrado e me permitir estudar no Brasil.

Ào **Hospital de Equinos** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À **Instituto de Fomento Veterinario - IFVET** por oferecer um lar para nossos animais.

Nosso respeito e humildade aos **Cavalos**.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram a concretizar este trabalho.

RESUMO

RAMIREZ RAMOS, P.A. **Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao uso do LASER terapêutico em desmite proximal do ligamento suspensor do boleto.** [Effect of PRP associated to laser therapy in proximal suspensory desmites] 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A cicatrização das lesões ligamentares é lenta e muitas vezes ineficiente. Uma vez lesado, o ligamento suspensor do boleto (LSB) dificilmente recupera suas propriedades biomecânicas originais. A desmite do LSB proximal dos membros torácicos ocorre em cavalos de todas as raças e todas as disciplinas esportivas. O objetivo deste trabalho foi avaliar clinicamente e por ultrassonografia, a influência do plasma rico em plaquetas (PRP), e do PRP associado ao LASER terapêutico, na cicatrização da região proximal do LSB, em cavalos com desmite induzida por colagenase. Para isto foram utilizados 18 animais sem raça definida, distribuídos em três grupos. O G1 foi formado por seis animais, submetidos a indução da desmite na região proximal do LSB, que não receberam qualquer tratamento. O G2 foi formado por seis animais, que foram submetidos a desmite induzida e após três semanas receberam aplicação intralesional de PRP guiada pelo ultrassom. O G3 foi formado por seis animais, que após indução da desmite receberam tratamento com LASER terapêutico a partir da segunda semana, e na terceira semana pós-lesão receberam aplicação intralesional de PRP guiada pelo ultrassom. A indução da desmite foi realizada por meio de infiltração guiada pelo ultrassom na região proximal do LSB, sendo este considerado o tempo 0. A cada semana e até a semana oito, os cavalos foram avaliados clinicamente, por ultrassonografia e por análise cinemática, ao trote em linha reta. Houve diferença significativa na comparação entre grupos para as variáveis aumento de volume na avaliação clínica, e área no corte transversal do ligamento e, área no corte transversal da lesão na avaliação ultrassonográfica. Na comparação entre os diferentes momentos de observação as variáveis aumento de volume e dor à palpação do G2 e G3 mostraram escores maiores quando comparados ao G1, sendo que o G2 apresentou escore maior que o G3. Ultrassonograficamente, a ecogenicidade da lesão mostrou diminuição dos escores,

a partir da quinta semana de avaliação nos grupos tratados. As demais variáveis clínicas ou ultrassonográficas, bem como a análise cinemática da claudicação não mostraram diferenças significativas entre os grupos. O PRP, apesar de ocasionar inflamação leve e transitório após infiltração, influenciou positivamente o processo de cicatrização da parte proximal do LSB, com um efeito analgésico adicional quando associado ao LASER terapêutico.

Palavras-chave: Equino. Desmite. Plasma rico em plaquetas (PRP). LASER terapêutico. Ultrassonografia.

ABSTRACT

RAMIREZ RAMOS, P. A. **Effect of PRP associated to laser therapy in proximal suspensory desmitis.** [Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao uso do LASER terapêutico em desmite proximal do ligamento suspensor do boleteo]. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The healing process of injured ligaments is slow and often inefficient. Once damaged the suspensory ligament (SL) hardly recover their original biomechanical properties. The forelimb proximal suspensory ligament desmitis occurs in horses of all breeds and all sports. The aim of this study was to evaluate clinically and ultrasonographically, the influence of platelet-rich plasma (PRP), and PRP associated with LASER therapy, on the healing process of the proximal region of the SL in horses with collagenase-induced desmitis. For this purpose it were used 18 cross breed horses divided into 3 groups. G1 was composed of six horses subjected to induction of proximal suspensory desmitis, with no treatment. G2 was composed of six horses subjected to desmitis induction and after three weeks they received ultrasound-guided intralesional injection of PRP. G3 was composed of six horses subjected to desmitis induction and after two weeks they received laser therapy and one week later they received intralesional guided-ultrasound injection of PRP. Induction of desmitis was made using ultrasound-guided infiltration in PSL, which was considered day zero. Horses were evaluated clinically, in straight line trot for cinematic analysis and ultrasonographically, every week until eighth week. There were significant difference between groups for swelling, the cross-sectional area of the ligament, and the cross-sectional area of the injury on ultrasound evaluation. Comparing the different times of observation, descriptively were a difference for G2 and G3 in the clinical variables that evaluated swelling and pain on palpation, showed higher scores compared to the G1, and G2 had higher scores than the G3. Sonographically, the echogenicity of the lesion showed decreased scores from the fifth week of evaluation in the treated groups. The other clinical variables or ultrasound, as well as the kinematic analysis of lameness showed no significant

differences between groups. PRP, although causing transient and mild inflammation after infiltration, positively influenced the healing process of the proximal part of the SL, with additional analgesic effect when combined with laser therapy.

Keywords: Equine. Desmites. Platelet-Rich plasma (PRP). LASER therapy. Ultrasonography.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Imagem ilustrando o local do bloqueio da região proximal do LSB | 59 |
| Figura 2 - | Imagem mostrando o nervo palmar lateral..... | 60 |
| Figura 3 - | Foto ilustrando a região da entrada da agulha de biopsia no LSB..... | 61 |
| Figura 4 - | Foto da imagem ultrassonográfica da entrada da agulha no LSB..... | 62 |
| Figura 5 - | Local de colocação dos sensores inerciais sem fio do equipamento Lameness Locator | 66 |
| Figura 6 - | Imagem ilustrando a folha de resultados após cada avaliação | 66 |
| Figura 7 | Foto ilustrando o aumento de volume na área de lesão..... | 72 |
| Figura 8 - | <i>Box-plot</i> da variável aumento de volume da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)..... | 73 |
| Figura 9 - | Evolução da variável aumento de volume da região proximal do LSB durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)..... | 74 |
| Figura 10 - | Evolução da variável aumento de temperatura da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3) durante as nove semanas de experimento..... | 75 |
| Figura 11 - | Evolução da variável evidencia de dor da parte proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3) durante as nove semanas de experimento | 77 |
| Figura 12 - | Evolução da variável da ecogenicidade do LSB durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)..... | 81 |
| Figura 13 - | Imagens longitudinais do LSB na área proximal do cavalo N°17, mostrando em sequência as nove semanas de avaliação, desde o exame inicial (semana 0) até 8 ^a semana pós-lesão..... | 83 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 14 - | Evolução da variável alinhamento da lesão no LSB dos membros torácicos durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)..... | 84 |
| Figura 15 - | Evolução da variável ecogenicidade da lesão na parte proximal do LSB dos membros torácicos, durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos..... | 85 |
| Figura 16 - | Imagens transversais do LSB na área proximal do cavalo N°16, mostrando em sequência as 9 semanas de mensuração da área transversal do ligamento e da área transversal da lesão, desde o exame inicial na semana 0 até a 8ª semana pós-lesão..... | 87 |
| Figura 17 - | <i>Box-plot</i> da variável área do ligamento (mm ²) no corte transversal da região próxima do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)..... | 88 |
| Figura 18 - | <i>Box-plot</i> da variável área da lesão no corte transversal (mm ²) da região próxima do LSB dos membros torácicos nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)..... | 89 |
| Figura 19 - | Porcentagem da área de lesão (%) do LSB no corte transversal durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos..... | 91 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------|--|----|
| Quadro 1 – | Descrição dos animais utilizados no estudo segundo grupo, raça, sexo, idade (anos), peso (kg) – São Paulo – 2012/2013. | 58 |
| Quadro 2 – | Escala utilizada para a avaliação do grau de dor, aumento de temperatura e aumento de volume na área de indução da desmíte..... | 64 |
| Quadro 3 – | Escores utilizados para avaliação da presença ou não de claudicação do membro torácico com desmíte; avaliada em linha reta ao trote..... | 64 |
| Quadro 4 – | Escore de avaliação do alinhamento das fibras de colágeno da área de lesão do LSB em imagem longitudinal (RANTANEN et al., 2011)..... | 67 |
| Quadro 5 – | Escore de avaliação da ecogenicidade das fibras do tecido da lesão e do LSB nas imagens transversais (RANTANEN et al., 2011)..... | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 1 – | Escore da avaliação do aumento de volume da parte proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 72 |
| Tabela 2 – | Escore da avaliação do aumento de temperatura da parte proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 75 |
| Tabela 3 – | Escore da avaliação da evidência de dor na parte proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 76 |
| Tabela 4 – | Medidas do perímetro da circunferência da região proximal da canela (cm), correspondendo a área proximal do LSB, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 78 |
| Tabela 5 | Presença de claudicação no membro torácico lesado, nos diferentes grupos e durante todo o experimento, sendo 0 sem claudicação e 1 com claudicação – São Paulo – 2012/2013.... | 79 |
| Tabela 6 – | Porcentagem de animais que apresentaram claudicação na avaliação cinemática ao trote – São Paulo – 2012/2013..... | 80 |
| Tabela 7 – | Escore da avaliação da ecogenicidade do LSB na região proximal dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 81 |
| Tabela 8 – | Escore da avaliação do alinhamento da lesão na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 82 |
| Tabela 9 – | Escore da avaliação da ecogenicidade da lesão na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 85 |
| Tabela 10 – | Área do ligamento (mm ²) mensurada no corte transversal na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 88 |

| | |
|--|----|
| Tabela 11 – Área da lesão (mm ²) mensurada no corte transversal na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 89 |
| Tabela 12 – Porcentagem da área de lesão (%) no corte transversal na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013..... | 90 |
| Tabela 13 – Contagem de plaquetas no sangue total e no PRP, com o correspondente fator de multiplicação. São Paulo - 2012/2013..... | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| AAEP | American Association of Equine Practitioners |
| ACD | Acid-citrate-dextrose |
| ADAMTS5 | A-disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin like-motifs |
| bFGF | Fator de crescimento fibroblástico básico |
| BMA | Aspirado de medula óssea |
| COL1 | Colágeno tipo I |
| COL3 | Colágeno tipo III |
| COMP | Proteína oligomérica da matriz da cartilagem |
| CPD | Citrate-phosphate-dextrose |
| CS | Condroitin sulfato |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| DS | Dermatam sulfato |
| DSLDD | Desmite degenerativa do ligamento suspensor do boleto |
| EGF | Fator de crescimento epitelial |
| GAGs | Glicosaminoglicanos |
| IGF-1 | Fator crescimento tipo insulina-1 |
| KS | Keratam sulfato |
| LASER | Light amplification by stimulated emission of radiation |
| LL | Lameness Locator® |
| LLLT | Lower level laser therapy |

| | |
|--------------|---|
| LSB | Ligamento suspensor do boleto |
| MEC | Matriz extracelular |
| MLG | Modelos lineares generalizados |
| MMPs | Metaloproteinases |
| MTC | Metacarpiano |
| PCR | Reação de polimerase em cadeia |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| PGs | Proteoglicanos |
| PP | Lyophilized platelet product |
| PRP | Plasma rico em plaquetas |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SLRPs | Pequenos proteoglicanos ricos em leucina |
| TFDS | Tendão flexor digital superficial |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador- β |
| TIMPs | Inibidores tissulares de metaloproteinases |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| WALT | World Association of LASER therapy |

LISTA DE APÊNDICES

| | | |
|--------------|---|-----|
| Apêndice A – | Medidas descritivas e teste F ou ANOVA. n=18. (*) Teste ANOVA, Significante $p < 0,05$ – São Paulo – 2012/2013..... | 107 |
| Apêndice B – | Medidas descritivas e teste não paramétrico. n=18 – São Paulo – 2012/2013..... | 108 |
| Apêndice C – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 0 - São Paulo – 2012/2013..... | 109 |
| Apêndice D – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 1 - São Paulo – 2012/2013..... | 110 |
| Apêndice E – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 2 - São Paulo – 2012/2013..... | 111 |
| Apêndice F – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 3 - São Paulo – 2012/2013..... | 112 |
| Apêndice G – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 4 - São Paulo – 2012/2013..... | 113 |
| Apêndice H – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 5 - São Paulo – 2012/2013..... | 114 |
| Apêndice I – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 6 - São Paulo – 2012/2013..... | 115 |
| Apêndice J – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 7 - São Paulo – 2012/2013..... | 116 |
| Apêndice K – | Avaliação do Lameness Locator ® - semana 8 - São Paulo – 2012/2013..... | 117 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 31 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 33 |
| 2.1 | REGIÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSOR DO BOLETO (LSB) DOS MEMBROS TORÁCICOS..... | 33 |
| 2.1.1 | Considerações anatômicas e funcionais..... | 33 |
| 2.1.2 | Composição estrutural..... | 35 |
| 2.2 | DESMITE PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSOR DO BOLETO..... | 37 |
| 2.3 | FISIOPATOLOGIA DA DESMITE E CICATRIZAÇÃO..... | 40 |
| 2.4 | USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)..... | 42 |
| 2.5 | USO DE LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LOW LEVEL LASER THERAPY-LLLT) EM EQUINOS..... | 47 |
| 2.6 | UTILIZAÇÃO DE SISTEMA DE SENSORES INERCIAIS PARA ANÁLISE CINEMÁTICA DO TROTE..... | 50 |
| 2.7 | AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA NO DIAGNÓSTICO DA DESMITE PROXIMAL DO LSB..... | 53 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 55 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 55 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 55 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 57 |
| 4.1 | ASPECTOS ÉTICOS..... | 57 |
| 4.2 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 57 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.2.1 | Procedimentos clínicos..... | 59 |
| 4.2.1.1 | Anestesia local..... | 59 |
| 4.2.1.2 | Infiltração guiada pelo ultrassom..... | 60 |
| 4.2.1.3 | Infiltração com colagenase para indução da desmíte do LSB..... | 61 |
| 4.2.1.4 | Protocolo para obtenção do PRP..... | 62 |
| 4.2.1.5 | Aplicação do PRP..... | 63 |
| 4.2.1.6 | Protocolo do uso do LASER terapêutico de baixa intensidade.... | 63 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO CLÍNICA..... | 64 |
| 4.4 | AVALIAÇÃO DE CLAUDICAÇÃO COM O USO DE SISTEMA DE SENSORES INERCIAIS SEM FIO (LAMENESS LOCATOR®)..... | 65 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA..... | 67 |
| 4.6 | PROCEDIMENTO DE BIOPSIA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 68 |
| 4.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 68 |
| 5 | RESULTADOS..... | 71 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO CLÍNICA..... | 71 |
| 5.1.1 | Avaliação do aumento de volume..... | 71 |
| 5.1.2 | Avaliação do aumento de temperatura..... | 74 |
| 5.1.3 | Avaliação da evidencia de dor..... | 76 |
| 5.1.4 | Avaliação do perímetro da circunferência..... | 77 |
| 5.1.5 | Avaliação de claudicação..... | 78 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO CINEMÁTICA DO TROTE..... | 79 |
| 5.3 | AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA..... | 80 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.3.1 | Avaliação da ecogenicidade do LSB..... | 80 |
| 5.3.2 | Avaliação do alinhamento da lesão..... | 82 |
| 5.3.3 | Avaliação da ecogenicidade da lesão..... | 84 |
| 5.3.4 | Avaliação da área do LSB no corte transversal..... | 86 |
| 5.3.5 | Avaliação da área da lesão no corte transversal..... | 86 |
| 5.3.6 | Porcentagem da área de lesão do LSB..... | 90 |
| 5.4 | OBTENÇÃO DE AMOSTRAS POR MEIO DO PROCEDIMENTO DE BIOPSIA..... | 91 |
| 5.5 | CONCENTRAÇÃO DE PLAQUETAS NA OBTENÇÃO DO PRP | 91 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 93 |
| 7 | CONCLUSÕES..... | 99 |
| | REFERÊNCIAS..... | 101 |
| | APÊNDICES..... | 107 |

1 INTRODUÇÃO

As afecções do sistema musculoesquelético englobam as causas mais comuns de aposentadoria de cavalos atletas; dentre elas as lesões do ligamento suspensor do boleto (LSB) contribuem significativamente na porcentagem total de cavalos que não retornam a carreira atlética (MURRAY et al., 2006; WASELAU et al., 2008; CLEGG, 2012).

A natureza multifatorial da patogenia das desmopatias (MOLLOY, WANG, MURREL, 2003; DAHLGREN, 2007) leva a uma infinidade de modalidades de tratamento para reduzir os sintomas e tentar controlar ou melhorar a resposta da cicatrização, os resultados são desuniformes e muitas vezes insuficientes para manter o nível de desempenho atlético. Existem muitas controvérsias sobre a consistência e efeitos favoráveis dos procedimentos médicos e cirúrgicos que são aplicados no tratamento destas enfermidades (SMITH, McILWRAITH, 2012). O principal objetivo da maioria dos tratamentos é modular o processo de cicatrização, assim os tratamentos emergentes tendem a promover regeneração mais do que reparação e atualmente utilizam fatores de crescimento, concentrados de plaquetas, células tronco mesenquimais e terapia gênica (BOSCH et al., 2010, 2011; TEXTOR, 2011; VOLETI, BUCKLEY, SOSLOWSKY, 2012).

As observações experimentais *in vitro* sugerem que o uso de concentrados de plaquetas sejam um tratamento promissor no uso *in vivo*, no tratamento das tendinites e desmites (Mc CARREL, FORTIER, 2009; GEANEY et al., 2011), porém, ainda há necessidade de uma quantidade substancial de trabalhos clínicos e experimentais validando os efeitos benéficos do PRP.

Na busca de tratamentos que permitam a otimização da reparação tecidual das lesões do sistema locomotor, o uso de aparelhos como o LASER terapêutico é de grande relevância pois, como outros métodos fisioterapêuticos, age localmente de forma não invasiva e não lesiva. Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente entendido supõe-se que a estimulação fotoquímica possa levar a modulação do metabolismo celular, causando uma diminuição da dor e estimulando

substâncias promotoras de reparação (PETERSEN et al.,1999; RYAN, SMITH, 2007; MARINI et al., 2013 no prelo¹).

Uma das principais dificuldades nos estudos das lesões do sistema locomotor de equinos é utilizar um sistema objetivo de avaliação de claudicação, comumente estas avaliações são feitas por veterinários experientes seguindo um modelo padrão de exame. Alguns estudos tem mostrado que os avaliadores podem estar influenciados ou ter tendência para observar melhora da claudicação durante alguns testes, o que poderia afetar a identificação e localização precisa da origem da dor, interferindo no sucesso do tratamento (McCRACKEN et al., 2012). A cinemática e especialmente o sistema de sensores inerciais são sugeridos na literatura como método de avaliação eficiente. Na decisão de utilizar a claudicação como variável de desfecho nos trabalhos experimentais, este sistema de sensores inerciais podem oferecer grande informação objetiva e quantitativa, embora devam ser bem controlados (SMITH, McILWRAITH, 2012).

Este trabalho teve como intuito observar a influência do PRP e do PRP associado ao LASER terapêutico, no processo de cicatrização da desmite proximal do ligamento suspensor do boleto dos equinos, por meio de análise clínica e ultrassonográfica. Com isso pretendeu-se oferecer ao clínico, uma análise crítica destas ferramentas que vêm sendo utilizadas no tratamento das lesões na região proximal do LSB.

¹ MARINI I.; BARTOLUCCI M.L; BORTOLOTTI F.; INNOCENTI G.; GATTO M.R; BONETTI G. A. The effect of diode superpulsed low-level laser therapy on experimental orthodontic pain caused by elastomeric separators: a randomized controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**. Maio, 2013.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REGIÃO PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSOR DO BOLETO (LSB) DOS MEMBROS TORÁDICOS

2.1.1 Considerações anatômicas e funcionais

O ligamento suspensor do boleto (LSB) é uma estrutura complexa desde o ponto de vista anatômico, devido à heterogeneidade do tecido que o compõe, como também pela disposição que mantém em relação às estruturas adjacentes (BISCHOFBERGER et al., 2006; NAGY, DYSON, 2009, 2012; WERPY, DENOIX, 2012). Werpy, Denoix, (2012) fizeram um trabalho descritivo da abordagem diagnóstica do LSB, onde se expõe a importância de conhecer em detalhe sua anatomia. Esses autores descreveram que no membro torácico o LSB origina-se como uma fina camada de fibras, provindas do aspecto proximal palmar do osso III carpiano e dos ossos metacarpianos, de forma bilobulada, facilmente visível na união com o osso III metacarpiano (III MTC). Comumente o lóbulo medial é mais fino e mais comprido que o lóbulo lateral; embora isto possa mudar entre indivíduos. Na união com o ligamento, a margem palmar do osso III MTC tem uma crista sagital óssea que não deve ser interpretada nas imagens diagnósticas como proliferação óssea. O ligamento possui uma quantidade variável de músculo e gordura em cada um dos lóbulos, de distribuição assimétrica quando comparado com o membro contralateral. Estas regiões de tecido muscular e gorduroso estão em maior quantidade na altura dos lóbulos, no entanto estes tecidos se mantêm em uma forma de distribuição de *zig-zag*, que segue em menor quantidade por toda a extensão do ligamento até sua bifurcação nos ramos. 5-7cm distal à articulação carpometacarpiana, os lóbulos se juntam e o ligamento adquire uma forma oval que se mantêm até sua bifurcação.

Nagy, Dyson, (2012) também confirmaram esta descrição anatômica, submetendo 30 membros torácicos de cavalos à avaliação por ressonância

magnética. Nove destes animais, ainda foram submetidos à avaliação histológica, sendo que em quatro amostras o conteúdo de músculo e gordura ocupou entre 4 e 11% da área no corte transversal. Além disso, afirmaram que algumas fibras do LSB proximal, provindas do osso IV metacarpiano (IV MTC) estão presentes em seu aspecto lateral, seis ou sete centímetros distal à articulação carpometacarpiana.

A inervação do LSB proximal provém do ramo profundo do nervo lateral palmar, que depois se divide nos nervos metacarpianos palmares lateral e medial. O nervo palmar lateral é formado pela anastomose do ramo palmar do nervo ulnar e fibras do nervo mediano. A irrigação e drenagem venosa do ligamento na região proximal são feitas pelas artérias e veias metacarpianas palmares lateral e medial, as quais tem origem nos vasos sanguíneos radial, no aspecto medial, e colateral ulnar no aspecto lateral. Estes vasos são facilmente visualizados nas diferentes técnicas diagnósticas utilizadas na avaliação do ligamento (NAGY, DYSON, 2012; WERPY, DENOIX, 2012).

Segundo Souza et al. (2010), o ligamento é por definição uma estrutura de tecido conjuntivo que une duas superfícies ósseas, e o tendão une músculo com o osso. Neste contexto o LSB é uma estrutura especial e diferenciada, sendo mais complexa que um ligamento, devido ao conteúdo de tecido muscular, porém não pode ser considerada um tendão. A nomenclatura oficial do ligamento é *musculus interosseus medius*, mas a funcionalidade do músculo é considerada passiva. Ainda, o ligamento que na maioria da sua estrutura é de material colágeno, faz parte do grupo de estruturas flexoras armazenadoras de energia elástica do membro distal equino (BIEWENER, 1998; BIRCH, WILSON, GOODSHIP, 2008). Do ponto de vista biomecânico, devido ao módulo de elasticidade, o LSB dos membros torácicos é a estrutura do grupo que mais esforço sofre na transição de um andamento para outro, ou seja do passo para o trote ou do trote para o galope; embora sua contribuição armazenando energia elástica seja a mais baixa, aproximadamente 20% do total. A função geral do LSB é estabilizar os ossos adjacentes e prover resistência passiva ao movimento (DAHLGREN, 2007); mais especificamente ele está em total relação com o grau de movimentação da articulação metacarpofalangeana, tanto em extensão, quanto em flexão (BIEWENER, 1998). Analisando a função do ligamento pode-se concluir que o máximo esforço implica na máxima deformação, o qual contribui a uma alta incidência de lesões (SOUZA et al., 2010).

