ANA GUIOMAR REIS SCHULTZ

**Efeito do implante autólogo do plasma rico em plaquetas associado
ao laser de baixa intensidade na reparação das tendinites em equinos**

São Paulo
2014

ANA GUIOMAR REIS SCHULTZ

**Efeito do implante autólogo do plasma rico em plaquetas associado
ao laser de baixa intensidade na reparação das tendinites em
equinos**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Raquel Yvonne Arantes
Baccarin

São Paulo

2014

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.2957
FMVZ

Schultz, Ana Guiomar Reis
Efeito do implante autólogo do plasma rico em plaquetas associado ao laser de baixa
intensidade na reparação das tendinites em equinos / Ana Guiomar Reis Schultz. -- 2014.
110 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Laser terapêutico. 2. Plasma rico em plaquetas. 3. Birregringência. 4. Tendão.
5. Proteoglicanos. I. Título.

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 em eqüinos", protocolado sob o nº 2284/2011, utilizando 12 (doze) equinos, sob a responsabilidade da 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", 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 março de 2014.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SCHULZ, Ana Guiomar Reis

Título: Efeito do implante autólogo do plasma rico em plaquetas associado ao laser de baixa intensidade na reparação das tendinites em equinos.

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A Deus por abençoar cada fase deste trabalho.

*Ao meu marido, Rodrigo Schultz, pelo carinho e
compreensão.*

*Aos meus pais, Carmelia e Eugênio, pelo
incentivo e confiança.*

*Aos meus irmãos, Camila e Eugênio Filho, pelo
apoio constante.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. **Raquel Yvonne Arantes Baccarin**, pela confiança, orientação, seu inestimável apoio e seus ensinamentos abrangentes a concretização deste trabalho. Obrigada por toda a paciência e dedicação, por acreditar na minha capacidade e me incentivar nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. **Nivaldo Antônio Parizotto**, pela contribuição valiosa e orientação e, sua equipe do Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Prof. Dr. **Bruno Cogliati** pela contribuição e colaboração durante a execução dos experimentos e, sua equipe do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial a sua aluna **Fernanda Rodrigues Agreste**.

À Prof^a Dr^a. **Yara Maria Corrêa da Silva Michelacci** do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, pela orientação e apoio sempre ofertados.

Aos colegas, **Paula Ramires** e **Carlos Salazar**, pela grande contribuição na execução deste experimento.

À **Ana Carolina e Rodrigo Rossi** pelo inestimável apoio ofertado, disponibilizando instalações e funcionários do **Instituto de Fomento Veterinário** para abrigar os animais e realizar parte deste projeto.

À Prof^a Dr^a. **Alma Hoge** pelos ensinamentos e apoio sempre ofertados e, sua equipe do Laboratório da Sociedade Hípica Paulista.

Ao médico veterinário **Henrique Dias Jorge** do Departamento de Patologia do Jockey Club de São Paulo, pela contribuição valiosa e apoio sempre ofertados.

À equipe do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao **Cláudio** e o **Luciano** pela colaboração.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao **Rosendo José Pires Neto e Marcos Alves** que prestaram valiosa colaboração para este projeto.

À **Elza**, funcionária da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela colaboração na revisão deste trabalho.

À **FAPESP** pelo incentivo financeiro e por proporcionar condições de desenvolvimento deste projeto.

À todos os meus **amigos e familiares**, pelo apoio nas horas mais difíceis e pela compreensão da minha ausência.

Nosso respeito aos **cavalos**, um estandarte em nossa pesquisa, que nos auxiliaram na elucidação deste experimento.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram a concretizar este trabalho, muito contribuindo para o meu crescimento individual e profissional.

RESUMO

SCHULTZ, A. G. R. **Efeito do implante autólogo do plasma rico em plaquetas associado ao laser de baixa intensidade na reparação das tendinites em equinos**. [Effect of autologous platelet-rich plasma combined with low-level laser in equine tendinitis]. 2014. 110 f. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A cicatrização do tendão é um complexo processo que envolve uma variedade de moléculas reguladoras. Como exemplos temos os fatores de crescimento positivamente correlacionados com a expressão de genes responsáveis pela síntese da matriz extracelular, bem como os proteoglicanos que atuam como organizadores dos tecidos capazes de modular o crescimento e a maturação celular de tecidos especializados. No intuito de reparar o tendão com lesão existem várias opções de tratamento, mas nenhuma tem sido relatada como plenamente eficaz. Sendo assim, na busca de tratamentos regenerativos e não apenas reparativos, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência do plasma rico em plaquetas (PRP) no processo de cicatrização do tendão flexor digital superficial de equinos, utilizando-se deste tratamento isoladamente ou associado ao laser terapêutico. Com essa finalidade, 26 membros torácicos de equinos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos distintos: o grupo 1 (G1) foi composto por oito membros torácicos sadios provenientes de cadáveres frescos; no grupo 2 (G2) em seis membros foi induzida a tendinite, sem a realização de qualquer tipo de tratamento; no grupo 3 (G3) a tendinite também foi induzida em seis membros, os quais receberam o tratamento com o PRP; e no grupo 4 (G4) a tendinite foi induzida em seis membros torácicos que receberam o tratamento com o PRP associado ao laser terapêutico. Os animais foram avaliados clinicamente e ultrassonograficamente. Já as amostras do tecido tendíneo, obtidas por biópsia guiada por ultrassom, foram avaliadas por imunoistoquímica quanto a presença dos proteoglicanos: decorim, biglicam, fibromodulim e agregam. Nessas amostras também foi realizada a análise da birrefringência do colágeno. Na avaliação clínica verificou-se que o grupo G4 foi o único que não mais apresentou sensibilidade à palpação no local da lesão ao término do experimento. Já na avaliação ultrassonográfica, os tendões dos membros torácicos dos grupos G3 e G4 que receberam os tratamento com PRP

demonstraram melhora na ecogenicidade tanto do tendão como da lesão. Além disso, os tendões do grupo G4 apresentaram melhora no paralelismo das fibras de colágeno. Na avaliação imunoistoquímica os resultados demonstraram que o biglicam, o fibromodulim e o agrecam tiveram sua expressão aumentada nas amostras do grupo G4 tratados com a associação PRP e laser quando comparados com as amostras do tendão hígido do grupo G1. Já no grupo G2 observou-se apenas o aumento da expressão de agrecam em relação ao G1. Na análise da birrefringência do colágeno o maior valor de retardo óptico (OR) foi apresentado também nas amostras do grupo tratado com a associação do PRP e laser (G4). Durante o processo de regeneração de um tendão lesado há uma tendência para o aumento dos valores de OR, o que representa uma melhora na organização do colágeno. Provavelmente, o laser foi capaz de produzir um aumento na síntese de colágeno e uma melhor agregação e alinhamento das fibras de colágeno. Assim, concluímos que o tratamento com PRP associado ao laser demonstrou melhora clínica, ultrassonográfica, de birrefringência e na expressão de proteoglicanos da matriz extracelular, o que não ocorreu quando utilizado isoladamente.

Palavras-chave: Laser terapêutico. Plasma rico em plaquetas. Birrefringência. Tendão. Proteoglicanos.