2.1.2 Composição estrutural

Em geral, os tendões e ligamentos tem aparência estrutural e histológica semelhante, com apropriadas diferenças nas características moleculares, bioquímicas, celulares e de organização das moléculas. Estes tecidos são compostos por escassos fibroblastos embebidos em uma estrutura complexa de matriz extracelular (MEC), rica em colágeno organizado ao longo das linhas de tensão (DAHLGREN, 2007; REES, DENT, CATERSON, 2009).

Aproximadamente 80% da matéria seca dos tendões e ligamentos é colágeno, do qual mais de 95% é do tipo I, para os tendões, e 85% para os ligamentos; o restante é colágeno tipo III, com pequenas quantidades de outros tipos, como IV, VII e IX (DAHLGREN, 2007; REES, DENT, CATERSON, 2009). O colágeno no interior do ligamento tem uma organização hierárquica. Em maior escala estão os fascículos, estruturas tubulares visíveis macroscopicamente, orientadas ao longo do eixo das forças de tensão. No caso dos ligamentos estes eixos estão em maior número e direções, dependendo do grau de movimentação da articulação à que estejam associados. Cada fascículo contém feixes de fibras de colágeno que podem ter um diâmetro aproximado de 10 μ m, visualizadas por microscopia óptica na maior ampliação. O seguinte nível da estrutura são as fibrilas de colágeno contidas nos feixes, as quais são visíveis por microscopia eletrônica, em ainda menor escala encontram-se a microfibrilas, que são agregados de cinco moléculas de tropocolágeno mantidas por *cross-links*. Cada molécula de tropocolágeno está composta por três cadeias de polipeptídeos envolvidas em forma helicóide, com aproximadamente 1,5 nm de diâmetro, as quais são hidrossolúveis (VOLETI, BUCKLEY, SOSLOWSKY, 2012). A integridade estrutural e a função normal mecânica dos ligamentos vai depender do alinhamento das fibras de colágeno tipo I (YOON, HALPER, 2005).

A MEC além de conter colágeno, que é considerado como a parte fibrosa, contém também uma parte de substância amorfa de suporte, composta por proteoglicanos, glicoproteínas estruturais e proteínas diferentes do colágeno: elastina, proteína de ligação, proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP),

tenascina C, fibronectina, fibulina, fibrilina e tromboespondina. A função destas proteínas está relacionada com a organização das moléculas da matriz, a sinalização entre as células e entre células com a matriz (PARKINSON et al., 2011).

Os proteoglicanos são moléculas compostas por uma proteína central, à qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos se unem por ligações covalentes. Nos ligamentos e tendões existem dois tipos de grupos, dos pequenos proteoglicanos ou também chamados pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs), e o dos grandes proteoglicanos, ou de alto peso molecular. Os pequenos proteoglicanos contêm uma proteína central, com várias cadeias de repetições de leucina em posições permanentes, cada uma das cadeias com 20-30 aminoácidos de comprimento, às quais se unem uma ou duas cadeias de condroitim ou dermatam sulfato (CS ou DS), ou varias de queratam sulfato (KS) (YOON, HALPER, 2005; REES, DENT, CATERSON, 2009; PARKINSON et al., 2011). Existem mais de 11 tipos de SLRPs que podem ser classificados em quatro classes, dependendo de características como a quantidade de cadeias de repetições de leucina ou das cadeias de glicosaminoglicanos que estejam unidas, dentre outras várias características. Os SLRPs considerados mais importantes, devido a maior presença nos ligamentos e tendões são: decorim, biglicam, fibromodulim e lumicam. Eles tem funções específicas, ainda em estudo, mas geralmente ligam-se a fibrilas de colágeno contribuindo para a fibrilogênese, como também, se unem a fatores de crescimento, tendo participação na modulação da proliferação celular e resposta imunológica (YOON, HALPER, 2005). Zhang et al. (2006) compararam as características histológicas dos tendões de camundongos deficientes em decorim com tendões saudáveis. As amostras dos tendões foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão, PCR, análise de imunofluorescência e *immunoblotting*. Os resultados evidenciaram que os tendões dos animais deficientes em decorim desenvolveram fibrilas de colágeno tipo I de contorno irregular, com diâmetros menores e distribuição desuniforme, concluindo com estes achados que o decorim coordena a regulação da fibrilogenese e o desenvolvimento do colágeno nos tendões.

Já os grandes proteoglicanos são ricos em CS e KS, além de possuir a proteína central com múltiplos domínios. O domínio globular N-terminal interage com o ácido hialurônico e o domínio C-terminal consiste em um ou dois domínios para

fatores de crescimento epidermal, um domínio que é uma sequência de aminoácidos como lectina (*C type lectin-like*), e um domínio para proteína reguladora de complemento. Estes são os mesmos elementos estruturais vistos nas selectinas, o que significa que este domínio tem grande afinidade por ligar hidratos de carbono simples ou mediar adesões por meio de ligações de hidratos de carbono. Estes proteoglicanos estão embebidos dentro e entre as fibrilas e fibras de colágeno, e são moléculas carregadas negativamente, hidrófilas que podem reter 50 vezes seu peso em água; proporcionando às fibrilas de colágeno a capacidade de resistir às mais altas forças compressivas e de tensão. Existem vários tipos de grandes proteoglicanos; no caso dos ligamentos e tendões, o agregam e o versicam representam 10% do total dos proteoglicanos, sendo os 90% restantes SLRPs nas áreas de tensão; já nas áreas submetidas a compressão, a distribuição é de 50% para os dois grupos (YOON, HALPER, 2005; PARKINSON et al., 2011).

Já referido anteriormente, os fibroblastos ou células do ligamento estão imersos na MEC em pouca quantidade, embora a funcionalidade do tecido dependa do seu metabolismo. Em condições fisiológicas estas células mantêm o balanço homeostático, eliminando os resíduos e produzindo proteínas da MEC. Este balanço é mantido pela produção de dois tipos de proteínas, as metaloproteinases de matriz e os inibidores tissulares de metaloproteinases (MMPs e TIMPs). As MMPs são enzimas proteolíticas que degradam MEC e facilitam a remodelação, processo essencial na manutenção e reparo dos tecidos. A função das MMPs é, por sua vez altamente controlada pelas TIMPs (DAHLGREN, 2007; REES, DENT, CATERSON, 2009).

2.2 DESMITE PROXIMAL DO LIGAMENTO SUSPENSOR DO BOLETO

Para o estudo da desmíte tanto no membro torácico quanto no pélvico, o ligamento suspensor do boleto é dividido em três regiões: região proximal, corpo e ramos, as quais são susceptíveis de lesões, com manifestação clínica diferente. Assim a desmíte proximal do LSB é considerada como a lesão do terço proximal, que pode ocorrer entre 4-12 cm distal ao osso acessório cárpico, dependendo do

tamanho do animal (DYSON, 2000). Nesta mesma região, estruturas como os ligamentos interósseos ou o osso III metacarpiano são susceptíveis a alterações estruturais, as quais eventualmente poderiam atingir o LSB. Portanto, é considerada desmíte do LSB proximal só a alteração que tem origem no próprio ligamento, ou em sua entese no osso III MTC, ou uma combinação das duas (DYSON, 2007).

A desmíte do LSB proximal dos membros torácicos ocorre em cavalos de todas as raças e todas as disciplinas esportivas. Cavalos adultos de alta *performance* são susceptíveis de desenvolver a doença, no entanto os animais jovens que realizam amplos e exagerados movimentos praticando a modalidade adestramento têm maior predisposição (BOOTH, 2003; DYSON, 2007).

Atualmente, estas lesões junto com as lesões tendíneas dos músculos flexores constituem a maior causa de queda do *performance* em equinos atletas (CLEGG, 2011). Alguns levantamentos epidemiológicos feitos em cavalos durante a temporada de competição na modalidade *National Hunt*, na Inglaterra, mostraram valores de 46% de prevalência de lesões em tendões e ligamentos (CLEGG, 2012). Um estudo *coorte* retrospectivo feito em uma população de cavalos de corrida, durante o ano 1999 no Japão, mostrou que 11,01% desta população teve diagnóstico de lesões no tendão flexor digital superficial (TFDS) e 3,61% no LSB, com a maior prevalência associada a maior idade (KASASHIMA et al., 2004). Murray et al. (2006) mostraram em um estudo de *coorte* retrospectivo, realizado no *Animal Health Trust Hospital* que o LSB é o local anatômico mais acometido na maioria dos esportes, em cavalos de alto e médio desempenho. Entre as possíveis lesões do LSB, a desmíte proximal é a lesão predominante.

Como etiologia da desmíte tem-se considerado o trauma agudo ou a exposição do ligamento a forças de tensão repetitivas e lesivas, associadas a uma série de fatores como: incorreto balanceamento dos cascos, má conformação dos membros ou estado atlético abaixo da exigência da categoria do esporte (BOOTH, 2003; DYSON, 2007). Não obstante existe uma outra forma de desmíte do LSB, a desmíte degenerativa do ligamento suspensor (DSLSD), de etiologia e apresentação clínica diferente da anterior, afetando principalmente cavalos das raças Passo Fino, Passo Peruano, Árabe, Quarto de Milha (MERO, SCARLETT, 2005; SCHENKMAN et al., 2009) e alguns *warmblood* (MILLER, JUZWIAK, 2010).

Do ponto de vista acadêmico a DSLD é considerada separadamente, devido às várias hipóteses com respeito à etiopatogenia, além de ser uma doença de prognóstico reservado que pode comprometer a vida do animal, como consequência do processo degenerativo (MERO, SCARLETT, 2005; MILLER JUZWIAK, 2010). HALPER et al. (2006) identificaram em várias amostras de tecidos de animais com diagnóstico de DSLD, um acúmulo de proteoglicanos não caracterizados. No trabalho avaliaram por meio da histopatologia, microscopia eletrônica e cromatografia em gel, a presença de proteoglicanos em amostras de ligamento suspensor, nugal e patelar, tendões flexores, artérias aorta e coronárias e na esclera ocular, Os grupos estudados eram compostos por 28 animais com diagnóstico de DSLD, dos quais 22 foram de raça Passo Peruano e seis de outras raças e, o grupo controle era composto por mais oito animais. Os autores concluíram que a desmíte degenerativa do ligamento suspensor pode ser uma doença sistêmica que compromete os tecidos com alta quantidade de tecido conjuntivo. SCHWARZBACH et al., 2010 com o objetivo de propor uma ferramenta que ajudasse no diagnóstico clínico da DSLD, analisaram a possível associação entre o ângulo da articulação metacarpofalangeana (AMF) e a presença de acúmulo de proteoglicanos no ligamento nugal, encontrando associação destas duas variáveis em seis animais de 123 equinos avaliados.

Comumente, a forma de apresentação da desmíte proximal no membro torácico é com claudicação aguda, transitória, que pode se resolver em 24 horas, quando o animal não é submetido a trabalho intenso. A claudicação se mantém como leve ou moderada, nunca grave, a menos que a lesão seja extensa ou envolva a entese. Esta claudicação usualmente piora quando é avaliada no chão macio ou quando o membro acometido está do lado de fora na avaliação ao círculo. Quando a claudicação é leve pode ser percebida mais facilmente pelo cavaleiro, do que vista pelo observador (DYSON, 2000; 2007; BOOTH, 2003).

Devido à semelhança estrutural e molecular entre os ligamentos e tendões, são assumidos os mesmos conceitos com relação a patogênese e o processo de reparação destes tecidos, como também são utilizadas as mesmas ferramentas para diagnóstico e as mesmas estratégias terapêuticas (LUI et al., 2011; SMITH, McILWRAITH, 2012).

Geralmente, o diagnóstico é feito pelo histórico, exame clínico com associação da evidência radiológica e ultrassonográfica. A anestesia perineural dos nervos metacarpianos palmares medial e lateral ou do nervo palmar lateral na altura do osso acessório cárpico usualmente resulta na melhora da claudicação, com algumas variações individuais a serem analisadas em cada caso (DYSON, 2000; 2007; BOOTH, 2003).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA DESMITE E CICATRIZAÇÃO

A partir das alterações histológicas do tecido, existe um debate com referência ao termo que melhor define a lesão no ligamento; hoje na Medicina é mais aceito o termo desmopatia do que desmite, pois em alguns estágios da doença não há evidência histológica de células inflamatórias ou a presença dos sinais clínicos da inflamação. Como a ausência de células inflamatórias não exclui os componentes moleculares da cascata inflamatória no início da lesão, o termo desmite segue sendo utilizado (LUI et al., 2011; SMITH, McILWRAITH, 2012). O processo de lesão do LSB ocorre ao mesmo tempo que a etapa de reparação, sobrepondo uma etapa a outra; isto reflete o constante processo de reposição que ocorre em condições fisiológicas (MOLLOY, WANG, MURREL, 2003; DAHLGREN, 2007). As lesões no ligamento podem ser do tipo intrínseco ou extrínseco. São consideradas como intrínsecas as alterações que podem ocorrer como consequência do processo degenerativo. Lesões extrínsecas estão associadas a lacerações ou impactos traumáticos, provindos, por exemplo, de exercícios que excedem o limite de elasticidade do tecido ou forças de tensão repetitivas que alteram o metabolismo na MEC; não dando tempo suficiente ao mecanismo de reposição, gerando um estado acumulativo de dano (DAHLGREN, 2007).

A etiopatogenia da desmite é dinâmica e complexa, motivo de estudo e fonte de controvérsia e confusão, no entanto, ha concordância na hipótese que o início ocorre com o deteriorização da MEC. Atualmente, acredita-se que as células, em resposta a injúria são responsáveis pela produção de genes catabólicos das MMPs, aumento da apoptose e diminuição da produção de genes que expressam os TIMPs;

estas condições põem em risco a habilidade fisiológica de reparação do tecido, que conduz ao desequilíbrio (DAHLGREN, 2007). As MMPs são moléculas que estimulam a produção de fatores de crescimento e interleucinas, as quais ao mesmo tempo estimulam mais expressão de MMPs como também de células inflamatórias (leucócitos, macrófagos e plaquetas), estabelecendo assim a primeira fase do processo de inflamação-cicatrização. Esta primeira fase, imediatamente após a injúria, pode durar de uma a duas semanas dependendo da extensão da lesão. Ela está caracterizada pelo maior dano ao colágeno tipo I, à MEC, como também, à chegada de uma grande quantidade de substâncias e células inflamatórias, e pelo acúmulo de água, que determinam os sinais clínicos e preparam o tecido para a fase seguinte de proliferação (MOLLOY, WANG, MURRELL, 2003; DAHLGREN, 2007; VOLETI, BUCKLEY, SOSLOWSKY, 2012).

A fase de proliferação ou reparação, inicia-se poucos dias após a lesão e pode durar por várias semanas ou meses, dependendo do caso. É caracterizada pela chegada e acúmulo de células indiferenciadas, em resposta a fatores quimio-atraentes e elementos vasculares da primeira fase. Uma teoria propõe que a fonte dessas células progenitoras esta nos vasos sanguíneos, mas uma outra sugere que há uma mudança na morfologia dos fibroblastos ali presentes, em resposta a um aumento do metabolismo para produzir moléculas de reposição da MEC. O pico da fase de proliferação acontece após quatro semanas aproximadamente, e pode perdurar por 24 semanas após a injúria (DAHLGREN, 2007). Nesta fase, a expressão gênica do colágeno tipo III aumenta quando comparado com estados de reposição fisiológica, e na medida que avança o tempo de cicatrização este colágeno é substituído pelo tipo I (DAHLGREN, 2007; VOLETI, BUCKLEY, SOSLOWSKY, 2012).

A fase de remodelação inicia-se aproximadamente seis semanas após a lesão e progride por até 12 meses. Esta fase é crítica para a recuperação das características físicas e biomecânicas do tecido, pois as fibras de colágeno atingem o alinhamento dependendo das forças de tensão e, as uniões moleculares tipo *cross links* amadurecem ficando mais fortes, conferindo no tecido maior resistência; embora as propriedades mecânicas nunca se igualem as do tecido normal (MOLLOY, WANG, MURRELL, 2003; DAHLGREN, 2007).

A etiopatogenia e o processo de cicatrização têm sido objetos de estudo importantes na última década, com o propósito de encontrar os elementos críticos da cicatrização, que ajudariam a encontrar o ponto alvo de atuação da terapêutica, para obter um tecido mecanicamente mais parecido ao normal (SMITH, McILWRAITH, 2012). Alguns estudos procuram decifrar a grande participação dos fatores de crescimento, agindo como mediadores na resposta celular ou estimulando a produção de proteoglicanos, na modulação inflamação e no processo de reparação e remodelação (PARKINSON et al., 2011; VOLETI, BUCKLEY, SOSLOWSKY, 2012).

2.4 USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O PRP faz parte do grupo das terapias regenerativas biológicas autólogas (FORTIER, SMITH, 2008; TEXTOR, 2011). É definido como a concentração de plaquetas autólogas em um pequeno volume de plasma, rico em fatores de crescimento, contidos dentro dos grânulos- α das plaquetas (PLACHOKOVA et al., 2008; Mc CARREL, FORTIER, 2009), além de muitas outras proteínas e substâncias contidas nos grânulos delta e lambda (BOSWELL et al., 2012). A racionalidade atrás do uso do PRP, reside no fato que, a terapia com fatores de crescimento exógenos serve como meio para aumentar a resposta celular à lesão, contribuindo para uma melhor qualidade do tecido no processo de cicatrização. Além disso, acredita-se que com esta terapia pode-se estimular um processo de regeneração mais do que de reparação (DALHGREN, 2007; Mc CARREL, FORTIER, 2009; BOSCH et al., 2011). Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas incluem: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), dentre os mais relevantes como objetivo de investigação (PLACHOKOVA et al., 2008; Mc CARREL, FORTIER, 2009). Há ainda o fator de crescimento tipo insulina-1 (IGF-1) que recentemente foi considerado como um fator presente no plasma do PRP, mas não armazenado nas plaquetas (BOSWELL et al., 2012).

Os fatores de crescimento são moléculas peptídicas sinalizadoras, que em condições fisiológicas têm sido associadas a diversas funções biológicas, como regulação do metabolismo, proliferação e diferenciação celular, e regulação da produção de moléculas da MEC (MOLLOY, WANG, MURRELL, 2003; DALHGREN, MOHAMED, NIXON, 2005; FORTIER SMITH, 2008; DE ARO, VIDAL, PIMENTEL, 2012). As funções destas moléculas são melhor caracterizadas por meio do acompanhamento da cicatrização dos tecidos, especialmente dos tendíneos e ligamentares. Molloy, Wang, Murrell, (2003), em um trabalho de revisão, resumiram as principais funções dos fatores de crescimento no processo de cicatrização, explicando como o IGF-1 e o TGF- β têm sua fase de maior atividade na etapa da inflamação do processo de cicatrização, associando-se às funções como regulação da produção de moléculas de matriz, estimulação da proliferação e migração de células e, aumento da expressão de proteinases. As moléculas VEGF, PDGF e bFGF têm sua maior atividade na fase de proliferação e remodelação, com funções como promover a angiogênese, proliferação celular e, regular a produção dos proteoglicanos e outros fatores de crescimento.

Outros estudos comprovaram a participação destes fatores na cicatrização dos tecidos. Dalhgren, Mohammed, Nixon, (2005) depois de induzir tendinite com colagenase no TFDS de 14 equinos sadios, determinaram a expressão gênica de IGF-1, TGF- β , colágeno I e colágeno tipo III, por meio de análise bioquímica de DNA e GAGs, avaliação histológica e isolamento do RNA através de PCR. Estes autores observaram rápida elevação do TGF- β durante o estado inflamatório, associado a regulação da expressão gênica de moléculas de matriz, o que justificou os baixos níveis de DNA e glicosaminoglicanos encontrados nesta mesma fase. O pico de expressão de IGF-1 apareceu durante a fase de proliferação ou reparação, coincidindo com aumento nas concentrações de DNA e GAGs.

Em acordo com os resultados anteriores, Berglund et al. (2011), após avaliar mediante PCR amostras de tendão flexor profundo em coelhos, observaram que as concentrações de IGF-1 tiveram valores mais altos na fase de proliferação, três semanas após a indução da tendinite mecânica, que se mantiveram acima dos valores do grupo controle durante o período do experimento. Os valores para VEGF tiveram um pico na primeira semana e foram diminuindo gradativamente até serem

inferiores aos valores dos animais controle. Associado ao metabolismo dos fatores de crescimento, acredita-se que outras moléculas também participem do processo de cicatrização, como as MMPs e os TIMPs. Neste trabalho a expressão da MMP-13 sempre permaneceu com alta, acima dos valores controle, e manteve-se assim durante o tempo de avaliação. O inibidor TIMP-1 acompanhou este aumento, porém chegou a concentrações mais baixas após seis semanas. Esta MMP é associada a degradação do colágeno tipo I. A MMP-3 teve um aumento considerável três dias após lesão e depois houve uma diminuição das concentrações, assim como o inibidor TIMP-3.

A maioria dos trabalhos *in vitro* feitos em cultivos celulares a partir de tecido tendíneo e ligamentar, mostram como os fatores de crescimento exógenos, fornecidos com o PRP, possuem ação benéfica na resposta celular, associada ao aumento da expressão de moléculas da MEC, que conferem melhores características físicas ao tecido em recuperação (GEANEY et al., 2011).

Mc Carrel, Fortier, (2009) usando PCR como ferramenta de avaliação, compararam a expressão gênica para colágeno tipo 1 e 3 (COL1A1- COL3A1), COMP, decorim, MMPs 3 e 13, fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-BB, em células de TFDS e LSB de equinos cultivadas em diferentes meios. Foram observados cinco explantes de células do TFDS e LSB por placa, em um total de 6 placas como segue: PRP, concentrado comercial liofilizado de plaquetas (Lyophilized platelet product PP) coletado em ACD (acid-citrate-dextrose) e CPD (citrate-phosphate-dextrose), aspirado de medula óssea (BMA), sangue e 10% de plasma em DMEM. Os autores concluíram que as concentrações dos fatores de crescimento em ng/ml foram maiores nos cultivos para PRP e PP. Somado a isso, aumentaram a relação COL1A1/COL3A1, aumentaram as concentrações de COMP e diminuíram a expressão de MMP-13. A presença de leucócitos foi mais alta no cultivo com BMA a qual foi positivamente correlacionada com COL3A1, MMP-3 e MMP-13 e, negativamente com a relação COL1A1/COL3A1, COMP e decorim.

O PRP foi introduzido na medicina em 1998, na cirurgia maxilofacial, usado em combinação com implantes de osso autógeno, para reconstrução de defeitos mandibulares. Desde então, a investigação do uso do PRP tem sido extensiva. Na odontologia tem sido usado para vários procedimentos clínicos e cirúrgicos

(PLACHOKOVA et al., 2008). Plachokova et al. (2008), fizeram uma revisão sistemática com o objetivo de obter um forte nível de evidência para o uso do PRP como terapêutico em lesões odontológicas. A revisão foi iniciada com 108 publicações, das quais só nove cumpriram os critérios de inclusão. Devido à pluralidade dos trabalhos não foi possível realizar uma metanálise, porém eles encontraram evidência moderada no uso do PRP em defeitos periodontais, com resultados positivos na neoformação e união óssea, avaliados clinicamente.

Em outras áreas da Medicina há opiniões divergentes, alguns trabalhos de revisão tanto de literatura quanto revisões sistemáticas possuem o conceito que, apesar dos efeitos benéficos do PRP demonstrados atualmente, o uso clínico não tem suporte. Isso ocorre devido a variedade nos efeitos clínicos, consequência da falta de padronização dos protocolos de obtenção, concentração do número de plaquetas, procedimentos de administração e tecidos alvo para o tratamento. Além disso as pesquisas não tem poder estatístico que documentem as diferenças, pelo pequeno número de participantes. Na Medicina há a necessidade de estudos prospectivos, randomizados, controlados e duplo cego com os requerimentos para oferecer o poder estatístico apropriado. (FOSTER et al., 2009; SANCHEZ et al., 2009; TAYLOR, 2011).