ABSTRACT

SCHULTZ, A. G. R. **Effect of autologous platelet-rich plasma combined with low-level laser in equine tendinitis**. [Efeito do implante autólogo do plasma rico em plaquetas associado ao laser de baixa intensidade na reparação das tendinites em equinos]. 2014. 110 f. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Tendon healing is a complex process involving a variety of regulatory molecules. Growth factors are a family of such molecules; and their presence is positively correlated with the expression of genes responsible for extracellular matrix synthesis. Proteoglycans more than extracellular matrix components are tissue organizers capable of modulating cell growth and maturation in specialized tissues. In order to repair the tendon injury there are several treatment options, but none has been reported as fully effective. In this scenario, regenerative approaches are currently preferred over reparative therapeutic procedures. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of platelet-rich plasma (PRP) in the healing of the equine superficial digital flexor tendon, using this treatment, alone or associated with the laser therapy. For this purpose, 26 equine forelimbs were randomly divided into four groups: group 1 (G1) consisted of eight healthy forelimbs from fresh cadavers; in group 2 (G2), tendinitis was induced in six forelimbs, without performing any type of treatment; in group 3 (G3), tendinitis was also induced in six forelimbs which received PRP treatment; and in group 4 (G4), tendinitis was induced in six forelimbs that received treatment with PRP associated with laser therapy. All animals were evaluated clinically and sonographically. Additionally, tendon tissue samples were obtained by ultrasound-guided biopsy, and assessed by immunohistochemistry to determine proteoglycans expression (decorin, biglycan, fibromodulin and aggrecan). These samples were further analyzed for collagen organization through birefringence. In the clinical evaluation, only G4 animals had absent painful response to direct digital palpation at the end of the experiment. During sonographic evaluation, it was observed that tendons from groups G3 and G4, that received the treatment with PRP, demonstrated improvement in both tendon and lesion echogenicity. Furthermore, tendons from the G4 group showed improvement in axial alignment of collagen fibers. The results showed an increase in biglycan,

fibromodulin and aggrecan expression at immunohistochemical evaluation of G4 samples, when compared with healthy tendon samples (G1). In tendons from the G2 group only an increased aggrecan expression compared to G1 was observed. Though the analysis of the collagen birefringence, the highest value of optical retardation (OR) was also presented in the samples of the group treated with the combination of PRP and laser (G4). During the regeneration process of an injured tendon, there is a trend to increase OR values, which represents an improvement of the collagen organization. Probably, the laser was able to induce an increased synthesis and a better aggregation and alignment of collagen. So, we conclude that the animals treated with PRP associated with laser therapy improved clinically and sonographically. Moreover, this treatment improved the arrangement of collagen fibril and enhanced the proteoglycans expression in the extracellular matrix, what did not occur when PRP treatment was used alone.

Keywords: Low-level laser. Platelet-rich plasma. Birrefringence. Tendon. Proteoglycans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Precedimento de anestesia local por infiltração perineural – São Paulo – 2013.....	46
Figura 2 – Imagem ultrassonográfica do momento da infiltração com collagenase – São Paulo – 2013	48
Figura 3 – Imagem do momento da administração intratendínea do plasma rico em plaquetas guiada por ultrassom – São Paulo – 2013	50
Figura 4 – Imagem ultrassonográfica do momento da infiltração do plasma rico em plaquetas – São Paulo – 2013.....	51
Figura 5 – Imagem do momento da introdução da agulha para a realização da biópsia – São Paulo – 2013.....	57
Figura 6 – Imagem ultrassonográfica do momento da realização da biópsia – São Paulo – 2013	57
Figura 7 – Esquema organizacional do delineamento experimental – São Paulo – 2011 a 2013.....	62
Figura 8 – Imagem microscópica da imunomarcação na matriz extracelular do tendão para os anticorpos decorim, biglicam, fibromodulim e agrecom (Aumento de 20x) – São Paulo – 2014.....	87
Figura 9 – Análise quantitativa da birrefringência das amostras dos tendões dos grupos G1, G2, G3 e G4, com seu eixo longitudinal orientado a 45° em relação a direção de propagação da luz polarizada. (Aumento de 20x) – São Paulo – 2014	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição dos animais segundo grupo, raça, sexo, idade (anos), peso (kg) e membro que recebeu tratamento – São Paulo – 2011 a 2013	44
Quadro 2 – Descrição da escala em escore para o aumento de volume local, sensibilidade à palpação e presença de calor – São Paulo – 2011 a 2013	53
Quadro 3 – Descrição da avaliação da dinâmica do animal quanto à presença ou não de claudicação – São Paulo – 2011 a 2013.....	53
Quadro 4 – Escore correspondente a ecogenicidade do tendão e da lesão na avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2011 a 2013	55
Quadro 5 – Escore correspondente ao alinhamento das fibras de colágeno do tendão, no local da lesão, na avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2011 a 2013	55
Quadro 6 – Escore correspondente a porcentagem (%) de área marcada com o anticorpo primário no local da lesão na avaliação imunoistoquímica – São Paulo – 2014.....	60
Quadro 7 – Escore correspondente a intensidade de marcação do anticorpo primário no local da lesão na avaliação imunoistoquímica – São Paulo – 2014	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore da avaliação do aumento de volume do TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	64
Tabela 2 – Escore da avaliação da presença de calor no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	67
Tabela 3 – Escore da avaliação da sensibilidade à palpação no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	69
Tabela 4 - Perímetros das circunferências (cm) na região metacarpiana no local da lesão, no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	71
Tabela 5 – Escore da presença ou não de claudicação no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	73
Tabela 6 – Escore da ecogenicidade do tendão por avaliação ultrassonográfica no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas, – São Paulo – 2011 a 2013	75
Tabela 7 – Escore da ecogenicidade da lesão por avaliação ultrassonográfica no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	78
Tabela 8 – Escore do grau de alinhamento das fibras tendíneas no plano longitudinal no local da lesão, por avaliação ultrassonográfica no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	80
Tabela 9 - Área do tendão (mm ²) por avaliação ultrassonográfica no plano transversal no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2014	82
Tabela 10 - Área da lesão (mm ²) por avaliação ultrassonográfica no plano transversal no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	83

Tabela 11 – Porcentagem de área lesada (%) por avaliação ultrassonográfica no plano transversal no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013	84
Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do decorim nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013	85
Tabela 13 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do biglicam nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013	85
Tabela 14 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do fibromodulim nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013.....	86
Tabela 15 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do agrecam nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013	86
Tabela 16 – Média e desvio padrão dos retardos ópticos (ηm) dos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013	88
Tabela 17 – Demonstração da contagem de plaquetas no sangue total (inicial) e no plasma rico plaquetas (final), com o correspondente fator de multiplicação – São Paulo – 2011 a 2013.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
COMP	proteína oligomérica de matriz cartilágnea
DAB	diaminobenzidina
EGF	fator de crescimento epitelial
FGF	fator de crescimento dos fibroblastos
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G1	grupo 1
G2	grupo 2
G3	grupo 3
G4	grupo 4
GaAlAs	arseneto de gálio-alumínio
GaAs	arseneto de gálio
HeNe	hélio-neon
IGF	fator de crescimento semelhante a insulina
i.v.	intravenoso
J	joule
kg	quilograma
LASER	<i>light amplification by stimulated emission</i>
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama
MHz	megahertz
ml	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
mW	miliwatt
nº	número
nm	nanômetro
OR	retardo óptico

PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PPS	pulsos por segundo
PRP	plasma rico em plaquetas
RNA-m	ácido ribonucléico mensageiro
SRD	sem raça definida
TFDS	tendão flexor digital superficial
TGF- β	fator de crescimento transformador beta
USP	Universidade de São Paulo
W	watt

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
α	alfa
β	beta
ηm	nanômetro
λ	lambda
<	menor
°C	graus Celsius
μm	micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 TENDÃO FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL	23
2.1.1 Cicatrização	26
2.2 PROTEOGLICANOS	27
2.2.1 Decorim	29
2.2.2 Biglicam	30
2.2.3 Fibromodulim	31
2.2.4 Agrecam	32
2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS	33
2.4 LASER	35
2.5 BIRREFRINGÊNCIA	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.1.1 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	42
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	42
4.3 ANALGESIA DOS ANIMAIS	44
4.3.1 Anestesia local por infiltração perineural	45
4.4 INFILTRAÇÃO POR COLAGENASE	46
4.5 PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PRP	48
4.5.1 Infiltração do PRP	49
4.6 PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM LASER TERAPÊUTICO	51
4.7 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO CONTROLADO	52
4.8 AVALIAÇÃO FÍSICA	52
4.8.1 Critérios de avaliação física	52
4.9 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	53
4.9.1 Critérios de avaliação ultrassonográfica	54
4.11 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	58
4.11.1 Avaliação imunoistoquímica	58
4.11.1.1 Análise dos resultados	59

4.11.2 Análise da birrefringência do colágeno	60
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	62
5 RESULTADOS	62
5.1 ANALGESIA DOS ANIMAIS	62
5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA	62
5.3 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	74
5.4 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA	85
5.4.1 Anticorpo decorim	85
5.4.2 Anticorpo biglicam	85
5.4.3 Anticorpo fibromodulim	86
5.4.4 Anticorpo agregam	86
5.5 ANÁLISE DA BIRREFRINGÊNCIA DO COLÁGENO	88
5.6 PLASMA RICO EM PLAQUETAS	90
6 DISCUSSÃO	91
6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	91
6.2 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	92
6.3 IMUNOISTOQUÍMICA	93
6.4 BIRREFRINGÊNCIA	95
6.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS	97
6.6 LASER	98
7 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

Para a maioria dos atletas, referindo-se também aos cavalos, a rápida recuperação após a lesão é o principal objetivo. Por outro lado, a lesão no tendão leva meses ou anos para cicatrizar, além disso, raramente recupera a sua resistência mecânica e elasticidade originais (ENWEKA et al., 1994; SCHNABEL et al., 2008). Isso ocorre porque o tendão é um tecido de composição complexa, com estrutura, função e mecânica únicos (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012). A lesão deste tecido conjuntivo vital pode resultar em dor significativa e incapacidade (STERGIOULAS et al., 2008). Foi demonstrado que o tendão é submetido a várias fases de cicatrização, e que cada fase envolve um conjunto de eventos ultraestruturais diferentes (ENWEKA et al., 1994). Por isso, a estratégia para o tratamento bem sucedido da tendinopatia provavelmente deve incluir a modulação da inflamação na fase aguda e um aumento da regeneração das fibras de colágeno nas seguintes fases da cicatrização (STERGIOULAS et al., 2008). Os tratamentos de eleição das tendinites, para a maioria dos pesquisadores, são as injeções de corticóides ou o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (GINN et al., 1997). Entretanto, essas drogas normalmente tratam apenas os sintomas da inflamação e não a causa da doença. Além disso, foram observados vários efeitos colaterais relacionados ao uso por tempo prolongado dessas drogas (MARCOS et al., 2012). Como estas, existem várias outras opções de tratamento, mas nenhuma tem sido relatada como sendo mais eficaz do que a outra. Por essa razão, alguns pesquisadores estão passando por uma transição da medicina reparativa para uma medicina regenerativa. Havendo de um lado as terapias celulares, e do outro o uso de agentes físicos.

O PRP está surgindo como um método econômico de se obter e gerenciar fatores de crescimento autólogos. As plaquetas possuem os α -grânulos que contêm uma variedade de fatores de crescimento. Tem sido sugerido que as concentrações de fatores de crescimento supra-fisiológicas presentes nesta substância possam atuar de uma forma positiva, acelerando a cicatrização de feridas, a diminuição da resposta inflamatória e promovendo a regeneração, não apenas na reparação dos tecidos afetados (ARGÜELLES et al., 2006).

O uso de agentes físicos para facilitar o processo de cicatrização dos tendões e minimizar as complicações também têm sido o foco de várias pesquisas (ENWEKA et al., 1994). A terapia com laser de baixa intensidade tem o potencial de modular tanto o processo inflamatório como os processos regenerativos (STERGIOULAS et al, 2008). Ela influencia vários processos biológicos em animais e humanos estimulando a cicatrização e síntese de colágeno, bem como promovendo o processo de regeneração músculo-esquelético (BARBOSA, 2012). Nos tendões, alguns estudos demonstraram o aumento de fibroblastos, síntese de colágeno (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006) e reparação (OLIVEIRA et al., 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TENDÃO FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL

O tendão é um tecido de composição complexa, com uma função predominantemente mecânica: traduzir as contrações musculares em movimentos articulares por meio da transmissão de forças do músculo ao osso (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012). Devido a sua localização distal no membro, na região palmar e plantar, o tendão flexor digital superficial (TFDS) atua também no suporte do peso do cavalo, por consequência da hiperextensão das articulações metacarpo e metatarsofalangeanas (SMITH, 2011).

É composto predominantemente por fibroblastos, que por sua vez sintetizam as moléculas da matriz extracelular (MEC) (FRANCHI et al., 2007). Os tenócitos são essenciais na formação e manutenção do tecido tendíneo, sendo de quatro diferentes tipos, identificados nos fascículos do tendão normal do equino: I, II, III e IV. A proporção dessas células varia de acordo com a idade e localização, sendo as do tipo I predominante em animal adulto; tipo II em animal jovem; tipo III nas zonas de compressão do tendão; e tipo IV no endotendão (SMITH; GOODSHIP, 2004). A atividade desses diferentes tipos celulares ainda é desconhecida, assim como a regulação do seu metabolismo que provavelmente depende da combinação dos estímulos mecânicos e das citocinas (SMITH, 2011). Entretanto, os tenócitos requerem a adição de fatores de crescimento para responder a estímulos de tensão (PRADES, 2009).

As características biomecânicas do tendão são determinadas pela composição e organização da MEC (SMITH, 2011). Esta possui dois componentes principais: uma substância básica e os elementos fibrosos. A substância básica é constituída por água e glicoproteínas não colágenas [proteína oligomérica de matriz cartilaginosa (COMP) e outras proteínas]. A porção fibrosa é composta de colágeno e elastina (PRADES, 2009).

O colágeno representa cerca de 80% da matéria seca, sendo 95% do colágeno total do tipo I (PRADES, 2009), havendo uma pequena porção do tipo II

presente nas inserções e nas porções fibrocartilágnea e de colágeno tipo III presente no endotendão (SMITH, 2011).

As moléculas de colágeno são construídas em uma série de subunidades progressivamente mais largas que se agregam e formam o tendão. Portanto, as moléculas de tropocolágeno são agregadas em fibrilas de colágeno de uma forma altamente organizada. Sendo que estas fibrilas são compostas por cinco moléculas de colágeno. Então, as fibrilas de colágeno, por sua vez, são agregadas em um padrão com orientação longitudinal em subunidades mais largas, para finalmente formar as fibras de colágeno. As fibras de colágeno são associadas para formar os fascículos do tendão (SMITH; GOODSHIP, 2004).