Na Medicina Veterinária particularmente em equinos, também há a necessidade de trabalhos com nível mais alto de evidência. A grande dificuldade econômica e a falta de possibilidade de encontrar um número de participantes que confirmem o poder estatístico das diferenças dos resultados, entre os grupos tratados e os controles, tornam mais difícil a execução deste tipo de estudo. Além disso, ainda há muitas dúvidas a serem esclarecidas com os trabalhos experimentais (FORTIER, SMITH, 2008; TEXTOR, 2011; SMITH, McILWRAITH, 2011).

Existe na atualidade uma grande variedade de estudos experimentais em equinos que incluem vários protocolos de obtenção do PRP, diferentes tempos de aplicação intralesional pós-lesão, diferentes tecidos avaliados, não obstante todos com resultados benéficos. MAIA et al. (2009), em modelo de tendinite do TFDS induzida com colagenase, 12 dias após a lesão, aplicaram 2,5 ml de PRP com uma concentração média de 400×10^3 plaquetas/ μ l, obtido a partir de 81 ml do sangue,

após três centrifugações, com ativação do cloreto de cálcio 0,125 mol/L e incubação de duas horas entre 20-22°C. Os resultados histológicos quando comparados com o membro contralateral (grupo controle), mostraram um tecido mais organizado e uniforme com relação ao alinhamento do colágeno e os fibroblastos.

Bosch et al. (2011) partiram da hipótese que a pouca vascularização dos tendões poderia ser considerada como uma das razões para o limitado potencial de cicatrização. Baseados na teoria que o fator de crescimento VEGF é um potente estimulador angiogênico, avaliaram a influência do VEGF exógeno fornecido no PRP. No trabalho utilizaram seis cavalos, nos quais induziram tendinite cirúrgica no TFDS nos dois membros torácicos, usando um membro para tratamento e outro como controle. O PRP foi obtido com o uso de um sistema disponível comercialmente, e 3ml do produto foi injetado intralesional, uma semana após indução da tendinite. Os tecidos tendíneos foram avaliados por ultrassonografia e *doppler*, e após eutanásia os tecidos foram submetidos à análise imunoistoquímica para fator VII. Os resultados evidenciaram aumento do fluxo sanguíneo durante todo o experimento e um aumento, principalmente, na quinta semana no grupo tratado. Após 24 semanas da lesão o grupo tratado demonstrou número maior de vasos sanguíneos, como também uma organização de células endoteliais fator VII positivas, reconhecíveis como estruturas vasculares, diferentes dos agregados de células endoteliais observadas no grupo controle.

Em outro estudo com metodologia similar a anterior, Bosch et al. (2010), na semana 24 de experimento, fizeram avaliação clínica para estabelecer o grau de dor entre o grupo tratado (um membro torácico) e o controle (membro contralateral). Após eutanásia dos seis animais colheram o tecido tendíneo e o submeteram à análise bioquímica, biomecânica e histológica. Não houve diferença significativa nos resultados, quanto ao grau de dor dos membros tratados comparados com os controle, porém os membros tratados tiveram uma quantidade significativamente maior de colágeno e GAGs. Nos testes biomecânicos os tendões tratados com o PRP suportaram forças de tensão maiores de 9,36 +/- 2,22 Mpa (megapascasles), como também o módulo de elasticidade foi maior no grupo tratado com PRP.

Ao contrário dos resultados evidentemente positivos obtidos nos estudos experimentais, em alguns relatos de séries de casos clínicos os pacientes não

mostraram uma resposta satisfatória contundente, dificultando a inferência de resultados absolutamente benéficos do PRP (ARGUELLES et al., 2008; WASELAU et al., 2008; CASTELIJNS et al., 2011). Arguelles et al. (2008) usaram concentrado autólogo de plaquetas para tratar cinco cavalos com lesões tendíneas e ligamentares, três deles com lesão do LSB e dois com lesão do TFDS. Os resultados mostraram que os animais que sofreram a lesão no LSB não tiveram mudanças ultrassonográficas evidentes, embora tivessem apresentado uma melhora no grau de claudicação e na resposta ao teste de flexão. Além disso, todos os animais retornaram ao nível do desempenho esportivo anterior à lesão e não tiveram recidivas após 20 meses.

2.5 USO DE LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LOW LEVEL LASER THERAPY- LLLT) EM EQUINOS

O LASER (light amplification by stimulated emission of radiation) de baixa intensidade é uma modalidade fisioterapêutica utilizada em humanos e animais, para o tratamento de feridas, lesões de tecidos moles e controle da dor (PETERSEN et al., 1999; MARINI et al. 2013). Acredita-se que seus efeitos são mais fotoquímicos do que térmicos, pois os poucos níveis de irradiação não geram consideráveis aumentos de temperatura. A teoria fotoquímica, a qual ainda não é totalmente aceita, postula que a luz absorvida interage com os cromóforos (moléculas orgânicas) que podem modular a atividade celular. Os tipos de LASER comumente usados são: Hélio-Neon 633 nm, diodo gálio-alumínio-arsênico de comprimento de onda entre 405 a 904 nm e laser CO₂, desfocalizado com grandes comprimentos de onda. Recomenda-se o uso do LASER de luz vermelha visível para tratar tecidos superficiais, e LASER de luz infra-vermelha para tratar lesões mais profundas do sistema locomotor (RYAN, SMITH, 2007; PETERSEN et al., 1999).

A laserterapia é preconizada nas tendinites por acelerar a resolução do processo inflamatório, e estimular os fibroblastos à migração e à síntese de colágeno (PARIZOTTO, 1998). Buchner, Schildboeck, (2006) em um trabalho de revisão sobre fisioterapia de equinos, afirmaram que o LASER de baixa intensidade

tem sucesso variável. Após analisar vários estudos experimentais e observacionais em humanos e equinos, argumentaram que seriam necessários estudos clínicos que confirmassem a evidência do uso do LLLT. Embora a falta de evidência científica dos tratamentos com sucesso, não significa que a terapia não possua valor médico, pois existem várias explicações possíveis para esta falta de evidência; dentre elas estão a não adequação dos parâmetros de avaliação dos tratamentos e, o fato dos estudos clínicos randomizados controlados serem custosos e demorados. Petersen et al. (1999) justificam esta perspectiva, com seu trabalho prospectivo de *coorte* aleatorizado e controlado, feito em seis cavalos. Após induzir uma ferida cirurgicamente, os cavalos foram submetidos ao tratamento com LASER Ga-Al-As de 830 nm, na dose de $2\text{J}/\text{cm}^2$. Baseados nos resultados, os autores discutiram a falta de significância estatística, pois com o número pequeno de indivíduos não foi possível estabelecer a diferença significativa entre tratados e controle. Porém, a observação clínica dos casos tratados revelou melhora quando comparados com os controles, o que evidencia neste estudo a perda de significância estatística devido ao limitado número de participantes (n), mas com alguma significância clínica evidenciada pela melhora desses sinais clínicos.

Ryan, Smith, (2007) concordaram com a variabilidade de resultados nos diferentes estudos analisados, no entanto explicaram que as diversas formas de uso do LASER, justificam essa diferença na resposta. Assim propuseram que a transmissão de onda do LLLT em equinos poderia aumentar tosando, limpando com pano, ou limpando com álcool a área da pele a ser tratada. Para isto utilizaram um sensor de luz que detecta ondas entre 600 e 1300 nm de comprimento de onda, em nove cavalos de diferentes pelagens. Concluíram que é necessário tosar e limpar a pele dos equinos antes de usar o LLLT para obter-se maior penetração de onda.

O uso do laser terapêutico para cicatrização de tendões em equinos foi investigado por alguns autores, mas o comprimento de onda, a duração do tratamento e a dose de energia utilizados nestes experimentos não mostraram diferenças entre os membros tratados e não tratados (KANEPS et al., 1984; MACHADO et al, 2000).

Já em estudo abordando o reparo tendíneo em ratos com a utilização do LASER, demonstrou-se que as lesões tratadas apresentaram qualidade muito

superior de cicatrização quanto à qualidade das fibras, além de tempo de reparo menor do que as lesões não tratadas. Este mesmo estudo, demonstrou que conforme as diferentes doses de energia utilizadas diferentes efeitos são observados, sugerindo que os efeitos sejam dose dependentes (PARIZOTTO, 1998).

Mikail (2008) observou que o LASER de arsenito de gálio na dose de $20\text{J}/\text{cm}^2$ mostrou-se efetivo em acelerar a reparação da lesão tendínea em membros torácicos de equinos quando avaliados após 30 dias do aparecimento da lesão.

Na Medicina o âmbito é diferente, a partir da década dos anos 60 os LASER de baixa energia têm sido usados no tratamento de lesões e inflamação dos tecidos moles. Os primeiros estudos reportando benefícios no tratamento de lesões tendíneas apareceram na década dos anos 80. Na atualidade existe uma vasta quantidade de ensaios clínicos randomizados, validando o uso do LLLT em tendinopatias, porém estes estudos são caracterizados pela variabilidade nas doses usadas e os tipos de lesão tratadas.

Tumilty et al. (2010) fizeram uma revisão sistemática com metanálise dos dados, com o intuito de responder a pergunta, se a terapia com LLLT era efetiva no tratamento das tendinopatias. Para isto estabeleceram três objetivos no estudo, que caracterizariam os critérios de inclusão, na seleção dos ensaios. Estes objetivos foram, determinar a efetividade clínica do tratamento, a relevância dos parâmetros de irradiação e, a validade das doses recomendadas pela associação mundial de terapia LASER (WALT). Após a seleção de 663 trabalhos publicados e, aplicando os parâmetros de exclusão, só 25 estudos foram validados. Os autores concluíram que os achados oferecem evidência contraditória para a efetividade clínica do tratamento de tendinopatias, porém, houve uma clara relação entre resultados positivos e o uso das doses recomendadas. Embora os achados não sejam concluintes nos resultados clínicos, existe grande interesse na investigação desta ferramenta terapêutica, não invasiva e aparentemente não lesiva no tratamento de lesões tendíneas (TUMILTY et al., 2010).

Não foram encontrados trabalhos abordando a utilização do LASER como tratamento de lesões na região proximal do LSB. Como nas lesões ligamentares em

equinos, os principais desafios são reduzir o tempo de cicatrização, diminuir a dor e proporcionar uma cicatriz de alta qualidade (quanto à quantidade de fibras de colágeno e seu paralelismo), a utilização do LASER pode ser promissora.

2.6 UTILIZAÇÃO DE SISTEMA DE SENSORES INERCIAIS PARA ANÁLISE CINEMÁTICA DO TROTE

A avaliação subjetiva feita por um veterinário especializado na espécie equina, é o método padrão para o diagnóstico de claudicação. Uma das formas utilizadas para esta avaliação é seguir a escala de zero a cinco proposta pela AAEP (American Association of Equine Practitioners) para classificação do grau de claudicação. No entanto, as diferenças em habilidades e experiência por parte dos avaliadores pode confundir os limites entre os níveis da escala de gravidade, como também o lado do membro acometido quando a claudicação é moderada (KEEGAN, 2007; McCRACKEN et al., 2012). Alguns estudos tem mostrado que os avaliadores podem estar influenciados ou ter tendência para observar melhora da claudicação durante as avaliações que incluem bloqueios, o que poderia afetar a identificação e localização precisa da origem da dor, interferindo o sucesso do tratamento (McCRACKEN et al., 2012).

Estas razões suportam o recente uso de sistemas objetivos de avaliação, os quais vêm se desenvolvendo nas últimas décadas. Estes sistemas estão baseados na análise biomecânica do equino através de duas perspectivas relacionadas, a cinética e a cinemática (McCRACKEN et al., 2012). A avaliação cinética tenta definir e mensurar as forças que causam um movimento particular, que no caso da análise de um animal com claudicação, é fácil compreender: um aumento na claudicação representa uma diminuição do apoio, e uma resultante diminuição da força de reação da superfície que age no membro. A avaliação cinemática está relacionada com o estudo da descrição do movimento. Neste contexto a cinemática descreve o movimento e a cinética explica o movimento (KEEGAN, 2007).

A cinemática em equinos avalia as características espaciais e temporais do movimento dos animais sem referência às forças. Para isto, geralmente são usados

equipamentos complexos, muito caros, que incluem análise com sistemas de vídeo realizados em esteira, que levam muito tempo para operá-los. Para fins práticos foi desenvolvido um sistema de sensores inerciais sem fio (*Lameness Locator*®) que permite a avaliação cinemática de várias passadas em equinos com claudicação trotando sobre o piso de concreto (KRAMER et al., 2004; KEEGAN, 2007; KEEGAN, BAXTER, 2011; McCracken et al., 2012).

Segundo Keegan (2007), através das pesquisas foram estabelecidos múltiplos parâmetros que permitiram criar uma lista ampla e variada de parâmetros com índices cinemáticos que diferem significativamente entre animais hígidos e aqueles com claudicação. Nos membros torácicos a claudicação causa um aumento na assimetria do movimento vertical da cabeça (aceleração e deslocamento), entre os passos do membro esquerdo e direito quando comparados. Nos membros pélvicos, a claudicação causa um aumento na assimetria do movimento de aceleração vertical e deslocamento da pélvis completa, entre os passos dos membros esquerdo e direito, quando comparados. Também aumenta a assimetria no deslocamento total das tuberosidades coxais esquerda e direita em relação uma da outra. Sendo assim, quando o membro pélvico claudicante está em apoio, a pélvis completa desce menos quando comparado com o membro sadio. Os músculos extensores se contraem para diminuir o movimento descendente da metade posterior do corpo, e em consequência, a força aplicada sobre o membro afetado durante o apoio. O membro claudicante também puxa menos a pélvis durante e depois da última metade da fase de apoio, o que faz com que a pélvis se eleve menos. Outras diferenças na claudicação incluem, uma diminuição da extensão da articulação metacarpo/metatarso falangeana, como também diminuição da flexão da articulação interfalangeana distal na metade do apoio. Bem como uma diminuição na retração no membro torácico e diminuição da protração no pélvico. Mesmo no membro pélvico ocorre uma diminuição da flexão tarsal durante o apoio.

O sistema de sensores inerciais utiliza acelerômetros localizados no animal, na cabeça (fixados ao cabresto), e no meio das tuberosidades sacras (fixados com fita adesiva), para detectar os sinais de aceleração vertical. As fases de apoio direita e esquerda são detectadas por um giroscópio fixado ao membro torácico direito, dorsal na quartela. Os sinais dos três sensores, são transmitidos sem fio em uma

frequência de 200Hz para um computador, onde um sistema de algoritmos desenhado especialmente, baseado na detecção de falha, quantifica a perturbação da simetria do movimento vertical de cabeça e pélvis (KEEGAN, 2007; McCracken et al., 2012).

A gravidade da claudicação e o membro acometido são reportados por meio das seguintes variáveis: $A1/A2$, que é o resultado da amplitude do movimento vertical da cabeça e pélvis associado à claudicação, dividido pela amplitude esperada do movimento vertical normal da cabeça e pélvis; *mindiff*, que é a diferença entre o mínimo de alturas atingidas da cabeça durante o apoio dos membros torácicos esquerdo e direito, ou o mínimo de alturas atingidas da pélvis durante o apoio dos membros pélvicos esquerdo e direito; *maxdiff* é a diferença entre o máximo de alturas atingidas da cabeça após a fase de apoio dos membros torácicos esquerdo e direito, ou o máximo de alturas atingidas da pélvis, após a fase de apoio dos membros pélvicos esquerdo e direito. (KRAMER et al., 2004; KEEGAN, BAXTER, 2011; McCracken et al., 2012). Durante um passo são considerados dois ciclos completos, assim a primeira mínima altura é atingida durante a metade do apoio do primeiro membro e a primeira altura máxima imediatamente depois do fim do apoio do mesmo. As segundas mínima e máxima alturas ocorrem durante a metade e imediatamente após ao fim da fase de apoio do membro contralateral (KRAMER et al., 2004).

Por definição, valores serão positivos para o *mindiff* e o *maxdiff* quando houver claudicação do membro direito, e serão negativos para claudicação do esquerdo. A média destes valores é determinada pela soma do *mindiff* ou *maxdiff* dividido pelo número de passos por ensaio, respectivamente. É necessário que o desvio padrão seja menor do que a média para considerar os resultados consistentes (KRAMER et al., 2004; KEEGAN, BAXTER, 2011).

2.7 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA NO DIAGNÓSTICO DA DESMITE PROXIMAL DO LSB

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico da desmíte proximal do suspensor do boleteo, usando combinações de modalidades avançadas de imagem como tomografia computadorizada, cintilografia e ressonância magnética, a ultrassonografia permanece como a técnica de imagem mais frequentemente utilizada para se examinar o aspecto proximal do LSB e monitorar lesões durante o período de recuperação (ZAUSCHER et al., 2013). No entanto, a ultrassonografia é técnico-dependente e a precisão no diagnóstico vai depender da destreza do operador, somente obtida com a experiência (ÇELIMLI, SEYREK-INTAS, KAYA, 2004; NEELIS, ROBERTS, 2012).

Devido à posição do LSB e sua complexa anatomia, a avaliação ultrassonográfica da região proximal é um verdadeiro desafio. As principais dificuldades estão relacionadas ao efeito anisotrópico, onde a disposição das fibras de colágeno faz com que a ecogenicidade do tecido dependa do ângulo da posição do transdutor. Assim, se a posição do transdutor está perpendicular ao eixo longitudinal, a ecogenicidade se mantém, se o ângulo é mudado, a imagem será hipo ou anecóica. A ecogenicidade do tecido muscular e gorduroso é independente da movimentação do ângulo do transdutor. Estas características são importantes na avaliação das mudanças no tecido, compatíveis com lesões (KLAUSER, PETROONS, 2010; NEELIS, ROBERTS, 2012; WERPY, DENOIX, 2012).

A avaliação padrão do LSB na região proximal, inclui imagens longitudinais e transversais, adquiridas no aspecto palmar da região metacarpiana, com o uso do transdutor linear de 7,5 até 12,0 MHz. O limite dorsal deverá ser a margem palmar hipercóica do osso III MTC. O LSB tem aparência difusa, criada por regiões hipocóicas no corte transversal, e por regiões com fibras não alinhadas no corte longitudinal. Uma avaliação completa inclui imagens nos cortes transversais e longitudinais em intervalos regulares, obtendo dados da forma, tamanho, margens, ecogenicidade e alinhamento das fibras. Como complemento do exame padrão a região proximal do ligamento pode ser avaliada com o membro em flexão, pois a

flexão do carpo relaxa as estruturas palmares, permitindo maior área de contato, obtendo-se assim uma imagem mais completa de medial para lateral. Além disso, com o membro em apoio, o transdutor também deve ser levado para os dois sentidos permitindo observar as margens lateral e medial (WERPY, DENOIX, 2012).

Na avaliação do LSB, a configuração da área de lesão é dependente da experiência do operador, revestindo de especial importância para o diagnóstico, a comparação dos dados das mensurações do tamanho e a área transversal da estrutura com o membro contralateral (WERPY, DENOIX, 2012). Çelimli, Seyrekintas, Kaya, (2005) utilizando 62 cavalos da raça Árabe e 15 da raça Puro Sangue Inglês, mediram a distância lateromedial e palmarodorsal, a circunferência e a área transversal do tendão flexor digital superficial, tendão flexor digital profundo, ligamento acessório do tendão flexor digital profundo e do ligamento suspensor do boleto. A partir dos resultados obtidos estabeleceram um padrão para raça e sugeriram que fatores como o nível de treinamento e competição poderiam influenciar no tamanho destas estruturas, o que poderia ser de maior utilidade no diagnóstico de lesões.

Recentemente, Zauscher et al. (2013) analisaram a variabilidade intra e inter observador nas medições ultrassonográficas do aspecto proximal do LSB. Uma precisão aceitável dentro e entre os operadores foi identificada apenas para a espessura dorsopalmar/plantar em imagens longitudinais e transversais. Para a largura lateromedial, área transversal e circunferência, uma grande variabilidade foi identificada. Logo, recomendaram que a utilização destes parâmetros devam ser utilizados com cautela para a medição objetiva do LSB a partir da imagem ultrassonográfica transversal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência do PRP e do PRP associado ao LASER terapêutico, no processo de cicatrização do LSB. Avaliar clinicamente a evolução da resposta inflamatória do tecido, e analisar ultrassonograficamente as características morfológicas da estrutura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar o processo de cicatrização por meio da evolução dos sinais clínicos da lesão ao LSB frente aos diferentes tratamentos.
- Acompanhar por análise cinemática com o uso do sistema de sensores inerciais (*Lameness Locator*®) a presença de claudicação no membro lesionado.
- Acompanhar o processo de cicatrização da lesão no LSB por meio ultrassonográfico.
- Obter amostras de tecido ligamentar oito semanas pós-lesão, mediante o procedimento de biopsia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolado sob o nº2284/2011, seguindo os princípios éticos nacionais e internacionais de experimentação em animais. Para os procedimentos invasivos como aplicação de colagenase, infiltração do PRP e realização da biopsia, os cavalos foram sedados com 0,015 mg/kg de detomidina a 1%, seguida de anestesia local por infiltração perineural com 3ml mepivacaina a 3%, sem vasoconstritor. Após a biopsia, foi administrado anti-inflamatório não esteróide para promover ação analgésica e redutora de edema; o princípio ativo foi fenilbutazona na dose de 4,4mg/kg, a cada 24 horas.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Animais: Foram utilizados 18 equinos adultos, machos e fêmeas, com idades entre três e dezoito anos, sem raça definida (SRD), com peso médio de 363 Kg (Quadro 1). Os animais não tinham histórico de lesões do LSB e, não foram encontradas evidências de lesão durante a avaliação física e ultrassonográfica da estrutura em toda a sua extensão. Em um dos membros torácicos de cada um dos 18 animais, foi produzida experimentalmente desmíte da região proximal do LSB através da injeção de colagenase. O membro contralateral foi utilizado para outro estudo experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de seis animais:

Controle (G1): não foi administrado tratamento local para a desmíte do ligamento suspensório.

PRP (G2): injeção intralesional com plasma rico em plaquetas (PRP) três semanas após a indução da desmíte.

PRP-LASER (G3): injeção intralesional com plasma rico em plaquetas (PRP) três semanas após a indução da desmíte, associado a tratamento com LASER terapêutico de baixa intensidade, iniciada duas semanas após indução.

Quadro 1 - Descrição dos animais utilizados no estudo segundo grupo, raça, sexo, idade (anos), peso (kg) – São Paulo – 2012/2013

| | GRUPO | RAÇA | SEXO | IDADE | PESO | GRUPO |
|----|-------|------|------|-------|------|-------|
| 1 | 1 | SRD | F | 14 | 413 | G1 |
| 2 | 1 | SRD | F | 9 | 345 | G1 |
| 3 | 1 | SRD | F | | 360 | G1 |
| 4 | 1 | SRD | F | 18 | 380 | G1 |
| 5 | 1 | SRD | F | 16 | 405 | G1 |
| 6 | 1 | SRD | F | 9 | 360 | G1 |
| 7 | 2 | SRD | F | 15 | 330 | G2 |
| 8 | 2 | SRD | F | 5 | 390 | G2 |
| 9 | 2 | SRD | F | 16 | 310 | G2 |
| 10 | 2 | SRD | F | 6 | 360 | G2 |
| 11 | 2 | SRD | F | 9 | 360 | G2 |
| 12 | 2 | SRD | F | | | G2 |
| 13 | 3 | SRD | F | 8 | 400 | G3 |
| 14 | 3 | SRD | M | 8 | 365 | G3 |
| 15 | 3 | SRD | F | 8 | 360 | G3 |
| 16 | 3 | SRD | M | 8 | 360 | G3 |
| 17 | 3 | SRD | M | 8 | 400 | G3 |
| 18 | 3 | SRD | M | 8 | 380 | G3 |

4.2.1 Procedimentos clínicos

4.2.1.1 Anestesia local

Imediatamente antes da injeção de colagenase, da infiltração de PRP e também para obtenção da biopsia, fez-se a injeção perineural para bloqueio do nervo lateral palmar conforme a seguinte descrição:

Após limpeza e desinfecção da pele com clorexidina degermante 2% e álcool etílico 70%, uma agulha de 26G x 1,2 cm foi introduzida na face medial do membro e na base do osso acessório do carpo, direcionada levemente no sentido laterodorsal. Neste local foram injetados 3 ml de mepivacaina a 3% (Mepivacarpule 1,8ml), sem vasoconstritor (Figura 1).