As lesões no tendão podem ocorrer por um esforço excessivo, ou por consequência de um traumatismo percutâneo penetrante ou lacerante (PRADES, 2009). A lesão do tendão por esforço excessivo é a lesão ortopédica mais comum em animais atletas e pode ocorrer por um esforço abrupto ou por degeneração (SMITH; GOODSHIP, 2004).

O mecanismo de degeneração do tendão é ainda incerto, mas existem várias possibilidades decorrentes de transtornos físicos ou metabólicos. Uma possibilidade é o aumento de temperatura no centro do tendão. Apesar dos tenócitos do TFDS demonstrarem resistência ao aumento de temperatura, o dano pode ocorrer nas proteínas da MEC. A idade e o exercício também provocam a degeneração da MEC do tendão, caracterizada pela perda das proteínas não colágenas (SMITH; GOODSHIP, 2004). Um desequilíbrio entre a síntese da MEC e a degradação de várias proteínas da MEC é um outro mecanismo possível pelo qual o tendão pode ficar mais fraco e predisposto a tendinite (SMITH, 2011).

A lesão clínica ocorre quando o tendão encontra uma tensão maior que ultrapassa a sua integridade estrutural, resultando em danos irreversíveis. Os fatores de risco predisponentes são: velocidade, peso que o cavalo suporta, fadiga, ferrageamento, superfície de trabalho, saltos, metodologia de treino e falta de condicionamento (SMITH; GOODSHIP, 2004; ROSS et al., 2011),

Devido ao papel crítico deste tecido na mecânica corporal, sua lesão e degeneração podem ser altamente debilitantes, resultando em dor significativa, incapacidade e custos à saúde. Quando um tendão sofre uma lesão, a sua estrutura é rompida, e sua função adequada pode ser comprometida (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012).

O diagnóstico da lesão no tendão é baseado no histórico e no desenvolvimento dos sinais da inflamação (dor, calor, edema e claudicação) (SMITH; GOODSHIP, 2004). O aumento de temperatura pode ser a primeira e mais sutil manifestação clínica da lesão no TFDS. Outra manifestação clínica associada é o edema subcutâneo, principalmente na fase aguda. A resposta dolorosa à palpação direta é o teste clínico mais confiável para a lesão no tendão e também pode ser a primeira manifestação clínica. A claudicação geralmente não está presente no início, pois está relacionada com a gravidade da lesão (ROSS et al., 2011).

Para confirmar o diagnóstico e acessar objetivamente a gravidade da lesão o exame ultrassonográfico deve ser utilizado (ROSS et al., 2011). É recomendada a avaliação ultrassonográfica na área lesada após quatro a sete dias do início, já que várias lesões aumentam durante os primeiros dias (SMITH; GOODSHIP, 2004). Para a realização desse exame o cavalo deve permanecer na posição quadrupedal, sendo a avaliação realizada com imagens longitudinal e transversal. A lesão aguda se caracteriza pelo aumento da estrutura, por uma imagem hipoeecogênica ou anecóica, padrão estriado reduzido nas imagens longitudinais e, alteração em sua forma, bordas e posição (SMITH; GOODSHIP, 2004).

O tratamento inicial inclui o repouso, aplicação de gelo e bandagem, com o objetivo de minimizar a inflamação e limitar a ação de enzimas proteolíticas que continuam destruindo o tendão. Intervenções farmacológicas incluem o uso de esteróides de curta duração nas primeiras 24 a 48 horas (SMITH; GOODSHIP, 2004), anti-inflamatórios não esteróides, injeções intralesionais de glicosaminoglicanos sulfatados, ácido hialurônico e fumarato betaminopropionitril (SMITH; ROSS; SMITH, 2006). Esses tratamentos devem ser combinados com um programa de exercício controlado e avaliação ultrassonográfica seriada (ROSS et al., 2011). O tratamento cirúrgico na fase inflamatória inclui o *splitting* percutâneo (SMITH; GOODSHIP 2004), desmotomia do ligamento acessório do TFDS e ligamento anular (ROSS et al., 2011).

Entretanto, muitos destes tratamentos ainda apresentam um resultado limitado quando avaliado o retorno dos cavalos atletas às competições (SMITH; ROSS; SMITH, 2006).

2.1.1 Cicatrização

O cronograma das mudanças mecânicas e estruturais na cicatrização tendínea pode depender de inúmeras variáveis, incluindo idade, espécie, estratégia de reparo, modelo de lesão e localização anatômica. Imediatamente após uma lesão, os tendões geralmente apresentam uma diminuição substancial em parâmetros de organização e mecânicos, seguido por uma reestruturação lenta, mas incompleta das características iniciais (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012).

A resposta à lesão do tendão pode ser dividida em três fases que se sobrepõem: inflamatória, reparadora e remodeladora. Esse período de cicatrização pode perdurar de 14 a 18 meses (PRADES, 2009).

Na fase inflamatória, o local da ferida é infiltrado por hemácias, leucócitos e plaquetas, junto com fatores de crescimento importantes e quimioatrativos endoteliais. Enquanto o coágulo de fibrina é formado para proporcionar rigidez temporária, os macrófagos digerem restos necróticos. Os tenócitos são recrutados para a área da ferida, onde são estimulados a proliferar, principalmente no epitendão (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012). Essa fase começa como o início da lesão clínica e tem duração de uma a duas semanas (SMITH, 2011).

A segunda fase, conhecida como fase proliferativa ou de reparo, começa bruscamente em dois dias após a resposta à lesão (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012), sobrepondo a fase de inflamação e tendo seu ápice em 3 semanas (SMITH, 2011). Esta fase de cicatrização é caracterizada por atividade de síntese profusa conduzida por macrófagos e tenócitos. O macrófago, cujo papel muda de ação fagocitária para reparadora poucos dias após a lesão, libera fatores de crescimento e controla o recrutamento de células. Enquanto isso, os tenócitos depositam uma matriz temporária mecanicamente inferior e composta principalmente de colágeno tipo III (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012).

Na terceira e última fase, conhecida como fase de remodelação, a síntese do colágeno tipo I começa a predominar e a MEC torna-se mais alinhada. Além disso, a densidade celular e a atividade de síntese geral são gradualmente diminuídas. Esta fase começa entre um a dois meses após a lesão e pode durar mais de um ano. O tecido reparado aparece como cicatriz e nunca recupera completamente as

propriedades biomecânicas que tinha antes da lesão (VOLETI; BUCKLEY; SOSLOWSKY, 2012).

As características do tendão normal são observadas com a redução gradual do tamanho do fibroblasto e um aumento do alinhamento das fibras do tecido conjuntivo. A ondulação do tendão normal não se restabelece em menos de 14 meses (WILLIAMS et al., 1984).

2.2 PROTEOGLICANOS

Os proteoglicanos estão presentes em todos os tecidos animais e são sintetizados por todos os tipos celulares. Atualmente, a forma mais comum utilizada para classificar os proteoglicanos baseia-se em sua localização e na estrutura do esqueleto protéico. Nas células, os proteoglicanos estão presentes no grânulos citoplasmáticos e na superfície celular; já na matriz extracelular, os proteoglicanos estão presentes na membrana basal e na MEC (LIMA, 2009).

Os proteoglicanos da MEC podem ser classificados em dois subgrupos: os proteoglicanos de baixo peso molecular (pequenos proteoglicanos ricos em leucina) e os proteoglicanos de alto peso molecular (hialectanos) (IOZZO, 1998; LIMA, 2009). Os pequenos proteoglicanos encontrados no tendão são: decorim, biglicam, fibromodulim e lumicam (YOON; HALPER, 2005). E os grandes proteoglicanos de agregação são: o agregam e versicam (PARKINSON et al., 2011).

Tensões mecânicas e de pressão têm impacto diferenciado sobre a expressão dos proteoglicanos em tendões, por exemplo, a tensão mecânica induz a síntese de decorim, enquanto que a compressão estimula a produção do grande proteoglicano agregam (YOON; HALPER, 2005). Os proteoglicanos compõem aproximadamente 1% do peso seco das regiões de tensão da maioria dos tendões, entretanto, eles são passíveis de contribuir para as propriedades biomecânicas e estruturais da MEC do tendão (PARKINSON et al., 2011). Assim, na região de tensão do tendão, estão presentes 90% dos pequenos e 10% dos grandes proteoglicanos (VOGEL; PULSSON; HEINEGÅRD, 1984; YOON; HALPER, 2005). Sendo assim, temos o decorim como principal proteoglicano presente no tendão, que constitui aproximadamente 80% do conteúdo total de proteoglicano na região de

tensão do tendão (SAMIRIC; ILIC; HANDLEY, 2004); e o versican como principal grande proteoglicano de agregação (CORPS et al., 2005). Na zona de compressão, estão presentes 50% de cada grupo dos proteoglicanos (YOON; HALPER, 2005), sendo o agrecan e o biglican os principais proteoglicanos presentes (CORPS et al., 2005).

A função dos diferentes proteoglicanos é determinada pela estrutura de sua proteína principal e suas cadeias de glicosaminoglicanos (PARKINSON et al., 2011). A função dos proteoglicanos como organizadores de tecidos torna-os capazes de modular o crescimento e a maturação celular de tecidos especializados. Também atuam como filtros biológicos, modulam as atividades do fator de crescimento, regulam fibrilogênese do colágeno e a força de tensão, afetam o crescimento e invasão de células tumorais e influenciam a transparência da córnea (IOZZO, 1998; YOON; HALPER, 2005).

Como mencionado anteriormente, a fibrilogênese do colágeno tipo I é regulada por proteoglicanos presentes na MEC (YOON; HALPER, 2005). Vários membros da família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina interagem diretamente com as fibrilas de colágeno. Podemos mencionar pelo menos três membros dessa família que podem atrasar a formação de fibrilas na fibrilogênese: decorin, fibromodulim e lumican (IOZZO, 1998). Como estes três proteoglicanos, o biglican também se liga à fibrilas de colágenos; entretanto, em dois locais distintos. Decorin e biglican competem pelo mesmo local no colágeno tipo I, sendo distinto do local de ligação do fibromodulim e lumican (ZHANG et al., 2006). Contudo, na ausência do decorin ou do biglican, as expressões do fibromodulim e do lumican são alteradas (DUNKMAN et al., 2013)¹. As fibrilas de colágeno são moléculas essenciais da matriz do tecido do tendão, sendo importantes para restaurar a força do tendão. A organização e resistência das fibras de colágeno podem ser influenciadas pelos proteoglicanos e, alguns destes também podem influenciar os níveis dos fatores de crescimento ativos envolvidos no processo de cicatrização e formação de aderências (BERGLUND et al., 2006).

¹ DUNKMAN, A. A.; BUCKLEY, M. R.; MIENALTOWSKI, M. J.; ADAMS, S. M.; THOMAS, S. J.; SATCHELL, L.; KUMAR, A.; PATHMANATHAN, L.; BEASON, D. B.; IOZZO, R. V.; BIRK, D. E.; SOSLOWSKY, L. J. The tendon injury response is influenced by decorin and biglycan. **Annals of Biomedical Engineering**. (Aceito para publicação em 2013). Pré-print.

Já os grandes proteoglicanos, devido a alta densidade fixa da carga negativa e da força de repulsão entre as cargas, são rigidamente estendidos para fornecer as fibrilas de colágeno uma alta capacidade de resistir a alta compressão e as forças de tensão (YOON; HALPER, 2005).

Existe um equilíbrio entre a síntese e o catabolismo dos proteoglicanos. Em condições normais, os tenócitos são responsáveis pelo metabolismo de proteoglicanos nos tendões, pois respondem à carga mecânica com a expressão desses proteoglicanos e outras macromoléculas da MEC (BANES et al., 1999). Já nos tendões com lesão, a análise histoquímica relata um aumento do conteúdo de glicosaminoglicanos na MEC do tecido quando comparados com tendões normais. Esse aumento chega a cinco vezes, refletindo no aumento dos níveis dos grandes proteoglicanos agregam e versicam. Como os grandes proteoglicanos ligam-se a água, um aumento dos níveis destes proteoglicanos são passíveis de contribuir para o edema dos tecidos, uma característica comum da doença (PARKINSON et al., 2011).

Tanto nos tendões normais como nos tendões com lesão, a maioria dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina estão presentes na MEC com suas proteínas principais intactas, enquanto a maioria dos grandes proteoglicanos têm suas proteínas principais frequentemente fragmentadas (PARKINSON et al., 2011).

2.2.1 Decorim

O decorim é o proteoglicano mais abundante no tendão. Como um membro do grupo dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina, o decorim contém um esqueleto proteico rico em leucina e carrega uma ou duas cadeias de condroitim sulfato ou dermatam sulfato (YOON; HALPER, 2005). O decorim fica ligado ao colágeno tipo I por interações fortes e específicas entre as fibrilas de colágeno tipo I e do esqueleto protéico do decorim (WATANABE et al., 2005).

No TFDS de equinos o decorim foi detectado em toda sua extensão, entretanto, sua quantidade diminui gradualmente da região proximal para a região distal. Isso influencia o diâmetro das fibrilas de colágeno, que por sua vez difere em sua distribuição ao longo da região metacarpiana (WATANABE et al., 2005).

O decorim é considerado o regulador chave da organização da matriz porque limita a formação de fibrilas de colágeno e, portanto, coordena a remodelação do tendão devido a forças de tensão (DANIELSON et al., 1997; YOON; HALPER, 2005). Suas principais funções são: manter e regular a estrutura da fibrila de colágeno; regular a proliferação celular principalmente por meio da inibição da proliferação e distribuição celular; além de estimular respostas imunes (YOON; HALPER, 2005). O decorim também parece estar relacionado com o alinhamento, orientação e ordem das fibrilas de colágeno, facilitando o seu deslizamento durante a deformação mecânica (FRANCHI et al., 2007).

Tendões de ratos deficientes em decorim demonstraram perfis irregulares e associações laterais anormais com as fibrilas adjacentes, indicando fusão lateral anormal ou rearranjo molecular. Esses animais também apresentaram fibrilas com diâmetros maiores, com redução significativa na resistência mecânica e da rigidez. Acredita-se que a interação do decorim com a fibrila seja um importante mecanismo regulatório da fibrilogênese no desenvolvimento do tendão (ZHANG et al., 2006).