O nervo palmar lateral emite um ramo profundo que inerva o LSB proximal. O nervo palmar lateral é uma anastomose formada pelos ramos palmar do nervo ulnar e lateral do nervo mediano (Figura 2).

Figura 1 – Imagem ilustrando o local do bloqueio da região proximal do LSB

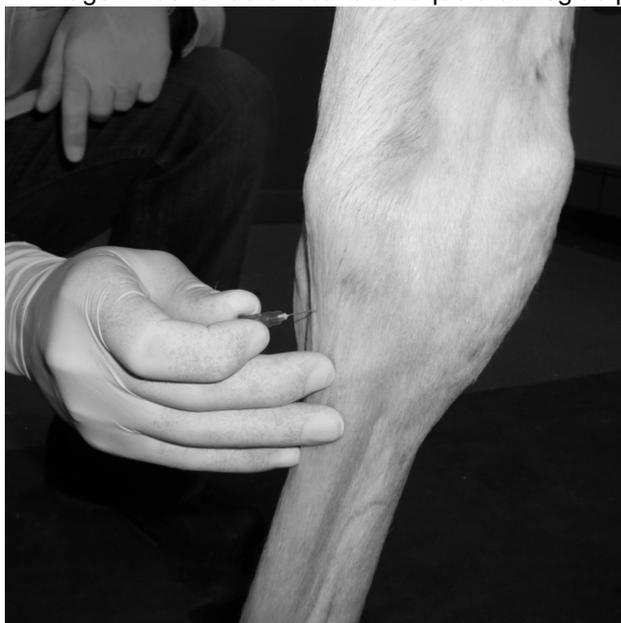
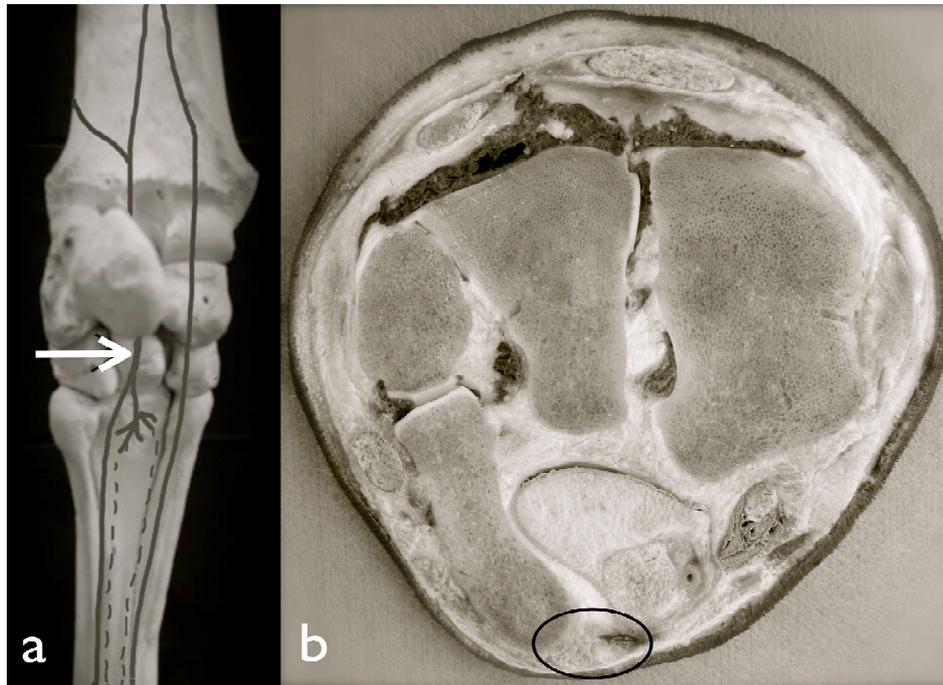


Figura 2 - Imagem mostrando o nervo palmar lateral



Fonte: RAMIREZ RAMOS, P. A. 2013

Legenda - a. Esquema mostrando o nervo palmar lateral (seta), na região distal do osso acessório cárpico, o qual foi infiltrado com mepivacaina para produzir anestesia da área proximal do LSB, e da região lateral do metacarpo. b. Foto do corte transversal na região distal do osso acessório cárpico, mostrando o mesmo nervo (circulo)

4.2.1.2 Infiltração guiada pelo ultrassom

Esta técnica foi utilizada tanto para a infiltração da collagenase e do PRP quanto para a obtenção da biópsia.

Inicialmente foi feita a tricotomia da região palmar e lateral do membro, com lâmina nº 50, visando obter a maior qualidade na imagem. No aparelho de ultrassom a imagem foi configurada para a profundidade de 4 cm, com o foco na parte superior, com ganho geral de 67%. O transdutor linear de 7,5 MHz foi coberto com uma luva estéril de tamanho 8,5, com 10 ml de gel no seu interior. Após limpeza e desinfecção do local, o membro foi posicionado em flexão de 90°, o transdutor colocado lateral aos tendões flexores, em posição longitudinal e levemente obliquo com respeito ao eixo longitudinal das fibras do ligamento, deslocando com ele os

tendões flexores, para uma visualização direta do LSB. Nesta posição 0,5 cm distal ao transdutor foi introduzida a agulha espinhal ou a agulha de biopsia, a qual foi vista e seguida na tela até o fim do procedimento. A entrada da agulha na pele foi de 11 a 13 cm distal ao osso acessório cárpico, avançando 3 a 4 cm na direção proximal, alcançando a região proximal do LSB, 7 cm distal do osso acessório cárpico (Figura 3).

Figura 3 - Foto ilustrando a região da entrada da agulha de biopsia no LSB



Fonte: RAMÍREZ RAMOS, P. A. 2013

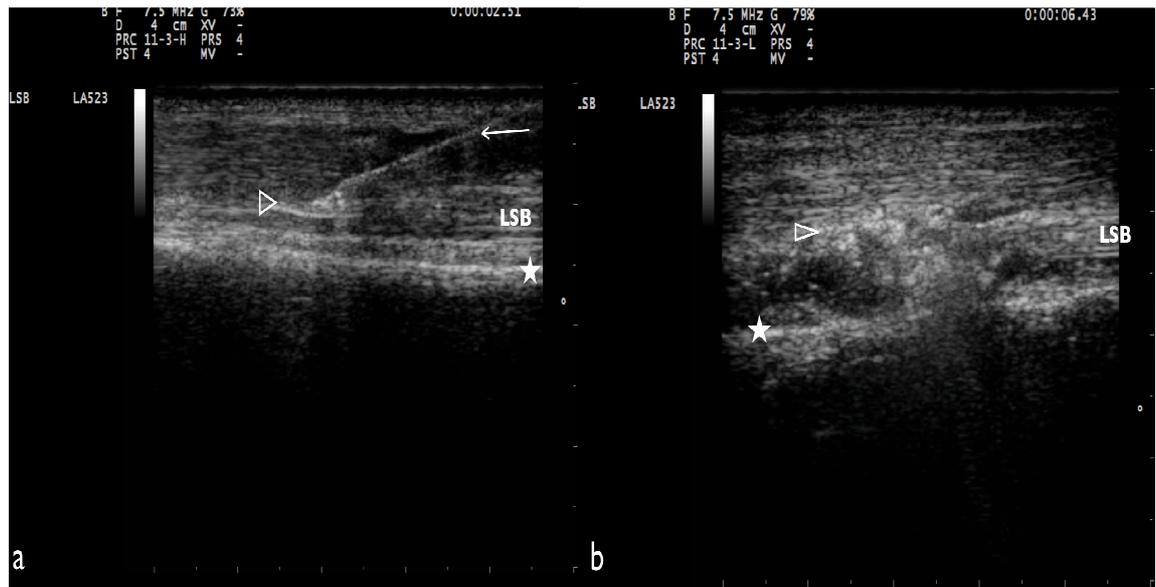
Legenda - a. entrada da agulha de biopsia, lateral aos tendões flexores e palmar ao LSB. b. Foto ilustrando o posicionamento do transdutor e a entrada da agulha de biopsia no LSB

4.2.1.3 Infiltração com colagenase para indução da desmíte do LSB

Todos os animais foram sedados com detomidina a 1%, na dose 0,015 mg/kg, por via intravenosa (i.v.). Após anestesia local por infiltração perineural, uma agulha espinhal 18G x 9 cm, guiada por imagem ultrassonográfica foi introduzida até chegar no LSB parte proximal. A 7 cm distal do osso acessório cárpico foi aplicado 1ml (3,5 mg/ml-3,5 UI) de solução de colagenase (C0130 Sigma-aldrich), sendo observado

na imagem ultrassonográfica aumento da ecogenicidade entre as fibras do ligamento, confirmando o produto no local (Figura 4). O método para indução da desmíte do LSB proximal foi modificado do modelo utilizado por DALHGREN, MOHAMMED, NIXON, (2005; 2006).

Figura 4 – Foto da imagem ultrassonográfica da entrada da agulha no LSB



Fonte: RAMIREZ RAMOS, P. A. 2013

Legenda - a. Foto da imagem ultrassonográfica ilustrando a entrada da agulha (seta) no LSB, região proximal, iniciando o depósito de collagenase no local (cabeça de seta), a linha hiperecótica que mostra a fase palmar do osso III MTC (estrela). b. Foto ilustrando a imagem ultrassonográfica, após o depósito de collagenase no LSB (cabeça de seta). Nota-se o material hiperecótico

4.2.1.4 Protocolo para obtenção do PRP

Após punção da veia jugular externa, de cada animal, foram colhidos 27 ml de sangue, em seis tubos de vidro com capacidade para 4,5ml, contendo anticoagulante citrato de sódio a 3,8%. As amostras de sangue foram homogeneizadas. Um dos tubos foi reservado para realizar o hemograma. Os outros cinco tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 120G e temperatura de 20°C. Depois, em câmara de fluxo laminar, o plasma de cada tubo foi transferido para um tubo falcon de 15 ml sem anticoagulante, procedendo a segunda centrifugação por 10 minutos a 400G a temperatura de 20°C. Após, foi descartado 80% do volume,

sendo a fração remanescente denominada PRP, deixada em repouso para evitar a agregação plaquetária a temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, procedeu-se a uma homogeneização suave e constante realizada por um homogeneizador para tubos até o momento da aplicação. Deste tubo contendo o PRP foi extraída uma alíquota de 0,5 ml para contagem manual da concentração de plaquetas.

4.2.1.5 Aplicação do PRP

Três semanas após a indução da desmíte, 1 ml de PRP, contendo uma concentração de plaquetas acima de 300.000 células/ml (BOSWELL et al., 2012) foi injetado na lesão. A injeção foi feita através de uma agulha introduzida com o auxílio de imagens ultrassonográficas com o objetivo de assegurar o correto posicionamento da agulha. Após o procedimento, o local da infiltração foi coberto com uma bandagem protetora por quatro dias.

4.2.1.6 Protocolo do uso do LASER terapêutico de baixa intensidade

Duas semanas após a indução da desmíte e uma semana antes do tratamento com o PRP os animais do G3 iniciaram o tratamento com LASER. Foi utilizado aparelho de baixa intensidade, do tipo diodo semiconductor Ga-Al-As (904nm), densidade de energia 2J/cm², potência 500 mW, comprimento de onda 904 nm, área do feixe de 1,04 cm², com o seguinte protocolo: as duas primeiras semanas foi feita uma aplicação a cada 48 horas e, a partir da terceira semana foi feita uma aplicação semanalmente até a oitava semana. Para a aplicação o aparelho era posicionado perpendicular à pele, em três pontos diferentes, um ponto palmar, um lateral e um medial com respeito à área de lesão no LSB proximal, 7 cm distal ao osso acessório cárpico.

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

O exame físico foi feito uma vez por semana, desde imediatamente antes da indução da desmíte e até o dia da biopsia. Com a inspeção visual e por palpação foi possível determinar o aumento de volume e a presença de edema na área lesada (tumor), a presença de calor (calor) e a resposta do animal à pressão sobre o LSB na região proximal (dor). A pressão digital foi aplicada com o polegar sobre região palmar do membro após deslocar com o polegar os tendões flexores em direção medial. Para a detecção da claudicação, os animais foram inspecionados enquanto moviam-se ao trote em linha reta, sobre piso duro. Utilizaram-se escalas de graus para as variáveis dor à palpação, aumento da temperatura, aumento de volume (Quadro 2) e claudicação (Quadro 3). Com uma fita métrica foi mensurado a circunferência da região proximal da canela onde a desmíte havia sido induzida.

Quadro 2 - Escala utilizada para a avaliação do grau de dor, aumento de temperatura e aumento de volume na área de indução da desmíte

| ESCORE | DESCRIÇÃO |
|--------|-----------|
| 0 | Normal |
| 1 | Leve |
| 2 | Moderada |
| 3 | Grave |

Quadro 3 – Escores utilizados para avaliação da presença ou não de claudicação do membro

| ESCORE | DESCRIÇÃO |
|--------|-----------------|
| 0 | Sem claudicação |
| 1 | Claudicação |

4.4 AVALIAÇÃO DE CLAUDICAÇÃO COM O USO DE SISTEMA DE SENSORES INERCIAIS SEM FIO (*LAMENESS LOCATOR*®)

O exame de claudicação com o uso do *Lameness Locator*® (LL) foi feito a cada semana, tendo início antes da indução da desmíte e terminando no dia da biopsia.

De acordo com as recomendações do fabricante, o sensor da cabeça foi fixado na linha mediana dorsal sobre a crista nugal, o sensor pélvico foi fixado na linha mediana dorsal sobre as tuberosidades sacrais, e o terceiro sensor foi fixado no dorso da quartela do membro torácico direito (Figura 5). O exame foi realizado trotando o animal conduzido pelo cabresto, em linha reta por aproximadamente 35 m, sobre piso plano de concreto.

Os dados foram analisados com o programa específico do LL. Os seguintes critérios foram utilizados para indicar a presença de claudicação em um dos membros torácicos (Figura 6):

1. Concentração das linhas num dos quadrantes do gráfico dos membros torácicos.
2. Valor de $A1/A2$ para um dos membros torácicos acima de 0.5.
3. Valor absoluto da média de *maxdiff* e, ou *mindiff* –acima de 6 mm.
4. Quando os valores absolutos das médias de *maxdiff* e, ou *mindiff* estiverem acima de 6 mm, o(s) desvio padrão (ões) deve(m) ser menor(es) do que a(s) respectiva(s) média(s).

Cumprimento dos quatro parâmetros eram um forte indicador de claudicação, consistente com claudicação primária ou compensatória segundo a interpretação. Cumprimento de dois ou três parâmetros era associado a evidência fraca de assimetria. Cumprimento de um dos dados era considerado como um aumento na variabilidade dos dados fazendo a determinação da claudicação inconsistente.

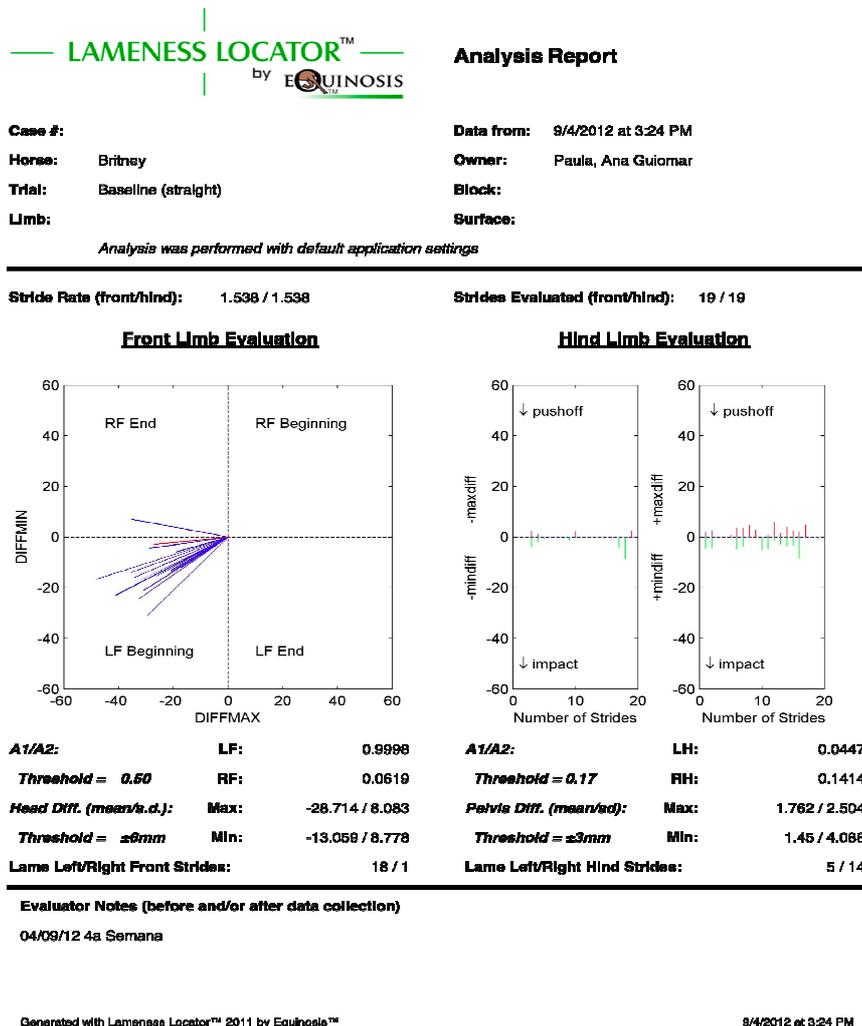
Figura 5 - Local de colocação dos sensores inerciais sem fio do equipamento Lameness Locator®



Fonte: RAMÍREZ RAMOS, P. A. 2013

Legenda - a. Foto ilustrando a localização dos sensores de cabeça e dorso. b. Foto ilustrando a localização do sensor do membro torácico direito

Figura 6 - Imagem ilustrando a folha de resultados após cada avaliação



4.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

O exame ultrassonográfico foi realizado imediatamente antes da indução da desmita e a cada semana, após a injeção de colagenase, até o término do experimento. Foi utilizado um equipamento veterinário (ESAOTE MyLab 30 VET) com transdutor linear com frequência de 7,5 a 10 MHz. Visando maximizar a qualidade das imagens ultrassonográficas do LSB foi utilizado um afastador de silicone entre a pele e o transdutor. Durante o exame ultrassonográfico, os animais foram mantidos em tronco de contenção. Foram obtidas imagens ultrassonográficas padrão bidimensionais em planos transversais e longitudinais do ligamento. As variáveis subjetivas para a interpretação das imagens ultrassonográficas foram alinhamento das fibras na direção longitudinal e ecogenicidade na direção transversal, sendo esta tanto do ligamento como da lesão. Para estas características foram atribuídos escores, com a finalidade de medir a evolução da área lesada. Assim nas imagens longitudinais foi determinado o grau de perda do alinhamento das fibras (Quadro 4). Nas imagens transversais foi avaliado o grau de ecogenicidade do ligamento e da lesão (Quadro 5). Além destas características foi feita a medida da área transversal do ligamento e da lesão, e percentual da área lesada.

Quadro 4 - Escore de avaliação do alinhamento das fibras de colágeno da área de lesão do LSB em imagem longitudinal (RANTANEN et al., 2011)

| ESCORE | DESCRIÇÃO DO ALINHAMENTO |
|--------|--------------------------|
| 0 | ≥ 75% de paralelismo |
| 1 | 50-75% de paralelismo |
| 2 | 25-50% de paralelismo |
| 3 | ≤ de 25% de paralelismo |

Quadro 5 - Escore de avaliação da ecogenicidade das fibras do tecido da lesão e do LSB nas imagens transversais (RANTANEN et al., 2011)

| ESCORE | DESCRIÇÃO DA ECOGENICIDADE |
|--------|-----------------------------------|
| 0 | isoecogênico |
| 1 | ≥ 75% do tecido com ecogenicidade |
| 2 | 50% ecogênico, 50% anecogênico |
| 3 | ≤ 25% ecogênico |

4.6 PROCEDIMENTO DE BIOPSIA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A colheita do fragmento da lesão produzida no LSB foi feita após oito semanas da infiltração com colagenase. Após sedação e anestesia perineural dos animais, as amostras foram obtidas com agulha para biopsia de 18G x 15 cm de comprimento e instrumento automático de biopsia Pro-Mag™ Ultra. O procedimento foi guiado por imagens ultrassonográficas em tempo real para assegurar o posicionamento correto da agulha de biopsia.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação das variáveis quantitativas entre os três grupos, foram aplicados teste paramétrico e não paramétrico, conforme a distribuição da variável desfecho. O teste paramétrico aplicado foi o Teste F (ou ANOVA). Esse teste avalia a comparação entre os grupos através da média e é possível sua aplicação quando a suposição de normalidade está satisfeita. Quando a suposição de normalidade não esteve satisfeita foi aplicado o teste não paramétrico *Kruskall Wallis*; esse teste avalia a comparação entre os grupos através da mediana. Para a verificação da

normalidade foi utilizado o teste de *Shapiro Wilk*, conveniente quando a amostra é considerada pequena ($n < 30$).

Para a aplicação desses testes paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (*Kruskall Wallis*) foi feita uma alteração nas variáveis pesquisadas e que estavam sendo avaliadas, ou seja, foram transformadas em uma única variável de cada. Essa alteração se deu, pois eram nove medidas para cada variável estudada, que corresponderam aos diferentes momentos de observação, desde o início (semana 0) e depois mais 8 semanas sequencialmente.

Variáveis Quantitativas:

O teste paramétrico foi aplicado nas seguintes variáveis:

- Volume
- Dor
- Perímetro
- Ecogenicidade do LSB
- Ecogenicidade da lesão
- Área do LSB
- Área da lesão
- Porcentagem

O teste não paramétrico foi aplicado nas seguintes variáveis:

- Presença de calor
- Alinhamento da lesão

Para análise nos diferentes momentos de observação foram utilizados modelos lineares generalizados (MLG) com medidas repetidas, por se tratar de comparações avaliadas durante as semanas.

Para avaliação das variáveis qualitativas entre os três grupos foi utilizado o teste exato de *fisher*.

Variável Qualitativa:

- Presença de claudicação
- Análise cinemática do trote

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A infiltração com solução de colagenase nos membros torácicos teve como consequências alterações clínicas, indicadoras de inflamação, como aumento de volume, aumento de sensibilidade e elevação de temperatura no local da lesão em todos os animais; além disso, alguns animais apresentaram alterações no andamento evidenciados como claudicação. A avaliação dos sinais da inflamação foi realizada nos grupos G1, G2 e G3 a cada semana e durante todo o experimento.