O decorim também está envolvido na regulação da proliferação celular por meio da inibição do fator de crescimento transformador (TGF- β) e da ligação direta ao receptor de fator de crescimento epitelial (EGF) (YOON; HALPER, 2005).

2.2.2 Biglicam

O biglicam é outro membro dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina, contendo duas cadeias de dermatam sulfato ligadas ao seu esqueleto protéico (YOON; HALPER, 2005).

O biglicam também interage com o colágeno tipo I, se liga ao TGF- β e participa na proliferação celular, assim como o decorim (YOON; HALPER, 2005). O decorim e biglicam se expressam diferentemente durante o desenvolvimento normal do tendão. Entretanto, o biglicam aumenta em tendões de ratos deficientes em decorim para compensar a sua falta, sugerindo que o biglicam pode substituir parcialmente o decorim na regulação da fibrilogênese do colágeno no desenvolvimento do tendão (ZHANG et al., 2006).

O biglicam possui um papel importante na fase inicial da cicatrização (DUNKMAN et al., 2013)². Fibrilas de colágeno do tendão do músculo quadríceps possuem o diâmetro menor e morfologia anormal em ratos deficientes em biglicam. Assim a falta do biglicam e/ou do fibromodulim impedem a formação de fibrilas de colágeno maduras, resultando em tendões mais fracos e com rigidez diminuída (YOON; HALPER, 2005). Além disso, a deficiência do biglicam resulta em fibrilas com diâmetros menores (AMEYE et al., 2002).

Os níveis elevados de biglicam têm sido detectados nas regiões de tração de tendão flexor profundo após a lesão e, isso pode ter um impacto negativo na fibrilogênese do colágeno e no processo de cicatrização, pois esta molécula está associada a processos de fibrose em outros tecidos (STOKES et al., 2001; BERGLUND et al., 2006).

Um estudo *in vitro* (KÄHÄRI; LARJAVA; UITTO, 1991) demonstrou que o biglicam se eleva na presença do TGF- β , tanto em fibroblastos de pele humana como de gengiva.

2.2.3 Fibromodulim

O fibromodulim é outro componente da família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina. Entretanto, ele não contém cadeias de condroitim ou dermatam sulfato, mas sim quatro cadeias de queratam sulfato (YOON; HALPER, 2005).

O fibromodulim tem sua expressão alta no tendão, com função de modulador da fibrilogênese do colágeno. Também se liga aos colágenos tipo I e II, mas em locais diferentes do decorim (YOON; HALPER, 2005). O fibromodulim pode ser requerido no início da fibrilogênese do colágeno para estabilizar o pequeno diâmetro das fibrilas intermediárias (FRANCHI et al., 2007).

Ratos deficientes em fibromodulim evidenciaram uma redução na rigidez do tendão, demonstrando que o fibromodulim contribui muito para a força do tendão

² DUNKMAN, A. A.; BUCKLEY, M. R.; MIENALTOWSKI, M. J.; ADAMS, S. M.; THOMAS, S. J.; SATCHELL, L.; KUMAR, A.; PATHMANATHAN, L.; BEASON, D. B.; IOZZO, R. V.; BIRK, D. E.; SOSLOWSKY, L. J. The tendon injury response is influenced by decorin and biglycan. **Annals of Biomedical Engineering**. (Aceito para publicação em 2013). Pré-print.

(YOON; HALPER, 2005). Além disso, a deficiência do fibromodulim resulta em fibrilas com comprimentos menores (AMEYE et al., 2002).

2.2.4 Agrecam

O agrecam faz parte da família dos hialectanos. Uma característica comum destes proteoglicanos é a sua estrutura com triplo domínio: um domínio N-terminal que se liga ao ácido hialurônico, um domínio central que transporta as cadeias laterais de glicosaminoglicanos e um domínio C-terminal que se liga a lectinas (IOZZO, 1998).

A principal função dos hialectanos seria ligar carboidratos complexos e ácido hialurônico a sua extremidade N-terminal e açúcares menos complexos a sua extremidade C-terminal. As propriedades funcionais do agrecam estão presentes em suas características estruturais: concentração elevada de cadeias laterais de condroitim sulfato e a formação de grandes agregados supramoleculares com ácido hialurônico (IOZZO, 1998).

O agrecam possui numerosas cadeias de condroitim sulfato e queratam sulfato ligadas ao seu esqueleto protéico. A carga negativa das cadeias de glicosaminoglicanos conduz ao aumento da pressão osmótica, levando a hidratação do tecido. Por sua vez, isto exerce uma pressão por dilatação na rede de colágeno. É a retenção de agrecam na forma comprimida no interior da rede de colágeno não expansível que faz a pressão por dilatação, tornando o tendão um tecido ideal para resistir à carga de compressão com o mínimo de deformação, assim suportando a sua função como uma superfície dura e resiliente de suporte de carga. O agrecam contribui significativamente para a viscoelasticidade e atua como um lubrificante, permitindo que as fibras deslizem mais facilmente umas sobre as outras (YOON; HALPER, 2005).

2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, discóides, derivados dos megacariócitos, com aproximadamente 5 a 7 μm de diâmetro (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). São conhecidas principalmente por seu papel na homeostase. As plaquetas contêm uma série de proteínas, citocinas e outros fatores bioativos que iniciam e regulam aspectos básicos da cicatrização de feridas (FOSTER et al., 2009).

Grânulos α de plaquetas ativadas liberam diferentes fatores de crescimento: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), TGF- β , fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), EGF, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) (DE MOS et al., 2008).

Os fatores de crescimento são peptídeos que promovem a proliferação celular, diferenciação, quimiotaxia e migração de vários tipos de células. Como consequência dessa estimulação em nível celular, ocorre o aumento da síntese de componentes da MEC. Eles se ligam aos receptores da membrana celular e, em seguida ativam as proteínas mensageiras no citoplasma por uma reação em cascata. Estas proteínas chegam ao núcleo e ativam os genes responsáveis pelo controle da divisão celular. Por conseguinte, a transcrição do RNA-m é induzida, resultando em uma resposta biológica que inicia as cascatas bioquímicas que induzem a regeneração e reparação do tecido (PRADES, 2009).

Existe uma correlação positiva entre concentração de plaquetas e concentração de fatores de crescimento (SCHNABEL et al., 2008). Além disso, as concentrações de fatores de crescimento são positivamente correlacionadas com a expressão de genes responsáveis pela síntese da MEC (PRADES, 2009). No entanto, ainda não está claro quais são os fatores de crescimento mais fundamentais nos tendões de equinos e como eles agem para causar a síntese e reparação da MEC do tendão (SMITH, 2011).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um volume de plasma autólogo que tem uma concentração de plaquetas acima da contagem do sangue total (MARX, 2001). Existem diferentes métodos e tecnologias para a produção de PRP que podem variar em relação ao volume de sangue, uso de um anticoagulante, número de rotações, velocidade de centrifugação, volume do plasma, glóbulos brancos,

glóbulos vermelhos do sangue e fatores de crescimento. As variações de metodologia resultam no PRP com diferentes concentrações de plaquetas, podendo esse concentrado possuir um número entre 2,5 e 10 vezes maior de plaquetas do que sangue basal (PRADES, 2009; MCCARREL; MINAS; FORTIER, 2012).

A concentração ideal de plaquetas ou de fatores de crescimento necessários para o tratamento de lesões nos tecidos dos cavalos é desconhecida, mas sabe-se que em tecidos saudáveis a resposta aos fatores de crescimento é maximizada quando a concentração de plaquetas é 4 vezes maior do que do plasma normal (PRADES, 2009). Por outro lado, um PRP altamente concentrado pode ser prejudicial para a reparação. Este fato foi demonstrado no trabalho de Arpornmaeklong et al. (2004), onde o número de plaquetas do PRP atingiu a concentração 8,96 vezes maior que o número de plaquetas do sangue total. Neste estudo a alta concentração de plaquetas inibiu a diferenciação celular.

Uma vez que os receptores estão ocupados por fatores de crescimento eles são internalizados pela célula, de modo que o sinal desse estímulo não atua de forma perpétua, o que poderia levar a uma proliferação e crescimento celular descontrolados. Assim, uma vez que os receptores celulares estão saturados, adicionar mais fatores de crescimento não parece ser necessário (PRADES, 2009).

Algumas propriedades reconhecidas do PRP são: caracteriza-se por um composto rico em fatores de crescimento; proporciona um aumento da vascularização dos tecidos por meio da estimulação da angiogênese; estimula a quimiotaxia, a diferenciação e a proliferação de várias linhagens de células, bem como a síntese de MEC e ácido hialurônico, além de acelerar a regeneração dos tecidos moles (PRADES, 2009).

A justificativa para se utilizar o PRP em tecido moles seria de que os fatores de crescimento, presentes no PRP, possuem efeitos anabólicos sobre os tenócitos e a síntese de MEC; esses fatores de crescimento também inibem ou neutralizam os efeitos das citocinas catabólicas; além disso, o PRP reduz a dor e estimula a síntese de ácido hialurônico pelos fibroblastos sinoviais (PRADES, 2009). Finalmente, o PRP também pode diminuir o tempo de recuperação do tecido lesado (TAYLOR et al., 2012).

A medicina equina concentra a sua principal utilização em problemas ortopédicos, como o tratamento de lesões dos tecidos moles e articulações (PRADES, 2009). Entretanto, poucos são os estudos *in vitro* que avaliam os efeitos

do plasma rico em plaquetas sobre explantes de tendão e ligamento equino. Além disso, as pesquisas conduzidas *in vivo* em cavalos são muito raras e foram concluídas com um pequeno número de casos clínicos, mas relatam as possibilidades terapêuticas do PRP (ARGÜELLES et al., 2008; WASELAU et al., 2008; PRADES, 2009; BOSH et al., 2010; ZUFFOVA; KRISOVA; ZERT, 2013).

2.4 LASER

A palavra LASER é o acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. A luz laser possui duas características essenciais que a difere da luz “normal”: comprimento de onda muito estreito e um alto nível de coerência. Outras duas características típicas do laser são: feixe paralelos e alta intensidade (TUNÉR; HODE, 2010).

Entre os lasers terapêuticos, os mais comuns são: laser de hélio-neon (HeNe), laser de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) e laser de arseneto de gálio (GaAs). Sendo este último o mais utilizado no tratamento de feridas e lesões musculoesqueléticas de cavalos (TUNÉR; HODE, 2010).

O laser GaAs é do tipo semiconductor, que emite um feixe infravermelho (invisível) com comprimento de onda de 904nm. Sempre funciona no modo pulsado e em pulsos muito curtos. A profundidade de penetração é de 30 a 50mm, dependendo do tipo de tecido (TUNÉR; HODE, 2010).

O laser GaAs é considerado a melhor escolha para os tratamentos de lesões mais profundas, assim como as lesões de esporte (TUNÉR; HODE, 2010). Do mesmo modo, o GaAs demonstrou estimular a produção de colágeno em culturas de fibroblastos de pele humana, sugerindo que esse tipo de laser pode ser usado para melhorar os processos de cicatrização de feridas (ABERGEL et al., 1984).

A densidade de potência do laser é o mesmo da “intensidade” da luz, mensurada em watts ou miliwatts/cm². A densidade de energia também é o mesmo de dose, sendo mensurada em joules/cm². A diferença entre densidade de potência e densidade de energia é simplesmente o tempo, sendo a dose o parâmetro mais importante do tratamento. A dose é a quantidade de energia administrada em uma área do tecido, lembrando que doses muito baixas podem resultar em nenhum efeito

ou apenas num efeito fraco. Da mesma forma, se uma dose acima da recomendada é administrada, não resultará em efeitos biológicos ou eles serão fracos (TUNÉR; HODE, 2010).

Faltam pesquisas sobre os lasers terapêuticos de alta potência, além disso, poucos dados foram publicados sobre esses lasers potentes. Especula-se que os lasers terapêuticos de alta potência efetivamente podem enviar energia suficiente em camadas mais profundas de tecido devido a alta densidade de energia do feixe. As densidades de alta potência são mais eficientes para as condições dolorosas, enquanto que densidades de potência menores são melhores para a cicatrização de feridas (TUNÉR; HODE, 2010).

A repetição do tratamento pode ser necessária para alcançar os efeitos positivos do laser nas aplicações clínicas (KREISLER et al., 2002). Entretanto, o tratamento com o laser terapêutico tem demonstrado ser acumulativo, isto que dizer que a dose de um tratamento pode perdurar até o próximo tratamento. Por isso é fundamental que os tratamentos não sejam muito próximos, para evitar que a dose acumulada eventualmente acabe logo acima do âmbito de bioestimulação ou até no âmbito de bioinibição, tendo como consequência resultados insignificantes (TUNÉR; HODE, 2010). O tratamento por dias consecutivos demonstrou uma diminuição à viabilidade celular, indicando que várias exposições tem o efeito inibitório por causar estresse e danos nas células que estão em processo de cicatrização (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006). Sendo assim, tem sido demonstrado que é mais benéfico fazer o tratamento em intervalos menores no início. Por exemplo, em dias alternados ou a cada três dias, por duas semanas. Depois desse período, deve-se realizar o tratamento com intervalos mais longos, como uma vez por semana (TUNÉR; HODE, 2010).

O tratamento com o laser terapêutico não é baseado no calor produzido, mas sim nos efeitos fotoquímicos e fotobiológicos nas células e no tecido (TUNÉR; HODE, 2010). Os fótons penetram no tecido e são absorvidos na mitocôndria e na membrana celular. Assim, a energia do fóton é convertida em energia química dentro da célula, na forma de ATP (PASSARELLA et al., 1984; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006). Foi observado que quando a luz laser é administrada na dose correta, algumas funções da própria célula são estimuladas (TUNÉR; HODE, 2010). A radiação direta tem as seguintes funções: analgesia, dilatação dos vasos

sanguíneos, anti-inflamatória, além de melhorar e estimular o reparo do tecidual (XU et al., 1991).

O mecanismo de ação do laser no reparo e função do tendão tem como objetivos: efeito anti-inflamatório, diminuição do tumor, absorção progressiva do hematoma e promoção da cicatrização intrínseca, reduzindo a formação de aderências. Ele age efetivamente na fase aguda e crônica (XU et al., 1991).