5.1.1 Avaliação do aumento de volume

Com a inspeção visual e por palpação foi possível determinar o aumento de volume e presença de edema na área lesada (Figura 7), (Tabela 1). A análise estatística apontou que na comparação entre os grupos houve significância estatística ($p=0,003$), ou seja, notou-se descritivamente, que o G3 apresentou a maior média (1,31), entre os três grupos, seguido pelos G2 (1,07) e G1 (0,63) (Apêndice A) (Figura 8), e quando aplicado o teste de comparações múltiplas (teste *Bonferroni*) mostrou que o G3 somente foi diferente do G1 ($p=0,002$).

A figura 9 apresenta a evolução da variável durante as nove semanas (semana zero a semana oito). O teste estatístico apresentou significância durante a evolução das semanas, ou seja, apresentou diminuição dos escores conforme a evolução das semanas ($P<0,001$)

Figura 7 - Foto ilustrando o aumento de volume na área de lesão



Fonte: RAMÍREZ RAMOS, P. A. 2013

Legenda - Lesão (grau 2) no terço proximal da canela (seta) do cavalo Nº14 na terceira semana pós-lesão

Tabela 1 - Escore da avaliação do aumento de volume da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

(continua)

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|---|-----|---|-----|-----|-----|---|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| G1 | 4 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 9 | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G2 | 10 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | 11 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 2,5 | 2 | 1,5 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 |

Tabela 1 - Escore da avaliação do aumento de volume da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

(conclusão)

| | | | | | | | | | | |
|----|---------|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|
| | 16 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 17 | 0 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| G3 | 18 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| | 19 | 0 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 20 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| | 21 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0,5 | 0 | 0 |

Figura 8 - *Box-plot* da variável aumento de volume da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)

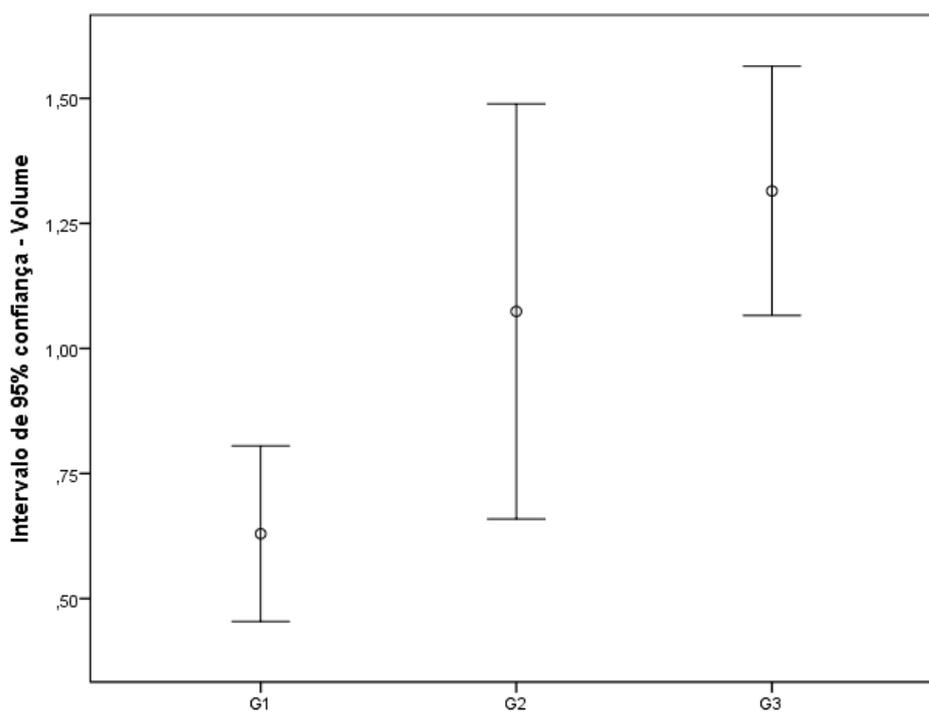
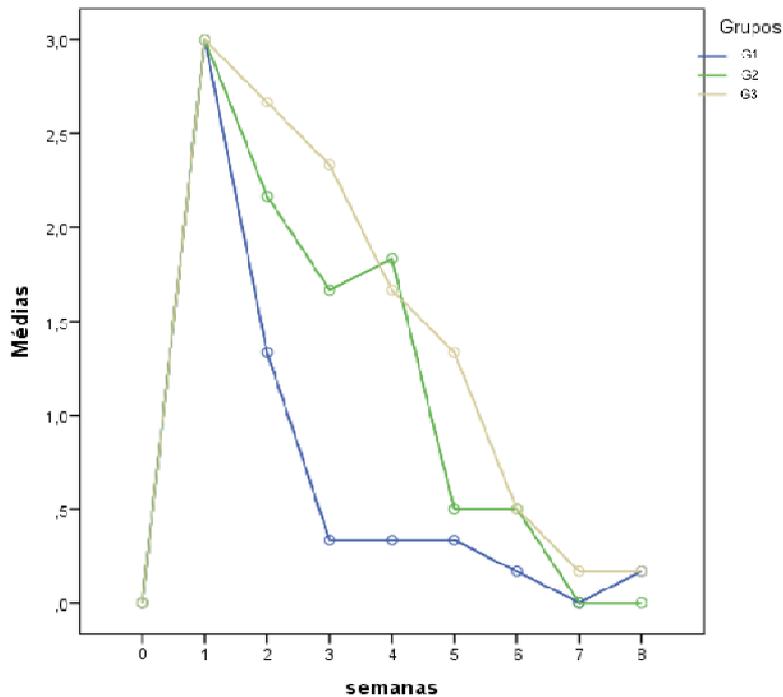


Figura 9 - Evolução da variável aumento de volume da região proximal do LSB durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)



5.1.2 Avaliação do aumento de temperatura

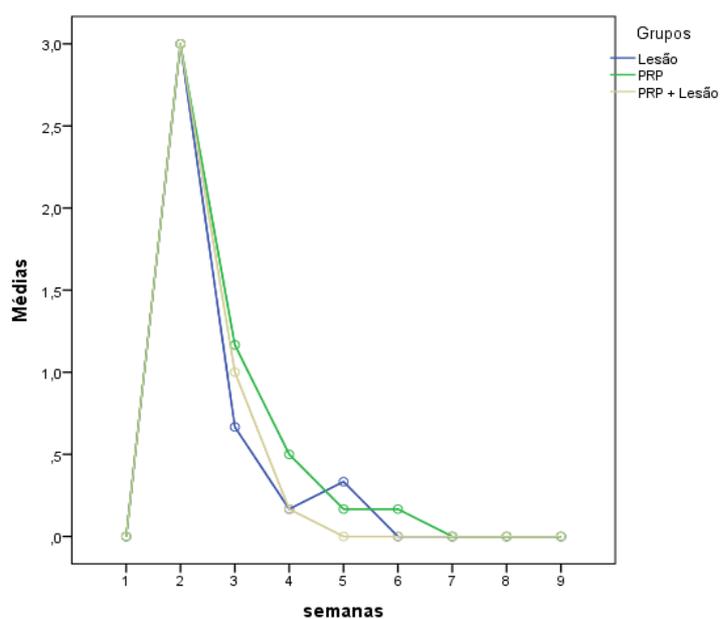
Por palpação foi possível determinar o aumento de temperatura no local de lesão (Tabela 2). Na comparação das medianas, o teste não paramétrico, apontou não haver diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$) (Apêndice B).

A figura 10 apresenta a evolução da variável durante as nove semanas (semana zero a semana oito). O teste estatístico apresentou para os três grupos diferença significativa durante a evolução das semanas, ou seja, mostrou diminuição dos escores conforme a evolução da semana ($P < 0,001$).

Tabela 2 - Escore da avaliação do aumento de temperatura da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|---|-----|-----|---|---|---|---|---|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 3 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 4 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 6 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| G2 | 7 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 8 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 9 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 10 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 11 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| | 12 | 0 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 1 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| G3 | 13 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 14 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 15 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 16 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 17 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 18 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Figura 10 - Evolução da variável aumento de temperatura da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3) durante as nove semanas de experimento



5.1.3 Avaliação da evidência de dor

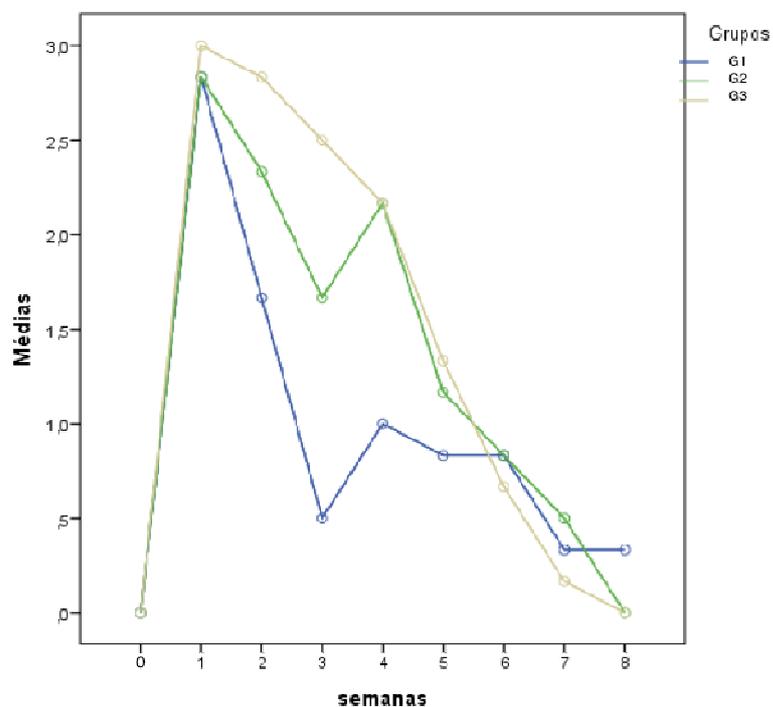
Por palpação foi possível determinar a presença de dor no local de lesão (Tabela 3). O teste não apresentou diferença significativa na comparação entre grupos ($P>0,05$) (Apêndice A).

A figura 11 apresenta a evolução da variável dor durante as nove semanas (semana zero a semana oito). O teste estatístico mostrou diferença significativa para os três grupos durante a evolução das semanas, ou seja, apresentou diminuição dos escores conforme a evolução da semana ($P<0,001$).

Tabela 3 - Escore da avaliação da evidência de dor na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo –2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 0 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 0 | 1 | |
| | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | |
| | 3 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| | 4 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| | 6 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 2 | 0 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0 | 0 | |
| G2 | 7 | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| | 8 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 9 | 0 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | |
| | 10 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | |
| | 11 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | |
| | 12 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 2,5 | 1,5 | 2,5 | 1,5 | 1 | 0,5 | 0 | |
| G3 | 13 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | |
| | 14 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| | 15 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| | 16 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| | 17 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | |
| | 18 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 3 | 2,5 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | |

Figura 11 - Evolução da variável evidência de dor da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3) durante as nove semanas de experimento



5.1.4 Avaliação do perímetro da circunferência

Com ajuda de fita métrica foi mensurado o perímetro da circunferência da região proximal do LSB (Tabela 4). Contudo, a análise estatística não demonstrou diferenças entre os grupos ($P > 0,05$) (Apêndice A) e, não apresentou significância estatística durante a evolução das semanas ($p = 0,105$).

Tabela 4 - Medidas do perímetro da circunferência da região proximal da canela (cm), correspondendo a área proximal do LSB, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 18,4 | 19,4 | 19,4 | 19,3 | 19,3 | 20,2 | 20,4 | 20,0 | 21,0 | |
| | 2 | 18,7 | 18,5 | 18,1 | 18,5 | 18,5 | 18,4 | 18,4 | 18,6 | 18,3 | |
| | 3 | 17,9 | 17,9 | 18,0 | 18,4 | 18,2 | 18,6 | 19,0 | 18,7 | 18,1 | |
| | 4 | 21,0 | 21,3 | 20,4 | 20,1 | 20,5 | 20,5 | 20,9 | 22,3 | 20,5 | |
| | 5 | 20,0 | 20,0 | 19,6 | 19,4 | 20,2 | 20,1 | 20,0 | 20,2 | 20,3 | |
| | 6 | 18,4 | 18,7 | 19,5 | 19,0 | 18,5 | 18,8 | 19,1 | 19,5 | 19,0 | |
| | MÉDIA | 19,1 | 19,3 | 19,2 | 19,1 | 19,2 | 19,4 | 19,6 | 19,9 | 19,5 | |
| | DP | 1,2 | 1,2 | 0,9 | 0,6 | 1,0 | 0,9 | 1,0 | 1,4 | 1,2 | |
| G2 | 7 | 18,5 | 19,6 | 18,8 | 19,2 | 18,6 | 18,4 | 19,0 | 17,8 | 18,2 | |
| | 8 | 20,1 | 19,4 | 19,7 | 20,3 | 18,4 | 20,1 | 19,5 | 19,9 | 19,7 | |
| | 9 | 20,0 | 18,8 | 20,1 | 20,5 | 19,0 | 20,0 | 20,2 | 20,5 | 19,8 | |
| | 10 | 17,4 | 17,4 | 18,0 | 17,7 | 17,5 | 17,4 | 17,4 | 17,2 | 17,2 | |
| | 11 | | 17,6 | 18,5 | | 18,9 | 17,6 | 17,5 | 17,8 | 17,5 | |
| | 12 | 18,5 | 18,4 | 18,3 | 18,8 | 17,9 | 19,2 | 18,3 | 18,3 | 18,0 | |
| | MÉDIA | 18,9 | 18,5 | 18,9 | 19,3 | 18,4 | 18,8 | 18,7 | 18,6 | 18,4 | |
| | DP | 1,1 | 0,9 | 0,8 | 1,1 | 0,6 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | |
| G3 | 13 | | | | | | | | 19,2 | 19,2 | |
| | 14 | | | | | | | 18,2 | 18,2 | | |
| | 15 | 16,5 | 17,6 | 17,8 | 17,9 | 17,6 | 17,4 | 17,4 | 17,3 | 17,4 | |
| | 16 | 17,8 | | 17,9 | 17,5 | 17,8 | 17,6 | 17,9 | 18,0 | 17,5 | |
| | 17 | 18,0 | 20,1 | 18,5 | 18,6 | 19,0 | 18,2 | 18,4 | 18,9 | 18,5 | |
| | 18 | 18,9 | 19,8 | 18,8 | 19,4 | 18,8 | 19,0 | 19,3 | 19,4 | 19,3 | |
| | MÉDIA | 17,8 | 19,2 | 18,3 | 18,4 | 18,3 | 18,1 | 18,2 | 18,5 | 18,4 | |
| | DP | 1,0 | 1,4 | 0,5 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | |

5.1.5 Avaliação de claudicação

Com o trote do animal em linha reta foi possível observar a presença ou não de claudicação. Foi determinado ausência(0) ou presença (1) de claudicação (Tabela 5). O teste não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,947$), e não apresentou significância estatística durante a evolução das semanas, ou seja, ($p=0,095$).

Tabela 5 - Presença de claudicação no membro torácico lesado, nos diferentes grupos e durante todo o experimento, sendo 0 sem claudicação e 1 com claudicação São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| G1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | MEDIANA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G2 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 9 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | MEDIANA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G3 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | 16 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | MEDIANA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

5.2 AVALIAÇÃO CINEMÁTICA DO TROTE

Os animais foram avaliados em linha reta, com o uso do LL determinando o membro torácico com claudicação durante todas as semanas (Apêndices C-K). A análise estatística demonstrou haver uma relação entre o membro com desmíte no LS e o contralateral, nas semanas 1, 4 e 5 ($P < 0.05$), indicando que a claudicação do membro contralateral interferiu na detecção de claudicação do membro com desmíte (Tabela 6).

Tabela 6 – Porcentagem de animais que apresentaram claudicação na avaliação cinemática ao trote – São Paulo – 2012/2013

| SEMANA | PORCENTAGEM POSITIVO A CLAUDICAÇÃO COM O LL | |
|--------|---|-------------------------------|
| | Membro torácico com desmíte do LSB | Membro torácico contralateral |
| 0 | 6,2 | 25 |
| 1 | 14,3 _a | 78,6 _b |
| 2 | 18,8 | 43,8 |
| 3 | 6,2 | 43,8 |
| 4 | 16,7 _a | 66,7 _b |
| 5 | 16,7 _a | 55,6 _b |
| 6 | 37,5 | 31,2 |
| 7 | 31,2 | 25 |
| 8 | 18,8 | 31,2 |

5.3 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

5.3.1 Avaliação da ecogenicidade do LSB

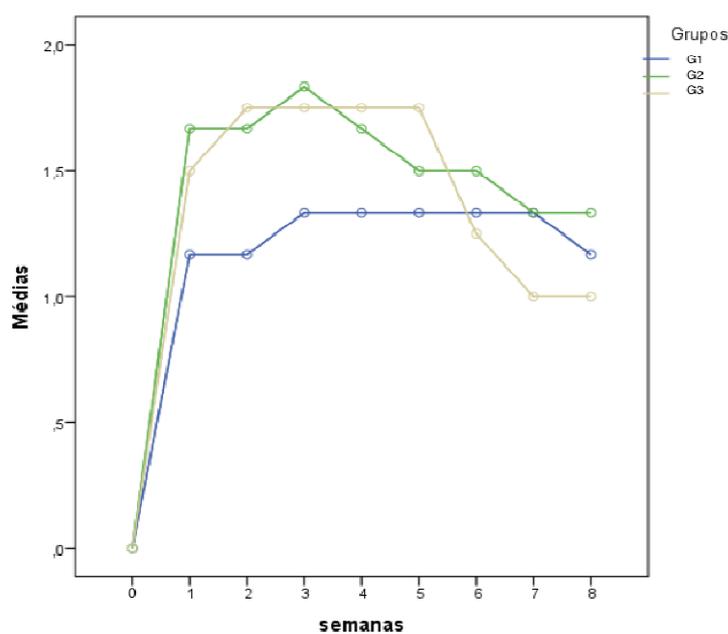
As avaliações da ecogenicidade da parte próxima do LSB, foram feitas através das imagens transversais e longitudinais (Tabela 7). O teste estatístico não apresentou diferença significativa na comparação entre grupos ($P > 0,05$) (Apêndice A).

A figura 12 apresenta a evolução da variável durante as nove semanas (semana zero a semana oito). Para o G3 o teste estatístico apresentou diferença significativa durante a evolução das semanas, ou seja, mostrou diminuição dos escores a partir da sexta semana ($P < 0,001$).

Tabela 7 - Escore da avaliação da ecogenicidade do LSB na região próxima dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|---|---|---|-----|-----|-----|---|---|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 4 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 5 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | |
| | 6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | MEDIANA | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| G2 | 7 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 8 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 9 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 10 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 11 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 12 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | |
| | MEDIANA | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1,5 | 1,5 | 1 | 1 | |
| G3 | 13 | 0 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | |
| | 14 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 15 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 16 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | |
| | 17 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | |
| | 18 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| | MEDIANA | 0 | 1 | 1 | 1 | 1,5 | 1,5 | 1 | 1 | 1 | |

Figura 12 - Evolução da variável da ecogenicidade do LSB durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)



5.3.2 Avaliação do alinhamento da lesão

As avaliações do grau de alinhamento das fibras de colágeno dentro da área de lesão na região proximal do LSB, foram feitas através das imagens longitudinais (Figura 13) (Tabela 8). Na comparação das medianas, o teste não paramétrico, apontou não haver diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$) (Apêndice B).

A figura 14 apresenta a evolução da variável durante as nove semanas (semana 0 a semana 8). Para o G3 o teste estatístico mostrou diferença estatística durante a evolução das semanas, ou seja, apresentou diminuição dos escores a partir da sexta semana ($P<0,001$).

Tabela 8 - Escore da avaliação do alinhamento da lesão na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|---------|---------|---------|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 2 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 3 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 4 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 5 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 6 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | MEDIANA | 0 | 1,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| G2 | 7 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 8 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 9 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 10 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 11 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 12 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| MEDIANA | 0 | 2,5 | 2,5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| G3 | 13 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 14 | 0 | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 15 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | |
| | 16 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | |
| | 17 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 18 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | |
| MEDIANA | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | | |

Figura 13 - Imagens longitudinais do LSB na região proximal do cavalo N°17, mostrando em sequência as nove semanas de avaliação, desde o exame inicial (semana 0) até 8ª semana pós-lesão

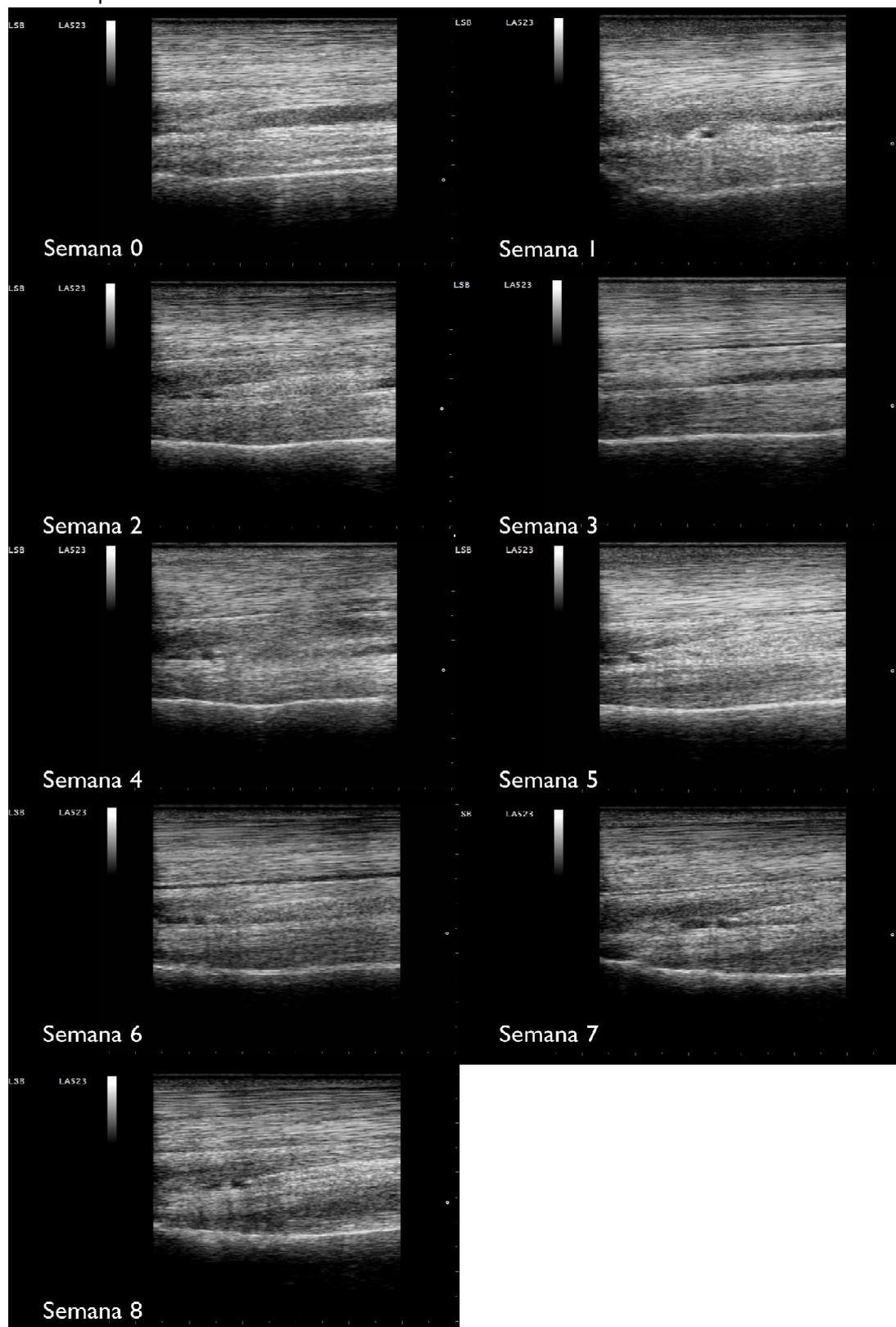
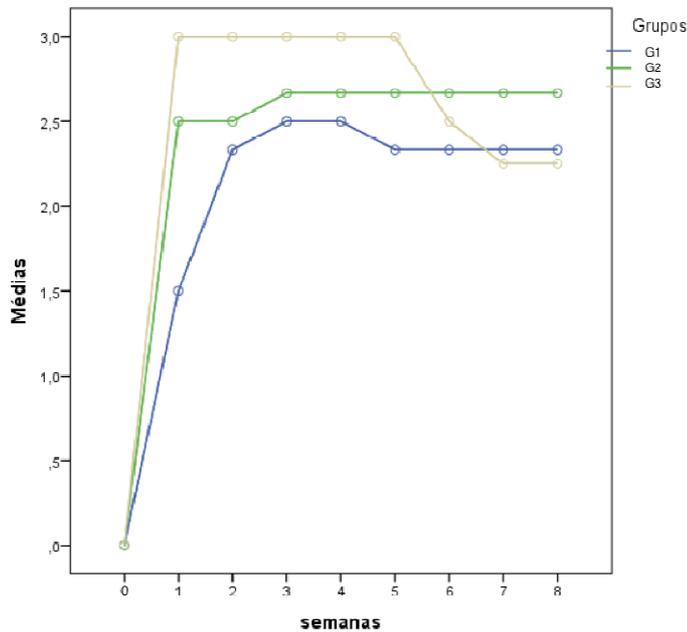


Figura 14 - Evolução da variável alinhamento da lesão no LSB dos membros torácicos durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)



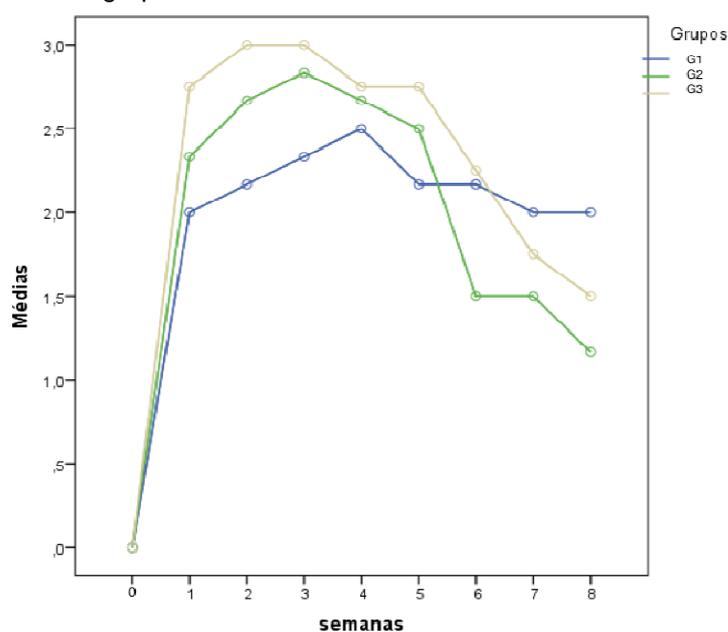
5.3.3 Avaliação da ecogenicidade da lesão

As avaliações do grau de ecogenicidade da área de lesão na parte próximal do LSB, foram feitas através das imagens transversais e longitudinais (Tabela 9). Contudo a análise estatística não demonstrou diferenças entre os grupos. Apesar do teste não ter apresentado diferença significativa entre os grupos ($p=0,367$), apresentou significância estatística durante a evolução das semanas, ou seja, apresentou um decréscimo do escore ($P<0,001$) nos três grupo

Tabela 9 - Escore da avaliação da ecogenicidade da lesão na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| G1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 2 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| | 4 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 5 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 6 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | MEDIANA | 0 | 2 | 2 | 2,5 | 2,5 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| G2 | 7 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| | 8 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | 9 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | 10 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | 11 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| | 12 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| | MEDIANA | 0 | 2,5 | 3 | 3 | 3 | 2,5 | 1,5 | 1,5 | 1 |
| G3 | 13 | 0 | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 14 | 0 | | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | 15 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| | 16 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| | 17 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | 18 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| | MEDIANA | 0 | 3 | 3 | 3 | 2,5 | 2,5 | 2 | 2 | 1,5 |

Figura 15 - Evolução da variável ecogenicidade da lesão na região proximal do LSB dos membros torácicos, durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos



5.3.4 Avaliação da área do LSB no corte transversal

As avaliações da área do LSB no corte transversal na parte próximal, foram feitas através das imagens transversais (Figura 16), mensuradas a cada semana e durante todo o experimento (Tabela 10). A análise estatística apontou que na comparação entre os grupos houve significância estatística ($p=0,015$) (Apêndice A). Descritivamente o grupo G3 (154,40) apresentou a maior média (157,40) entre os três grupos, seguido por grupo G1 (131,35) e G2 (128,72) (Figura 17). Pelo teste de comparações múltiplas (Bonferroni), G2 e G3 são estatisticamente diferentes ($p=0,025$). Pelo teste MLG, o G3 apresentou diminuição dos escores a partir da quinta semana ($P<0,001$).

5.3.5 Avaliação da área da lesão no corte transversal

As avaliações da área de lesão no corte transversal na parte próximal do LSB, foram feitas através das imagens transversais (Figura 16), mensuradas a cada semana e durante todo o experimento (Tabela 11). A análise estatística apontou que na comparação entre os grupos houve significância estatística ($p=0,008$) (apêndice A). Descritivamente a maior média foi no G3 (32,88), entre os três grupos, seguido pelos G2 (21,98) e G1 (18,98) (figura 18). Pelo teste de comparações múltiplas (Bonferroni) G3 foi estatisticamente diferente do G1 ($p=0,010$). O G3 mostrou diminuição das médias da área de lesão conforme a evolução das semanas ($P<0,001$).

Figura 16 - Imagens transversais do LSB na área proximal do cavalo N°16, mostrando em sequência as 9 semanas de mensuração da área transversal do ligamento e da área transversal da lesão, desde o exame inicial na semana 0 até a 8ª semana pós-lesão

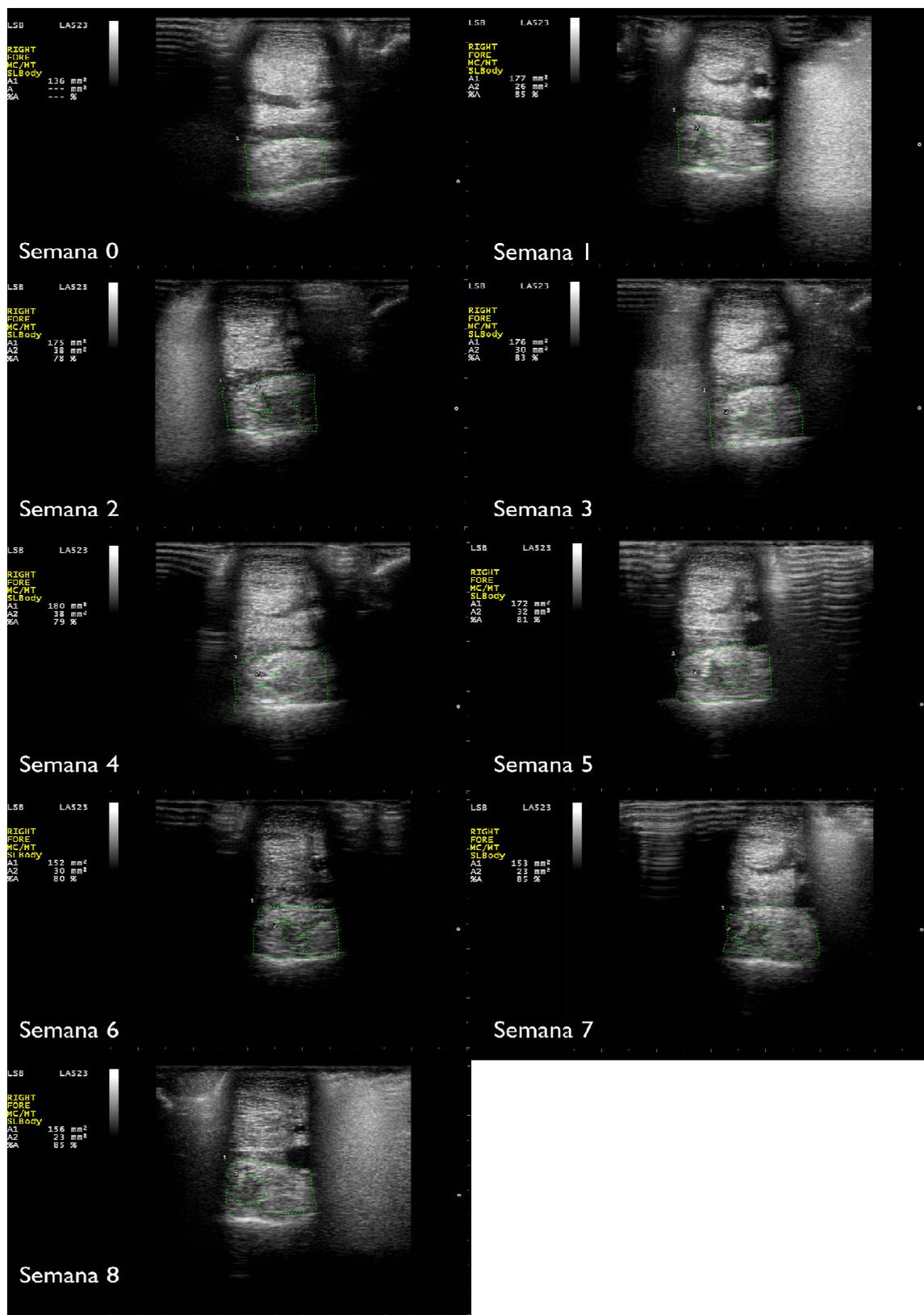


Tabela 10 - Área do ligamento (mm^2) mensurada no corte transversal na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 120 | 123 | 144 | 143 | 146 | 145 | 144 | 139 | 132 | |
| | 2 | 112 | 121 | 121 | 123 | 119 | 118 | 118 | 112 | 123 | |
| | 3 | 137 | 174 | 183 | 173 | 168 | 165 | 159 | 159 | 158 | |
| | 4 | 97 | 115 | 107 | 116 | 122 | 128 | 125 | 110 | 107 | |
| | 5 | 108 | 134 | 136 | 136 | 146 | 136 | 134 | 137 | 146 | |
| | 6 | 115 | 116 | 122 | 128 | 111 | 122 | 123 | 120 | 117 | |
| | MÉDIA | 114,8 | 130,5 | 135,5 | 136,5 | 135,3 | 135,7 | 133,8 | 129,5 | 130,5 | |
| | DP | 13,3 | 22,4 | 26,6 | 20,2 | 21,6 | 17,4 | 15,4 | 18,9 | 18,9 | |
| G2 | 7 | 107 | 133 | 127 | 126 | 116 | 111 | 121 | 124 | 120 | |
| | 8 | 125 | 139 | 143 | 145 | 153 | 148 | 132 | 139 | 128 | |
| | 9 | 100 | 126 | 126 | 125 | 118 | 118 | 114 | 103 | 106 | |
| | 10 | 121 | 134 | 134 | 135 | 132 | 136 | 129 | 124 | 126 | |
| | 11 | 115 | 121 | 174 | 170 | 158 | 147 | 132 | 152 | 149 | |
| | 12 | 99 | 121 | 122 | 115 | 123 | 133 | 128 | 123 | 125 | |
| | MÉDIA | 111,2 | 129,0 | 137,7 | 136,0 | 133,3 | 132,2 | 126,0 | 127,5 | 125,7 | |
| | DP | 10,9 | 7,5 | 19,3 | 19,5 | 18,1 | 15,1 | 7,1 | 16,6 | 13,9 | |
| G3 | 13 | | | 152 | 172 | 171 | 167 | 178 | 172 | 149 | |
| | 14 | | | 177 | 196 | 196 | 161 | 163 | 168 | 167 | |
| | 15 | 126 | 142 | 145 | 144 | 141 | 140 | 141 | 126 | 122 | |
| | 16 | 136 | 177 | 175 | 175 | 180 | 172 | 152 | 153 | 156 | |
| | 17 | 146 | 193 | 213 | 201 | 220 | 193 | 182 | 170 | 166 | |
| | 18 | 126 | 157 | 161 | 176 | 170 | 162 | 161 | 157 | 155 | |
| | MÉDIA | 133,5 | 167,3 | 170,5 | 177,3 | 179,7 | 165,8 | 162,8 | 157,7 | 152,5 | |
| | DP | 9,6 | 22,4 | 24,3 | 20,3 | 26,7 | 17,2 | 15,5 | 17,3 | 16,5 | |

Figura 17 – *Box-plot* da variável área do ligamento (mm^2) no corte transversal da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1, G2 e G3)

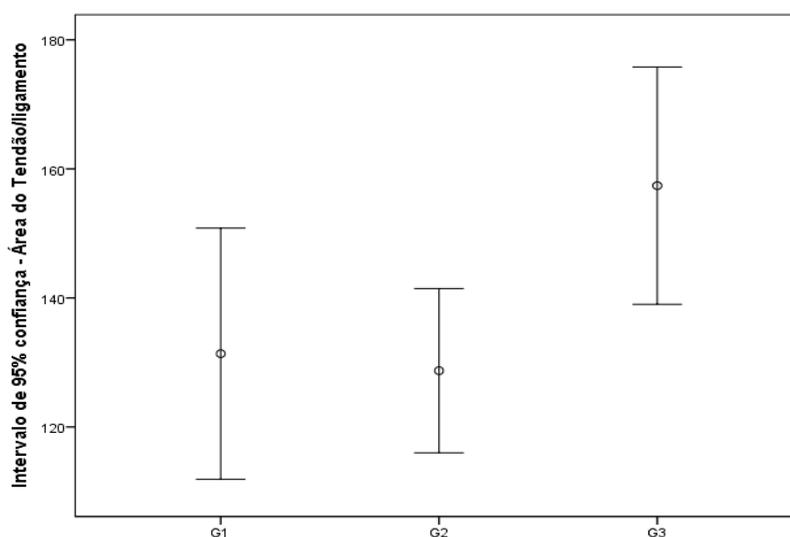
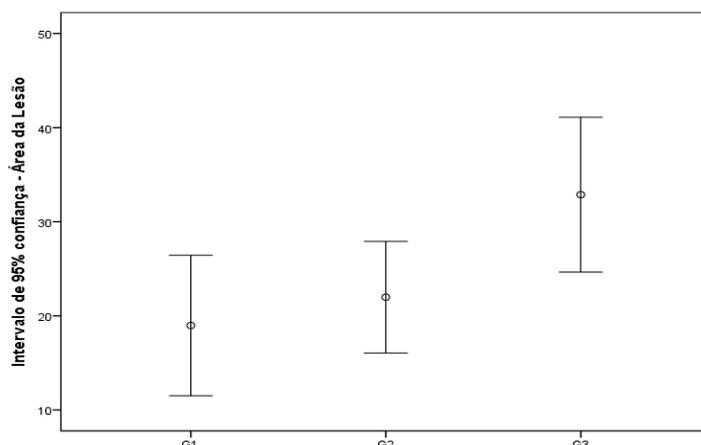


Tabela 11 – Área da lesão (mm²) mensurada no corte transversal na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 0 | 25 | 20 | 24 | 29 | 27 | 22 | 25 | 23 | |
| | 2 | 0 | 9 | 12 | 11 | 14 | 11 | 11 | 14 | 15 | |
| | 3 | 0 | 21 | 21 | 18 | 25 | 23 | 21 | 23 | 21 | |
| | 4 | 0 | 32 | 27 | 23 | 21 | 19 | 13 | 13 | 14 | |
| | 5 | 0 | 43 | 33 | 34 | 37 | 33 | 32 | 31 | 36 | |
| | 6 | 0 | 12 | 14 | 13 | 13 | 15 | 18 | 16 | 18 | |
| | MÉDIA | 0,0 | 23,7 | 21,2 | 20,5 | 23,2 | 21,3 | 19,5 | 20,3 | 21,2 | |
| | DP | 0 | 12,7 | 7,9 | 8,4 | 9,2 | 8,0 | 7,5 | 7,1 | 8,0 | |
| G2 | 7 | 0 | 22 | 18 | 20 | 21 | 20 | 22 | 21 | 20 | |
| | 8 | 0 | 27 | 28 | 32 | 35 | 36 | 31 | 18 | 19 | |
| | 9 | 0 | 10 | 18 | 16 | 16 | 16 | 16 | 14 | 15 | |
| | 10 | 0 | 27 | 32 | 34 | 33 | 31 | 24 | 22 | 20 | |
| | 11 | 0 | 22 | 30 | 42 | 39 | 36 | 33 | 29 | 33 | |
| | 12 | 0 | 22 | 23 | 26 | 26 | 24 | 23 | 22 | 23 | |
| | MÉDIA | 0,0 | 21,7 | 24,8 | 28,3 | 28,3 | 27,2 | 24,8 | 21,0 | 21,7 | |
| | DP | 0 | 6,2 | 6,1 | 9,6 | 8,8 | 8,4 | 6,2 | 5,0 | 6,1 | |
| G3 | 13 | 0 | | 34 | 42 | 37 | 36 | 33 | 30 | 32 | |
| | 14 | 0 | | 40 | 29 | 43 | 31 | 30 | 35 | 31 | |
| | 15 | 0 | 37 | 31 | 28 | 29 | 31 | 30 | 24 | 18 | |
| | 16 | 0 | 26 | 38 | 30 | 38 | 32 | 30 | 23 | 23 | |
| | 17 | 0 | 56 | 40 | 44 | 44 | 46 | 41 | 41 | 46 | |
| | 18 | 0 | 50 | 52 | 56 | 65 | 55 | 52 | 42 | 34 | |
| | MÉDIA | 0,0 | 42,3 | 39,2 | 38,2 | 42,7 | 38,5 | 36,0 | 32,5 | 30,7 | |
| | DP | 0 | 13,4 | 7,2 | 11,1 | 12,2 | 9,9 | 8,9 | 8,2 | 9,7 | |

Figura 18 – *Box-plot* da variável área da lesão no corte transversal (mm²) da região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos (G1,G2 e G3)



5.3.6 Porcentagem da área de lesão do LSB

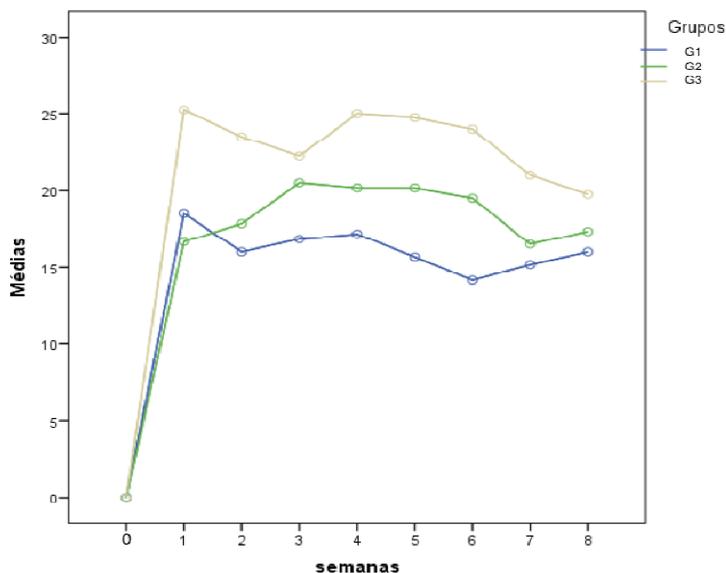
Os valores da porcentagem da área de lesão no corte transversal na parte proximal do LSB, foram fornecidos pelo *software* do ultrassom a cada semana e durante todo o experimento (Tabela 12). O teste não apresentou diferença significativa na comparação entre grupos ($P>0,05$) (Apêndice A).

A figura 19 apresenta a evolução da variável durante as nove semanas (semana zero a semana oito). O teste estatístico mostrou significância durante a evolução das semanas, ou seja, a porcentagem da área de lesão do LSB apresentou diminuição discreta conforme a evolução da semana ($p<0,001$). Notou-se que G3 teve as maiores médias

Tabela 12 – Porcentagem da área de lesão (%) no corte transversal na região proximal do LSB dos membros torácicos, nos diferentes grupos e durante todo o experimento – São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | SEMANAS | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| G1 | 1 | 0 | 21 | 14 | 17 | 20 | 19 | 15 | 18 | 17 | |
| | 2 | 0 | 8 | 11 | 19 | 12 | 10 | 9 | 12 | 13 | |
| | 3 | 0 | 12 | 11 | 10 | 15 | 14 | 13 | 14 | 13 | |
| | 4 | 0 | 28 | 25 | 20 | 18 | 15 | 10 | 12 | 13 | |
| | 5 | 0 | 32 | 24 | 25 | 26 | 24 | 24 | 22 | 25 | |
| | 6 | 0 | 10 | 11 | 10 | 12 | 12 | 14 | 13 | 15 | |
| | MÉDIA | 0,0 | 18,5 | 16,0 | 16,8 | 17,2 | 15,7 | 14,2 | 15,2 | 16,0 | |
| DP | 0 | 10,0 | 6,7 | 5,9 | 5,4 | 5,1 | 5,3 | 4,0 | 4,7 | | |
| G2 | 7 | 0 | 16 | 14 | 16 | 18 | 18 | 18 | 17 | 17 | |
| | 8 | 0 | 20 | 19 | 22 | 23 | 24 | 23 | 13 | 15 | |
| | 9 | 0 | 8 | 14 | 13 | 13 | 14 | 14 | 14 | 16 | |
| | 10 | 0 | 20 | 24 | 25 | 25 | 23 | 19 | 18 | 16 | |
| | 11 | 0 | 18 | 17 | 25 | 21 | 24 | 25 | 19 | 22 | |
| | 12 | 0 | 18 | 19 | 22 | 21 | 18 | 18 | 18 | 18 | |
| | MÉDIA | 0,0 | 16,7 | 17,8 | 20,5 | 20,2 | 20,2 | 19,5 | 16,5 | 17,3 | |
| DP | 0 | 4,5 | 3,8 | 4,9 | 4,2 | 4,1 | 3,9 | 2,4 | 2,5 | | |
| G3 | 13 | 0 | | 22 | 24 | 21 | 21 | 18 | 17 | 21 | |
| | 14 | 0 | | 22 | 14 | 21 | 19 | 18 | 20 | 18 | |
| | 15 | 0 | 25 | 21 | 19 | 21 | 22 | 21 | 19 | 14 | |
| | 16 | 0 | 15 | 22 | 17 | 21 | 19 | 20 | 15 | 15 | |
| | 17 | 0 | 29 | 19 | 22 | 20 | 24 | 23 | 24 | 28 | |
| | 18 | 0 | 32 | 32 | 31 | 38 | 34 | 32 | 26 | 22 | |
| | MÉDIA | 0,0 | 25,3 | 23,0 | 21,2 | 23,7 | 23,2 | 22,0 | 20,2 | 19,7 | |
| DP | 0 | 7,4 | 4,6 | 6,0 | 7,0 | 5,6 | 5,3 | 4,2 | 5,2 | | |

Figura 19 – Porcentagem da área de lesão (%) do LSB no corte transversal durante as nove semanas de experimento nos diferentes grupos



5.4 CONCENTRAÇÃO DE PLAQUETAS NA OBTENÇÃO DO PRP

Foram obtidos as médias e os desvio padrões dos valores de plaquetas no sangue inicial e após concentração final (PRP) , como também o fator de multiplicação da concentração de plaquetas (Tabela 13).

5.5. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS POR MEIO DO PROCEDIMENTO DE BIOPSIA

Foram obtidas 18 amostras da região proximal do LSB, por meio de agulha de biopsia de cada membro torácico que foi submetido a demite induzida (G1,G2 e G3). O tamanho dos fragmentos de tecido foi de 0,7 cm de comprimento x 0,5 cm de largura aproximadamente

Tabela 13 - Contagem de plaquetas no sangue total e no PRP, com o correspondente fator de multiplicação - São Paulo – 2012/2013

| GRUP | ANIMAL | INICIAL | FINAL | CONCENTRAÇÃO |
|------|--------|---------|-------|--------------|
| G2 | 7 | 166 | 577 | 3,5 |
| | 8 | 193 | 595 | 3,1 |
| | 9 | 151 | 561 | 3,7 |
| | 10 | 231 | 833 | 3,6 |
| | 11 | 226 | 379 | 1,7 |
| | 12 | 210 | 384 | 1,8 |
| | MEDIA | 196,2 | 554,8 | 2,9 |
| | DP | 26,2 | 115,6 | 0,8 |
| G3 | 13 | 185 | 295 | 1,6 |
| | 14 | 171 | 498 | 2,9 |
| | 15 | 199 | 520 | 2,6 |
| | 16 | 192 | 455 | 2,4 |
| | 17 | 138 | 373 | 2,7 |
| | 18 | 213 | 530 | 2,5 |
| | MEDIA | 183 | 445,2 | 2,4 |
| | DP | 19 | 74,1 | 0,3 |

6 DISCUSSÃO

Devido à importância clínica das lesões da região proximal do LSB em equinos (CLEGG, 2011; 2012), foi proposto neste estudo avaliar a influência do PRP, e deste hemoderivado em combinação com o LASER terapêutico sobre o comportamento clínico e a evolução ultrassonográfica de lesões induzidas no LSB. O método de indução de lesão por infiltração de colagenase no tecido tendíneo e ligamentar é bem aceito na comunidade científica (LUI et al, 2011; SMITH, McILWRAITH, 2012) pois induz, ainda que de forma aguda, os estados de inflamação e de dano ao tecido, com as subsequentes etapas de reparação e cicatrização, permitindo assim a avaliação da eficácia de modalidades terapêuticas (LUI et al, 2011; DALHGREN, MOHAMMED, NIXON, 2005; 2006). É necessário lembrar, contudo, que a etiologia aceita para a desmíte do LSB, *per se*, é a acumulação insidiosa de dano estrutural resultante da incidência de forças excessivas e repetitivas (BOOTH, 2003; DYSON, 2007), cenário distinto daquele inicialmente observado na lesão quimicamente induzida.

Os resultados obtidos através de análise estatística nos diferentes momentos de observação (análise MLG), associados às variáveis dos sinais da inflamação aguda, que apareceram nos animais a partir da primeira semana após a aplicação da colagenase, confirmam a indução da desmíte e foram similares aos encontrados por DALHGREN, MOHAMMED, NIXON, (2005; 2006) no TFDS e, CAMINOTO et al. (2005) no corpo do LSB.

No curso da desmíte, o processo inflamatório e a posterior cicatrização do LSB podem ser descritos por quatro etapas sucessivas, de eventos anabólicos e catabólicos que se sobrepõem. Observando estas etapas, decidiu-se aplicar o PRP na terceira semana pós-lesão, correspondendo à transição da primeira etapa -a de inflamação- para a segunda, de proliferação-reparação (MOLLOY, WANG, MURRELL, 2003; DAHLGREN, 2007; VOLETI, BUCKLEY, SOSLOWSKY, 2012). Esta época foi considerada mais propícia para suplementação adicional de fatores de crescimento e mediadores do metabolismo celular contidos no PRP, ou seja, no momento de grande atividade dos fibroblastos na produção de moléculas de

reposição da MEC (DAHLGREN, 2007). Diferentemente, Maia et al., (2009), aplicaram PRP 12 dias após indução de lesão no TFDS; também BOSCH et al., (2011), realizaram a aplicação de PRP mais precocemente, uma semana após indução de lesão, na tentativa de estimular angiogênese e vascularização.

Na comparação entre grupos, foi observado que escores para os parâmetros clínicos, aumento de volume e dor à palpação se mantiveram elevados após a terceira semana nos grupos tratados (G2 e G3), mostrando um efeito inflamatório leve e transitório, secundário à intervenção terapêutica ou secundário ao procedimento de injeção, inaparente no grupo G1. Vale ressaltar que o G1 foi grupo controle, mas não grupo placebo. Torricelli et al., (2011), relataram um achado semelhante, observando uma inflamação leve e transitória em dois cavalos, após aplicação do PRP associado a células tronco de medula óssea, no tratamento de desmíte do LSB e tendinite do TFDS. Outros autores não descreveram efeito algum após aplicação do PRP (ARGUELLES et al., 2008; WASELAU et al 2008; MAIA et al., 2009; BOSCH et al., 2010). Ainda subjetivamente este aumento nos escores foi maior na variável presença de dor, para o grupo PRP (G2), quando comparado com o PRP+LASER (G3), sugerindo que o uso do LASER, antecedendo a aplicação intralesional de PRP em desmites proximais do LSB, poderia minimizar reações pós-intervencionais associadas a sua aplicação. Aceitando a proposta do efeito analgésico do LASER observado por Labat et al., (2012) no trabalho experimental em tendinite induzida em ratos, que mostrou como o uso do LLLT foi efetivo na diminuição de substâncias e expressão gênica de proteínas associadas à inflamação e dor; esta é uma observação valedoura para futuras investigações.

O uso do LASER terapêutico a partir da segunda semana foi baseado nos achados de Reis, (2011), que em trabalho de metodologia semelhante, de indução de tendinite do TFDS, o efeito da colagenase manteve-se por duas semanas após a aplicação. Esta observação não foi mencionada nos outros estudos de indução de lesão usando colagenase (DALHGREN, MOHAMMED, NIXON, 2005; 2006; MIKAIL, 2008).

Devido à complexa anatomia e à heterogeneidade dos tecidos que compõem o LSB na região proximal, a técnica padrão de avaliação ultrassonográfica desta estrutura, quando utilizada para avaliar ecogenicidade do LSB, é afetada por

múltiplos artefatos (WERPY, DENOIX, 2012). Esta dificuldade foi observada durante este estudo onde a ecogenicidade do LSB não mostrou escores altos nem diferença estatística entre os grupos. Por outro lado quando existe uma lesão central, anecóica e definida, a valorização do grau de ecogenicidade da lesão torna-se mais sensível, sendo resultante da proliferação celular. Apesar de não haver diferença estatística, para este estudo, descritivamente pode-se afirmar que esta variável apresentou melhora nos escores a partir da quinta semana nos grupos tratados quando comparados com o controle. Esta observação se correlaciona com os efeitos benéficos esperados do uso do PRP na cicatrização dos tecidos tendíneos ou ligamentares, mostrados em estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* (DALHGREN, MOHAMMED, NIXON, 2005; Mc CARREL et al., 2009). Mesmo com metodologia diferente e um sistema de avaliação ultrassonográfico objetivo desenvolvido com um *software* especial, Bosch et al., (2011) observaram melhora do tecido do TFDS a partir da quinta semana no grupo tratado com PRP quando comparado com o placebo.

A variável grau de alinhamento da lesão mostrou que não houve diferença na comparação entre grupos, além do que os escores se mantiveram altos para os três grupos. Não obstante para o G3 houve uma diminuição na mediana dos escores, a partir da sexta semana. O alinhamento do tecido ligamentar esta associado à disposição organizada das fibras de colágeno e dos componentes da MEC dentro do tecido, em um tecido em processo de cicatrização, a recuperação do alinhamento do colágeno é a característica da etapa de remodelação a qual pode ter inicio quatro a oito semanas após lesão, e se estender até por um ano (VOLETI, BUCKLEY, SOSLOWSKY 2012). Isto permite sugerir que para avaliação desta variável, oito semanas não são suficientes para observar diferenças concluintes na comparação entre grupos.

A análise estatística mostrou diferença significativa na comparação entre grupos, para as variáveis área transversal do ligamento e área transversal da lesão, sendo os valores mais altos para o G3. Estes valores estiveram influenciados por fatores externos difíceis de controlar, como a introdução de um frasco novo de colagenase durante o experimento, que causou lesões mais graves no G3. Logo, o valor da porcentagem da área de lesão é uma medida mais adequada para usar

como referência, porque faz a relação direta entre o tamanho do ligamento e da lesão, além de que é a variável indicada para usar no acompanhamento da evolução ultrassonográfica de uma lesão central no tecido (DYSON, 2000). A avaliação desta variável não mostrou diferença na comparação entre grupos. Isto corrobora o observado por Arguelles et al., (2008) no relato de série de casos, onde utilizaram a área transversal do tecido e da lesão, e a porcentagem de lesão junto com outros parâmetros para avaliar evolução, não encontrando diferença nestes resultados, porém, os animais retornaram ao estado de *performance* anterior à lesão.

Devido à hipótese do sistema de sensores inerciais de individualizar o membro claudicante, e após análise matemática oferecer um resultado numérico do grau de claudicação, para o membro acometido, os membros torácicos dos animais, foram utilizados em dois experimentos simultâneos. Os resultados da avaliação da claudicação subjetiva e os dados da análise cinemática, foram inconsistentes e sem diferença significativa. Isto ocorreu pois o sistema de análise cinemática se faz por meio da assimetria, detectada pelos sensores, dos valores resultantes dos movimentos verticais de cabeça no momento do apoio dos membros torácicos esquerdo e direito, (neste caso) para oferecer o resultado das diferenças após análise matemática (KEEGAN, BAXTER, 2011). Neste estudo foi evidenciado nos resultados, como um membro torácico mascarou a presença de claudicação no outro, no trote em linha reta, aliás, estes animais não foram submetidos a exame clínico detalhado de claudicação. Outros estudos com metodologias diferentes, utilizaram a claudicação como variável de avaliação nos estudos com lesão bilateral, embora os resultados das avaliações não foram expostos como desfecho (MAIA et al., 2009; BOSCH et al., 2010)

A pesar destes resultados considerou-se importante destacar que Smith, Mcilwraith, (2012) no consenso sobre tendinite e desmíte em equinos feito no Simpósio de Hameveyer em 2007, concluíram e sugeriram que as mensurações cinemáticas e cinéticas poderiam ser consideradas como variáveis de observação importantes, pois oferecem grande quantidade de informação a respeito do membro claudicante e a etapa dentro do passo com maior evidencia de dor. No entanto de ser um método de avaliação que analisa assimetria, precisa de um especial cuidado nos fatores externos que possam influenciar erradamente nos resultados; como o tipo de superfície ou situações que alteraram a conduta dos animais avaliados.

Visando a obtenção de um dato objetivo na avaliação clínica, optou-se pela mensuração do perímetro da circunferência na região proximal da canela, usada para observar o aumento de volume. Contudo, os resultados não foram concluintes, e não tiveram significância. Isto ocorreu porque o local das lesões teve variação em alguns centímetros, assim as lesões mais proximais tiveram interferência na medida causada pelas cabeças dos ossos metacarpianos II e IV. Até hoje não há na literatura científica trabalhos publicados de desmite induzida nesta região do LSB, que relataram uma observação semelhante.

Com o objetivo de conseguir o comprimento de onda adequado do LLLT para penetrar no LSB foram usados 904 nm, extrapolando o recomendado em humanos pela WALT (MARINI et al. 2013 no prelo¹), até hoje não existem na literatura estudos testando o comprimento de onda usado em estruturas profundas em equinos.

A respeito do uso do PRP, existem na literatura múltiplos estudos mostrando o uso de diferentes produtos com características variadas em relação aos métodos de obtenção, concentração de plaquetas, quantidade de leucócitos presentes no produto, quantidade de produto a ser aplicado, dose terapêutica, número de aplicações, e ativação plaquetária com substâncias exógenas (FOSTER et al., 2009; TAYLOR et al., 2011). Até hoje não há um consenso, nem suficiente evidência clínica para a validação de algum produto. De frente a esta complexa situação, optou-se pela escolha de um protocolo de obtenção do produto, que além de cumprir com as características atualmente consideradas terapêuticas, fosse um produto, econômico, de fácil obtenção para ser adaptado no trabalho a campo. Assim, o PRP usado neste estudo foi de fácil obtenção através de duas centrifugações, atingindo uma concentração adequada de plaquetas (acima de 300.000 células/ml) (BOSWELL et al., 2012), em benefício de diminuir ao máximo a quantidade de leucócitos, considerados deletérios para o tecido (Mc CARREL et al., 2009, 2012), e utilizando o mínimo de sangue do animal.

¹ MARINIMARINI, I.; BARTOLUCCI, M.L.; BORTOLOTTI, F.; INNOCENTI, G.; GATTO, M. R; BONETTI, G. A. The effect of diode superpulsed low-level laser therapy on experimental orthodontic pain caused by elastomeric separators: a randomized controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science*, Maio, 2013.

Além de que com o intuito de diminuir as possíveis dificuldades no momento de aplicação foi decidido não usar ativação com substâncias exógenas, evitando a formação do coágulo antes da aplicação, assumindo a teoria que as plaquetas seriam ativadas no momento que entrassem em contato com o colágeno do tecido (TEXTOR, 2011).

Até hoje não há na literatura científica, estudos testando a associação do PRP ao LASER no tratamento de lesões ligamentares, ou até mesmo tendíneas em equinos.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi desenvolvido conclui-se que:

O uso de colagenase tipo I como método de indução de desmite, é eficiente em reproduzir inflamação aguda na região proximal do LSB.

A aplicação intralesional de PRP causou um efeito inflamatório leve e transitório no LSB dos animais tratados.

O PRP permitiu o processo de cicatrização do LSB na região proximal, quando aplicado na terceira semana após lesão, no início da etapa de proliferação celular.

A associação com o LASER terapêutico, teve uma ação analgésica adicional no tecido.

O procedimento de biopsia para o LSB na região proximal, resultou ser um método eficaz, de dificuldade moderada.

O PRP utilizado foi um protocolo econômico de fácil obtenção, o que permite a adaptação as condições de trabalho a campo, além de ter as concentrações de plaquetas consideradas hoje terapêuticas.

O uso da ultrassonografia como ferramenta de avaliação do LSB, resulto ser eficiente, principalmente ao utilizar como variáveis de desfecho, a ecogenicidade da lesão e a porcentagem da área de lesão.

Um maior tempo de observação é necessário para avaliar as características ultrassonográficas de alinhamento do colágeno. Oito semanas não foram concluintes.

REFERÊNCIAS

- ARGUELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F.; MUÑOZ, E.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, v. 162, p. 208-211, 2008.
- BERGLUND, M. E.; HART, D.A.; RENO, C.; WIIG, M. Growth factor and protease expression during different phases of healing after rabbit deep flexor tendon repair. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, p. 886–892, 2011.
- BIEWENER, A. A. Review, Muscle-tendon stresses and elastic energy storage during locomotion in the horse. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 120, p. 73-87, 1998.
- BIRCH, H. L.; WILSON, A. M.; GOODSHIP, A. E. Physical activity: does long-term, high-intensity exercise in horses result in tendon degeneration?. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, p. 1927–1933, 2008.
- BISCHOFBERGER, A. S.; KONAR, M.; OHLERTH, S.; GEYER, H.; LANG, J.; UELTSCHI G.; LISCHER C.J. Magnetic resonance imaging, ultrasonography and histology of the suspensory ligament origin: a comparative study of normal anatomy of Warmblood horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 6, p. 508-516, 2006.
- BOOTH, T. M. Proximal suspensory ligament desmitis with suspensory ligament avulsion fractures, **Equine veterinary education**, v. 15, n. 3, p. 132-133, 2003.
- BOSCH G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R.; VAN SCHIE, H. T. M. 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**, v. 21, p. 554–561, 2011.
- BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T. M.; DE GROOT, M. W.; CADBY, J. A.; VAN DE LEST, C. H. A.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R. 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. **Journal of Orthopedic Research**, v. 28, p. 211–217, 2010.
- BOSWELL, S. G.; COLE, M. D.; SUNDMAN, E. A.; KARAS, V.; FORTIER, L. A. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. **Journal of Arthroscopy and Related Surgery**, v. 28, n. 3, p. 429-439, 2012.
- BUCHNER, H. H. F.; SCHILDBOECK, U. Physiotherapy applied to the horse: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 6, p. 574-580, 2006.
- CAMINOTO, E. H.; ALVES, A. G.; AMORIM, R. L; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C. A.; NICOLETTI, J. M. Ultrastructural and immunocytochemical evaluation of the effects of extracorporeal shock wave treatment in the hind limbs of horses with experimentally induced suspensory ligament desmitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 5, 2005.

- CASTELIJNS, G.; CRAWFORD, A.; SCHAFFER, J.; ORTOLANO, G. A.; BEAUREGARDT.; SMITH, R. K. W. Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. **Veterinary Compendium of Orthopedics and Traumatology**, v. 5, p. 363-369, 2011.
- ÇELİMLİN, N.; SEYREK-INTAS, D.; KAYA, M. Morphometric measurements of flexor tendons and ligaments in Arabian horses by ultrasonographic examination and comparison with other breeds. **Equine Veterinary Education**, v. 16, n. 2, p. 81-85, 2004.
- CLEGG, P. D. Review Article: HBLB's advances in equine veterinary science and practice musculoskeletal disease and injury, now and in the future. Part 1: Fractures and fatalities, **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 6, p. 643-649, 2011.
- CLEGG, P. D. Review Article: HBLB's advances in equine veterinary science and practice musculoskeletal disease and injury, now and in the future. Part 2: Tendon and ligament injuries. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 371–375, 2012.
- DAHLGREN, L. A. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, p. 168-173, 2007.
- DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED HUSSNI.; NIXON A. J. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in healing tendon lesions. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, p. 183–192, 2006.
- DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED, HUSSNI.; NIXON, A. J. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 84-92, 2005.
- DE ARO, A. A.; VIDAL, B. DE C.; PIMENTEL, E. R. Biochemical and anisotropical properties of tendons. *Mícron*, v. 43, p. 205–214, 2012.
- DYSON, S. Diagnosis and management of common suspensory lesions in the forelimbs and hindlimbs of sport horses. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, p. 179-188, 2007.
- DYSON, S. Proximal suspensory desmitis in the forelimb and the hindlimb. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v. 46, p. 137- 142, 2000.
- FORTIER, L.A.; SMITH, R. K. W. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 24 p. 191-201, 2008.
- FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, M. B.; RODEO, S. A. Platelet-Rich Plasma from basic science to clinical applications. **American Journal of Sports Medicine**, v. 37, p. 2259-2272, 2009.
- GEANEY, L. E.; ARCIERO, R. A.; DEBERARDINO, T. M.; MAZZOCCA, A. D. The Effects of Platelet-Rich Plasma on tendon and ligament: basic science and clinical application. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v. 19, p. 160-164, 2011.

HALPER, J.; KIM, B.; KHAN, A.; YOON, J. H.; MUELLER, P. E. Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 12, 2006.

KANEPS, A. J.; HULTGREN, B. D.; RIEBOLD, T. W.; SHIRES, G. M. H. Laser therapy in the horse: histopathologic response. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 3, p. 581-582, 1984.

KASASHIMA, Y.; TAKAHASHI, T.; SMITH R. K. W.; GOODSHIP, A. E.; KUWANO A.; UENO T.; HIRANO S. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 4, p. 346-350, 2004.

KEEGAN K. G. Evidence-Based lameness detection and quantification. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 23, p. 403-423, 2007.

KEEGAN, K. G.; BAXTER, G. M. Objective assesment of lameness. In STASHAK, T. **Adams and stashak's lameness in horses**, United Kingdom: Chichester, p. 154-164, 2011.

KLAUSER, A. S.; PEETRONIS, P. Developments in musculoskeletal ultrasound and clinical applications. **The Journal of Skeletal Radiology**, v. 39, p. 1061–1071, 2010.

KRAMER, J.; KEEGAN, K. G.; KELMER, G.; WILSON D. A. Objective determination of pelvic movement during hind limb lameness by use of a signal decomposition method and pelvic height differences. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 6, p. 741-747, 2004.

LUI, P. P. Y.; MAFFULLI, N.; ROLF, C.; SMITH, R. K. W. Review What are the validated animal models for tendinopathy?. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 21, p. 3-17, 2011.

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

MAIA, L.; DE SOUZA, M. V.; RIBEIRO, J. I.JR.; DE OLIVEIRA, A. C.; ALVES, G. E. S.; BENJAMIN L. DOS A.; SILVA Y. F. R. S.; ZANDIM B. M.; MOREIRA J. C. L. Platelet-Rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 8, p. 618-626, 2009.

McCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from Platelet-Rich Plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, p. 1033–1042, 2009.

McCRACKEN, M. J.; KRAMER, J.; KEEGAN, K. G.; LOPES, M.; WILSON, D. A.; REED, S. K.; LaCARRUBBA, A.; RASCH, M. Comparison of an inertial sensor system of lameness quantification with subjective lameness evaluation. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 652–656, 2012.

MERO, J. L.; SCARLETT, J. M. Diagnostic criteria for degenerative suspensory ligament desmitis in peruvian paso horses. **Journal of equine veterinary science**, v. 25, n. 5 p. 224-228, 2005.

MIKAIL, S. C. **Avaliação da terapia do laser de arsenito de gálio em tendinite de cavalos Puro Sangue Inglês de corrida**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MILLER, K. D.; JUZWIAK, J. S. Case report, Bilateral degenerative suspensory desmitis with acute rupture in a Standardbred colt. **Equine veterinary education**, v. 22, n. 6, p. 267-270, 2010.

MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G.A.C. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. **Sports Medicine**, v. 33, n. 5, p. 381-394, 2003.

MURRAY, R. C.; DYSON, S. J.; TRANQUILLE, C.; ADAMS, V. Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, 411-416, 2006. Suppl.

NAGY, A.; DYSON, S. Magnetic resonance anatomy of the proximal metacarpal region of the horse described from images acquired from low- and high-field magnets. **Veterinary Radiology & Ultrasound**. V. 50, n. 6, p. 595-605, 2009

NAGY A.; DYSON S. Magnetic resonance imaging and histological findings in the proximal aspect of the suspensory ligament of forelimbs in nonlame horses. **Equine Veterinary Journal**. v. 44, p. 43-50, 2012

NEELIS, D. A.; ROBERTS, G. D. Advances in equine ultrasonography. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 28, p. 497-506, 2012.

PARIZOTTO, N. A. **Ação do laser de Hélio-Neônio sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho**. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e Computação) - Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

PARKINSON, J.; SAMIRIC, T.; ILIC, M. Z.; COOK, J.; HANDLEY, C. J. Involvement of proteoglycans in tendinopathy. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 11, n. 2, p. 86-93, 2011.

PETERSEN, S. L.; BOTES, C.; OLIVIER, A.; GUTHRIE, A. J. The effect of low level laser therapy (LLLT) on wound healing in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, p. 228-231, 1999.

PLACHOKOVA, A. S.; NIKOLIDAKIS, D.; MULDER, J.; JANSEN, J. A.; CREUGERS, N. H. J. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research Journal**, v. 19, p. 539-545, 2008.

RANTANEN, N. W.; JORGENSEN, J. S.; GENOVESE, R. L. Ultrasonographic evaluation of the equine limb technique. In: ROSE, M.W.; DYSON, S. **Diagnosis and management of lameness in the horse**, California: Fallbrook, 2011. p. 182-205.

REES, S. G.; DENT, C. M.; CATERSON, B. Metabolism of proteoglycans in tendon. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 19, p. 470–478, 2009.

REIS, A. G. M. **Avaliação da aplicação do ultrassom terapêutico em tendinites em equinos**. 2009. 148 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RYAN, T.; SMITH, R. K. W. An investigation into the depth of penetration of low level laser therapy through the equine tendon in vivo. **Irish Veterinary Journal**, v. 60, n. 5, p. 295-299, 2007.

SÁNCHEZ, M.; ANITUA E.; ORIVE G.; MUJICA I.; ANDIA I. Platelet-Rich Therapies in the Treatment of Orthopaedic Sport Injuries. **Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 5, 345-354 2009.

SCHENKMAN, D.; ARMIEN, A.; POOL JR., R. WILLIAMS, J. M.; SCHULTZ, R. D.; GALANTE J.O. Systemic Proteoglycan Deposition Is Not a Characteristic of Equine Degenerative Suspensory Ligament Desmitis (DSLDD). **Journal of Equine Veterinary Science**. V. 29, n. 10, p. 748-752, 2009

SCHWARZBACH, S. V.; ALVES, G. E. S.; MELLO, E. G.; GOMES, M. G. SILVA, M. X. Desmopatia degenerativa em equinos: métodos de diagnóstico em animais vivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 784-790, 2010.

SMITH, R. K. W.; MCLLWRAITH, C. W. Consensus on equine tendon disease: Building on the 2007 Havemeyer symposium. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 2–6, 2012.

SOUZA, M. V.; VAN WEEREN, P. R.; VAN SCHIE, H. T. M.; VAN DE LEST, C. H. A. Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 7, p. 611-620, 2010.

TAYLOR, C. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 81, n.1, p. 3-12, 2006.

TAYLOR, D. W.; PETRERA, M.; HENDRY M.; THEODOROPOULOS J. S. A Systematic review of the use of platelet-rich plasma in sports medicine as a new treatment for tendon and ligament injuries. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 21, p. 344–352, 2011.

TEXTOR J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and il-1 receptor antagonist protein. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 27, p. 275–298, 2011.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; FILARDO G.; TSCHON, M.; PISCHEDDA, M.; PACORINI A.; KON, E.; GIARDINO, R. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. **International Orthopaedics (SICOT)**, v. 35, p. 1569–1576, 2011.

TUMILTY, S. M.; MUNN, J.; MCDONOUGH, S.; HURLEY, D. A.; BASFORD, J.; BAXTER, G. D. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 1, p. 3-16, 2010.

VOLETI, P. B.; BUCKLEY, M. R.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon healing: repair and regeneration. **Annual Review Biomedical Engineering**, v. 14, p. 47–71, 2012.

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 American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 1515–1520, 2008.

WERPY, N. M.; DENOIX, J. M. Imaging of the Equine Proximal Suspensory Ligament. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 28, p. 507–525, 2012.

YOON, J. H.; HALPER, J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 5, n. 1, p. 22-34, 2005.

ZAUSCHER, J. M.; ESTRADA, R.; EDINGER, J.; LISCHER, C. J. The proximal aspect of the suspensory ligament in the horse: How precise are ultrasonographic measurements?. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 7, p. 164-169, 2013.

ZHANG, G.; EZURA, Y.; CHERVONEVA, I.; ROBINSON, P. S.; BEASON, D. P.; CARINE, E. T.; SOSLOWSKY, L. J.; IOZZO, R. V.; BIRK, D. E. Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 1436–1449, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A - Medidas descritivas e teste F ou ANOVA. n=18. (*) Teste ANOVA Significante $p < 0,05$ – São Paulo – 2012/2013

| | | Media | Desvio Padrão | Erro padrão | 95% intervalo de confiança para média | | Mínimo | Maximo | P |
|---------------------|----|-------|---------------|-------------|---------------------------------------|-------------|--------|--------|----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | | |
| Volume | G1 | 0,63 | 0,17 | 0,07 | 0,45 | 0,81 | 0,33 | 0,78 | 0,003(*) |
| | G2 | 1,07 | 0,40 | 0,16 | 0,66 | 1,49 | 0,56 | 1,44 | |
| | G3 | 1,31 | 0,24 | 0,10 | 1,07 | 1,56 | 1,00 | 1,56 | |
| Dor | G1 | 0,93 | 0,45 | 0,18 | 0,46 | 1,40 | 0,44 | 1,56 | 0,112 |
| | G2 | 1,28 | 0,47 | 0,19 | 0,78 | 1,77 | 0,67 | 1,78 | |
| | G3 | 1,41 | 0,13 | 0,05 | 1,27 | 1,55 | 1,22 | 1,56 | |
| Perímetro | G1 | 19,37 | 0,98 | 0,40 | 18,34 | 20,40 | 18,31 | 20,83 | 0,194 |
| | G2 | 18,67 | 0,96 | 0,39 | 17,67 | 19,67 | 17,47 | 19,88 | |
| | G3 | 18,41 | 0,74 | 0,30 | 17,63 | 19,19 | 17,43 | 19,20 | |
| Ecogenicidade LSB | G1 | 1,13 | 0,32 | 0,13 | 0,80 | 1,46 | 0,89 | 1,67 | 0,602 |
| | G2 | 1,39 | 0,34 | 0,14 | 1,03 | 1,75 | 0,89 | 1,78 | |
| | G3 | 1,20 | 0,63 | 0,26 | 0,55 | 1,86 | 0,56 | 2,33 | |
| Ecogenicidade lesão | G1 | 1,93 | 0,36 | 0,15 | 1,55 | 2,31 | 1,33 | 2,22 | 0,931 |
| | G2 | 1,91 | 0,33 | 0,14 | 1,56 | 2,26 | 1,33 | 2,22 | |
| | G3 | 1,98 | 0,40 | 0,16 | 1,57 | 2,40 | 1,38 | 2,44 | |
| Área do LSB | G1 | 131,3 | 18,54 | 7,57 | 111,8 | 150,8 | 114,11 | 164,00 | 0,015(*) |
| | G2 | 128,7 | 12,13 | 4,95 | 115,9 | 141,4 | 115,11 | 146,44 | |
| | G3 | 157,4 | 17,53 | 7,16 | 139,0 | 175,8 | 136,33 | 187,11 | |
| Área lesão | G1 | 18,98 | 7,12 | 2,90 | 11,51 | 26,45 | 10,78 | 31,00 | 0,008(*) |
| | G2 | 21,98 | 5,65 | 2,31 | 16,05 | 27,91 | 13,44 | 29,33 | |
| | G3 | 32,88 | 7,84 | 3,20 | 24,65 | 41,11 | 25,33 | 45,11 | |
| Porcentagem | G1 | 14,39 | 4,61 | 1,88 | 9,55 | 19,22 | 10,44 | 22,44 | 0,115 |
| | G2 | 16,52 | 2,77 | 1,13 | 13,61 | 19,4 | 11,78 | 19,00 | |
| | G3 | 19,49 | 4,27 | 1,74 | 15,01 | 23,97 | 16,00 | 27,44 | |

Apêndice B - Medidas descritivas e teste não paramétrico. n=18 – São Paulo – 2012/2013

| GRUPOS | | Media | Desvio padrão | Mediana | Minimo | Maximo | p |
|----------------------|----|-------|---------------|---------|--------|--------|-------|
| Presença de calor | G1 | 0,46 | 0,08 | 0,44 | 0,33 | 0,56 | 0,731 |
| | G2 | 0,56 | 0,21 | 0,56 | 0,33 | 0,78 | |
| | G3 | 0,46 | 0,13 | 0,44 | 0,33 | 0,67 | |
| Alinhamento da lesão | G1 | 2,02 | 0,43 | 1,94 | 1,56 | 2,67 | 0,303 |
| | G2 | 2,33 | 0,44 | 2,56 | 1,78 | 2,67 | |
| | G3 | 2,15 | 0,49 | 2,33 | 1,38 | 2,67 | |

Apêndice C - Avaliação do Lameness Locator® semana 0- São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,246691 | 0,296131 | -2,573120 | -0,092690 | 0 | 0 |
| | 5 | 0,305256 | 0,291445 | -2,906244 | 0,361526 | 0 | 0 |
| | 6 | 0,130666 | 1,096636 | -5,330721 | -11,967928 | 1 | 0 |
| | 7 | 0,597816 | 0,000000 | -4,200015 | 12,067473 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,006029 | 0,575297 | -5,606045 | -7,886452 | 1 | 0 |
| | 9 | 0,054309 | 0,459695 | -5,562352 | -7,930323 | 0 | 0 |
| G2 | 10 | 0,225409 | 0,493007 | 3,189062 | -5,378515 | 0 | 0 |
| | 11 | 0,557003 | 0,260367 | -1,984678 | 4,649697 | 0 | 1 |
| | 12 | 0,343815 | 0,038479 | -1,890444 | 5,642539 | 0 | 0 |
| | 13 | 0,082130 | 0,347471 | -1,095852 | -4,446928 | 0 | 0 |
| | 14 | 0,062475 | 0,334762 | -3,226410 | -3,737791 | 0 | 0 |
| | 15 | 0,287500 | 0,319323 | -10,02414 | 0,667049 | 0 | 0 |
| G3 | 18 | | | | | | |
| | 19 | | | | | | |
| | 20 | 0,246520 | 0,417345 | -6,281543 | -2,153764 | 0 | 0 |
| | 21 | 0,066110 | 0,520566 | -2,646656 | -8,372387 | 1 | 0 |
| | 22 | 0,284759 | 0,262176 | 10,572070 | 0,917052 | 0 | 0 |
| | 23 | 0,254796 | 0,200928 | -2,156578 | 1,361647 | 0 | 0 |

Apêndice D - Avaliação do Lameness Locator ® Semana 1- São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | | | | | | |
| | 5 | 1,264330 | 0,000000 | 14,703557 | 25,881238 | 1 | 0 |
| | 6 | 0,000000 | 1,108146 | -11,54021 | -20,95572 | 1 | 0 |
| | 7 | 0,713371 | 0,038573 | -9,690819 | 9,312295 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,000000 | 0,649590 | -10,25894 | -10,98206 | 1 | 0 |
| | 9 | 0,256585 | 0,848648 | -10,17498 | -6,042296 | 0 | 0 |
| G2 | 10 | 0,171542 | 0,607721 | 3,424130 | -9,732798 | 0 | 1 |
| | 11 | 0,000000 | 0,889361 | 0,481003 | -21,90067 | 1 | 0 |
| | 12 | 0,000000 | 0,555120 | -7,026841 | -10,83859 | 1 | 0 |
| | 13 | 0,000000 | 1,010709 | -5,437826 | -23,62143 | 1 | 0 |
| | 14 | 0,831621 | 0,000000 | 11,762288 | 15,349088 | 1 | 0 |
| | 15 | 0,727211 | 0,000000 | 3,480669 | 13,768254 | 1 | 0 |
| G3 | 18 | | | | | | |
| | 19 | | | | | | |
| | 20 | 0,996934 | 0,000000 | -0,152824 | 16,958806 | 1 | 0 |
| | 21 | 1,695911 | 0,000000 | 29,085529 | 30,140642 | 0 | 1 |
| | 22 | | | | | | |
| | 23 | 0,251195 | 0,651801 | 2,806755 | -5,242731 | 1 | 0 |

Apêndice E - Avaliação do Lameness Locator ® Semana 2- São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,077050 | 0,571345 | -6,850128 | -7,712155 | 1 | 0 |
| | 5 | 0,994993 | 0,000000 | 8,234449 | 21,236141 | 1 | 0 |
| | 6 | 0,059403 | 0,601194 | -5,301473 | -10,509896 | 1 | 0 |
| | 7 | 0,565655 | 0,000000 | -2,414764 | 12,717119 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,214950 | 0,186383 | 2,947454 | 0,227941 | 0 | 0 |
| | 9 | 0,028174 | 0,904875 | -16,15581 | -12,939669 | 0 | 1 |
| G2 | 10 | 0,480869 | 1,146358 | -0,815543 | -9,534499 | 0 | 1 |
| | 11 | 0,229405 | 0,392580 | -0,390857 | -3,718100 | 0 | 0 |
| | 12 | 0,412900 | 0,121880 | -6,888585 | 4,421690 | 0 | 0 |
| | 13 | 0,030306 | 0,480471 | -2,821941 | -7,750806 | 0 | 0 |
| | 14 | 0,933951 | 0,000000 | 9,627221 | 22,289063 | 1 | 0 |
| | 15 | 0,451570 | 0,014077 | -2,538529 | 7,379762 | 0 | 0 |
| G3 | 18 | | | | | | |
| | 19 | | | | | | |
| | 20 | 0,768028 | 0,060393 | 4,074659 | 10,473481 | 1 | 0 |
| | 21 | 0,874763 | 0,045565 | 0,951466 | 8,139932 | 0 | 1 |
| | 22 | 1,847460 | 0,000000 | 30,162318 | 32,278166 | 1 | 0 |
| | 23 | 0,312341 | 0,208809 | -2,504057 | 0,408618 | 0 | 0 |

Apêndice F - Avaliação do Lameness Locator ® Semana 3 - São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,089669 | 0,300736 | -2,208382 | -2,350564 | 0 | 0 |
| | 5 | 0,928672 | 0,000000 | 1,360419 | 21,973319 | 1 | 0 |
| | 6 | 0,005447 | 0,918423 | -3,846566 | -18,365415 | 1 | 0 |
| | 7 | 0,513368 | 0,011637 | 0,479311 | 9,709797 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,030461 | 0,402786 | 2,369802 | -6,176942 | 0 | 0 |
| | 9 | 0,037521 | 1,034856 | -9,001876 | -14,454956 | 0 | 1 |
| G2 | 10 | 0,395055 | 0,126285 | -2,832135 | 4,144199 | 0 | 0 |
| | 11 | 0,134312 | 0,563825 | -6,356198 | -7,444921 | 1 | 0 |
| | 12 | 0,366376 | 0,047640 | 0,487756 | 4,800325 | 0 | 0 |
| | 13 | 0,000789 | 0,473514 | -5,602291 | -9,334335 | 0 | 0 |
| | 14 | 1,178852 | 0,000000 | 10,911883 | 27,303766 | 1 | 0 |
| | 15 | 0,626218 | 0,052843 | 3,711311 | 11,174499 | 1 | 0 |
| G3 | 18 | | | | | | |
| | 19 | | | | | | |
| | 20 | 0,436957 | 0,373903 | -12,10567 | -0,085092 | 0 | 0 |
| | 21 | 0,474068 | 0,041189 | 6,046218 | 5,591043 | 0 | 0 |
| | 22 | 1,067313 | 0,000000 | 19,178908 | 17,249083 | 1 | 0 |
| | 23 | 0,264619 | 0,211285 | -6,809373 | 4,224725 | 0 | 0 |

Apêndice G - Avaliação do Lameness Locator ® Semana 4 - São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,209899 | 0,546287 | -8,116337 | -3,242246 | 1 | 0 |
| | 5 | 0,815971 | 0,207534 | 6,600207 | 11,260551 | 1 | 0 |
| | 6 | 0,235875 | 0,730488 | -2,460658 | -6,787271 | 1 | 0 |
| | 7 | 0,608817 | 0,000000 | -3,038516 | 13,708954 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,810347 | 0,125407 | 19,126966 | 7,079624 | 0 | 1 |
| | 9 | 0,021882 | 0,682743 | -4,652267 | -13,717050 | 0 | 1 |
| G2 | 10 | 1,137062 | 0,346083 | 7,960454 | 11,727476 | 1 | 0 |
| | 11 | 0,196724 | 0,356565 | -2,847688 | -1,782847 | 0 | 0 |
| | 12 | 0,013663 | 0,775779 | -8,555975 | -13,966315 | 1 | 0 |
| | 13 | 0,268131 | 0,171989 | -0,076603 | 1,775650 | 0 | 0 |
| | 14 | 0,984784 | 0,000000 | 11,833501 | 18,749910 | 1 | 0 |
| | 15 | 0,828207 | 0,000000 | 8,690623 | 20,272693 | 1 | 0 |
| G3 | 18 | 2,192463 | 0,000000 | 12,009826 | 55,116457 | 1 | 0 |
| | 19 | 0,428593 | 0,960750 | -7,294231 | -6,005678 | 1 | 0 |
| | 20 | 0,000000 | 1,061729 | -22,82462 | -10,863913 | 0 | 1 |
| | 21 | 0,401265 | 0,025439 | -4,480125 | 3,949049 | 0 | 0 |
| | 22 | 1,649722 | 0,000000 | 20,606298 | 30,332623 | 1 | 0 |
| | 23 | 0,184083 | 0,518543 | -6,398707 | -5,465415 | 1 | 0 |

Apêndice H - Avaliação do Lameness Locator ® Semana 5- São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,136816 | 0,409855 | -1,519612 | -3,464244 | 0 | 0 |
| | 5 | 0,821629 | 0,021156 | 3,520170 | 16,335505 | 1 | 0 |
| | 6 | 0,351998 | 0,435657 | -1,160572 | -1,824896 | 0 | 0 |
| | 7 | 0,660602 | 0,000000 | -7,164301 | 13,316690 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,219328 | 0,409659 | 5,641914 | -1,327748 | 0 | 0 |
| | 9 | 0,171899 | 1,114758 | -12,95838 | -17,943104 | 0 | 1 |
| | 10 | 0,704197 | 0,029039 | 15,217137 | 6,865988 | 1 | 0 |
| | 11 | 0,428761 | 0,162861 | -3,118718 | 5,939997 | 0 | 0 |
| | 12 | 0,019123 | 0,637728 | -1,804856 | -11,307245 | 1 | 0 |
| G2 | 13 | 0,300895 | 0,203437 | -1,388727 | 2,438592 | 0 | 0 |
| | 14 | 0,508164 | 0,000000 | 1,368723 | 9,598455 | 1 | 0 |
| | 15 | 1,034974 | 0,000000 | 0,097982 | 28,495856 | 1 | 0 |
| | 18 | 0,660787 | 0,025223 | 2,425067 | 10,738188 | 1 | 0 |
| G3 | 19 | 0,125273 | 0,900275 | 1,244271 | -9,547967 | 1 | 0 |
| | 20 | 0,272930 | 0,395615 | -8,076764 | 0,242352 | 0 | 1 |
| | 21 | 0,995615 | 0,000000 | 14,452182 | 17,912085 | 0 | 1 |
| | 22 | 1,234010 | 0,024580 | 17,154042 | 21,625059 | 1 | 0 |
| | 23 | 0,128292 | 1,077598 | -18,70172 | -13,511939 | 1 | 0 |

Apêndice I- Avaliação do Lameness Locator ® Semana 6 - São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,599727 | 0,024122 | 3,290779 | 7,677085 | 0 | 1 |
| | 5 | 0,434037 | 0,093743 | 1,442804 | 6,418992 | 0 | 0 |
| | 6 | 0,000000 | 3,744077 | -26,69407 | -96,344346 | 1 | 0 |
| | 7 | 0,695794 | 0,015686 | -3,472497 | 12,459078 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,610467 | 0,139617 | 17,302869 | 4,813421 | 0 | 1 |
| | 9 | 0,243230 | 0,546812 | -4,077869 | -3,530443 | 0 | 1 |
| G2 | 10 | 0,035967 | 0,607254 | 3,179885 | -11,566207 | 0 | 1 |
| | 11 | 0,792914 | 0,141243 | -0,497079 | 11,787959 | 0 | 1 |
| | 12 | 0,266180 | 0,398812 | -10,08192 | -0,400190 | 0 | 0 |
| | 13 | 0,242190 | 0,110570 | 1,643184 | 1,907643 | 0 | 0 |
| | 14 | 0,360399 | 0,027243 | -0,103929 | 3,763072 | 0 | 0 |
| | 15 | 0,732274 | 0,000000 | 4,187380 | 15,006067 | 1 | 0 |
| G3 | 18 | | | | | | |
| | 19 | | | | | | |
| | 20 | 0,245185 | 0,390805 | -8,505308 | -3,069317 | 0 | 0 |
| | 21 | 0,906360 | 0,138035 | 7,624544 | 4,510298 | 0 | 1 |
| | 22 | 0,796558 | 0,000000 | 11,588156 | 10,436147 | 1 | 0 |
| | 23 | 0,203901 | 0,512019 | 0,166688 | -6,585939 | 1 | 0 |

Apêndice J - Avaliação do Lameness Locator ® Semana 7 - São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | | | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,322526 | 0,179765 | -0,329927 | 2,897994 | 0 | 0 |
| | 5 | 0,467390 | 0,180502 | 2,343408 | 5,087206 | 0 | 0 |
| | 6 | 0,187302 | 0,262410 | -0,509736 | -0,077662 | 0 | 0 |
| | 7 | 0,683437 | 0,023225 | -0,645350 | 12,746880 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,704769 | 0,132359 | 15,579351 | 8,390490 | 0 | 1 |
| | 9 | 0,033602 | 0,478057 | -0,956874 | -8,986525 | 0 | 1 |
| G2 | 10 | 0,071078 | 0,561497 | 6,615113 | -8,964716 | 0 | 1 |
| | 11 | 0,670661 | 0,357529 | -7,815338 | 6,214083 | 0 | 1 |
| | 12 | 0,112247 | 0,284327 | -4,146916 | -2,519421 | 0 | 0 |
| | 13 | 0,144468 | 0,184236 | -1,344637 | -0,991321 | 0 | 0 |
| | 14 | 0,196977 | 0,251420 | 2,853832 | -0,108657 | 0 | 0 |
| | 15 | 0,537006 | 0,011204 | 3,167571 | 9,475389 | 1 | 0 |
| G3 | 18 | | | | | | |
| | 19 | | | | | | |
| | 20 | 0,386560 | 0,429853 | -12,50142 | 2,819003 | 0 | 0 |
| | 21 | 0,506737 | 0,036562 | 1,800628 | 7,118127 | 0 | 1 |
| | 22 | 1,039416 | 0,020693 | 13,114795 | 18,709550 | 1 | 0 |
| | 23 | 0,002293 | 0,655698 | -6,774268 | -11,253946 | 1 | 0 |

Apêndice K - Avaliação do Lameness Locator® - semana 8 - São Paulo – 2012/2013

| GRUPO | ANIMAIS | A1/A2 | | Semana 8 | | Claudicação | |
|-------|---------|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------|-----|
| | | D | E | Maxdiff Normal | Mindiff Normal | TFDS | LSB |
| G1 | 4 | 0,400333 | 0,151531 | -4,740580 | 3,830080 | 0 | 0 |
| | 5 | 0,299746 | 0,283654 | 0,759959 | -0,077365 | 0 | 0 |
| | 6 | 0,000000 | 0,625034 | 0,887326 | -12,149166 | 1 | 0 |
| | 7 | 0,603116 | 0,000000 | -1,349358 | 12,900950 | 1 | 0 |
| | 8 | 0,222856 | 0,311800 | 6,904676 | -2,648316 | 0 | 0 |
| | 9 | 0,145368 | 0,461276 | 6,783989 | -6,840950 | 0 | 0 |
| G2 | 10 | 0,254860 | 0,278442 | 3,792057 | -1,352484 | 0 | 1 |
| | 11 | 0,762439 | 0,034723 | 3,281795 | 12,674608 | 0 | 1 |
| | 12 | 0,026631 | 0,411399 | -2,637750 | -7,565967 | 0 | 0 |
| | 13 | 0,192123 | 0,119469 | -2,063984 | 1,102288 | 0 | 0 |
| | 14 | 0,274163 | 0,065397 | 2,952159 | 4,007143 | 0 | 0 |
| | 15 | 0,325211 | 0,056185 | -0,853314 | 4,865531 | 0 | 0 |
| G3 | 18 | | | | | | |
| | 19 | | | | | | |
| | 20 | 0,967981 | 0,220309 | -9,293598 | 9,512296 | 1 | 0 |
| | 21 | 0,587339 | 0,014286 | 2,200312 | 9,127645 | 0 | 1 |
| | 22 | 0,549884 | 0,014443 | 5,393370 | 6,779846 | 1 | 0 |
| | 23 | 0,011041 | 0,563281 | -6,565218 | -6,672789 | 1 | 0 |