Em uma das poucas pesquisas realizadas com o laser de 904 nm, as avaliações durante a fase aguda da inflamação demonstraram resultados amplamente positivos. Utilizando a densidade de energia de 3 J/cm^2 , o tratamento com laser confirmou ser efetivo em reduzir a resposta inflamatória, proporcionando a diminuição da migração de neutrófilos para o local da lesão (CORREA et al., 2007). Do mesmo modo, em um estudo clínico em humanos, Bjordal, Lopes-Martins e Iversen (2006) demonstraram que o laser de baixa potência pode suprimir a inflamação, reduzindo a concentração de PGE_2 . Marcos et al. (2014) demonstraram que o tratamento do laser em tendões pode controlar a inflamação, pois reduz a quantidade de metaloproteinases. Outras pesquisas demonstram que doses de energia mais elevadas possuem o efeito de suprimir a inflamação. Este efeito ainda foi relatado ser dose-dependente, com uma faixa ideal entre 1,9 e $6,3 \text{ J/cm}^2$ e densidade de potência de $21,2 \text{ mW/cm}^2$ (BJORDAL COUPPE; LJUNGGREN, 2001).

Vários trabalhos também citam o efeito do laser na proliferação de fibroblastos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; CHEN et al., 2008; MERLI et al., 2012), afirmando que doses muito baixas não demonstram efeitos significantes, enquanto doses muito altas apresentam um efeito inibitório (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006). Sugere-se que a dose ideal para se obter uma resposta dos fibroblastos *in vitro* é de 2 J/cm^2 (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; CHEN et al., 2008). Além disso, doses acima de 10 J/cm^2 produzem uma diminuição na proliferação celular dos fibroblastos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Para a densidade de potência, resultados de estudos *in vitro* de culturas de células de fibroblastos sugeriram que a quantidade ideal para se aumentar a produção de colágeno seria de 4,5 e $7,5 \text{ mW/cm}^2$ para os lasers contínuos de 632 nm de HeNe e de 820 nm de GaAlAs, respectivamente (BJORDAL COUPPE; LJUNGGREN, 2001).

Além dos fibroblastos a irradiação com laser pode aumentar a expressão do colágeno tipo I e do decorim (CHEN et al., 2008). Esse efeito bioestimulante do laser pode promover a síntese das fibras de colágeno dentro de uma janela terapêutica

curta de 0,4 a 4 J/cm² (STERGIOULAS et al., 2008). Isso foi confirmado por outro estudo *in vitro* que também afirmou que o laser GaAs de 904nm pulsado só precisa de 0,4 J/cm² para aumentar o metabolismo dos fibroblastos (GREEN et al., 1998).

A pesquisa de Enwemwka et al. (1994) garante que a irradiação do laser GaAs é efetivo no aumento da força de tensão do tendão, no estresse de tensão, na capacidade de absorção de energia e na modulação da elasticidade em tendões calcâneos regenerados de coelhos. Marcos et al. (2014) relataram que o efeito do laser promove uma melhor recuperação no desempenho mecânico do tendão, aumentando sua rigidez. Outros autores afirmam que a dose de 1 a 5 J/cm² aumenta a força de tensão dos tendões tenotomizados, acelerando a síntese de colágeno e facilitando a formação de fibrilas de colágeno dos fibroblastos e miofibroblastos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Além disso, os resultados experimentais de Xu et al. (1991) demonstraram que o laser de hélio-neon com baixa densidade de potência pode reduzir aderências nos tendões e promover a recuperação da função.

Por fim, o laser terapêutico também pode interferir na produção e no alinhamento das fibras de colágenos (CARRINHO et al., 2006; CHEN et al., 2009; NEVES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

2.5 BIRREFRINGÊNCIA

As fibrilas de colágeno são longas e cristalinas. Em tendões, as fibrilas e fibras são altamente alinhadas, o que confere alta resistência mecânica para forças de tensão. As propriedades biológicas e mecanofísicas de fibras de colágeno são, em grande parte, determinadas pela estrutura de agregação molecular e dos seus componentes. A variação do estado de organização dos feixes de colágeno tem sido detectada e medida durante o processo de reparação por meio de suas propriedades anisotrópicas (VIDAL, 2003).

A birrefringência é a anisotropia que está relacionada à diferença de índices de refração do objeto, que corresponde à propagação da luz com velocidades e direções diferentes no corpo birrefringente. Um corpo birrefringente possui duas

direções de propagação com um índice de refração para cada uma delas (VIDAL, 1987).

Embora relativamente simples, a microscopia de polarização traz informações valiosas sobre a ultra-estrutura e a organização molecular de células e tecidos. Este tipo de microscopia óptica permite tanto a pesquisa como a determinação das anisotropias ópticas em preparados biológicos (VIDAL, 1987). A birrefringência é a melhor maneira para estudar a ordem molecular e o grau de agregação nos feixes de colágeno (VIDAL, 2003).

A análise de birrefringência quantifica esse alinhamento das fibras de colágeno devido a suas propriedades anisotrópicas, por meio da qual se mede o retardo óptico em nanômetro. Portanto, quanto maior for essa medida, maior o grau de organização e compactação das fibras (VIDAL, 2003).

Muitos estudos têm utilizado a microscopia de luz polarizada para analisar qualitativa e quantitativamente a organização, estado de agregação e ordem molecular das fibras de colágeno por meio das medidas do retardo óptico (OR, em nm) devido à birrefringência (CARRINHO et al., 2006; ARRUDA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; REIS, 2009; NEVES et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência do plasma rico em plaquetas no processo de cicatrização do tendão flexor digital superficial de equinos, assim como quando associado ao LASER terapêutico.

3.1.1 Objetivos específicos

- ⇒ Avaliar pelos exames físico e ultrassonográfico a resposta tecidual frente ao tratamento com plasma rico em plaquetas após tendinite induzida.
- ⇒ Avaliar pelos exames físico e ultrassonográfico a resposta tecidual frente ao tratamento com plasma rico em plaquetas associado ao laser terapêutico após da tendinite induzida.
- ⇒ Caracterizar e padronizar a distribuição dos proteoglicanos agrecom, decorim, biglicam e fibromodulim em tendões normais de equinos.
- ⇒ Caracterizar e padronizar a distribuição na fase inicial da cicatrização dos proteoglicanos agrecom, decorim, biglicam e fibromodulim após tratamento com plasma rico em plaquetas.
- ⇒ Caracterizar e padronizar a distribuição na fase inicial da cicatrização dos proteoglicanos agrecom, decorim, biglicam e fibromodulim após tratamento com plasma rico em plaquetas associado ao laser terapêutico.

- ⇒ Analisar o estado de agregação e orientação das fibras de colágeno pela sua propriedade anisotrópica após tratamento da tendinite com plasma rico em plaquetas.
- ⇒ Analisar o estado de agregação e orientação das fibras de colágeno pela sua propriedade anisotrópica após tratamento da tendinite com plasma rico em plaquetas associado ao laser terapêutico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) no período de fevereiro de 2011 a dezembro de 2013.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP (protocolo nº 2284/2011), seguindo os princípios éticos nacionais e internacionais, para cuidados e experimentação em animais.

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram selecionados 22 equinos (quatro cadáveres frescos e 18 animais vivos), sem raça definida (SRD), com idade entre dois e 18 anos. Sendo que 16 eram fêmeas e seis eram machos. Os animais foram mantidos em piquete (na cidade de São Roque, Instituto de Fomento Veterinário), ou em baias com exercícios controlados (Hospital Veterinário – FMVZ – USP). Todos receberam água à vontade e alimentação balanceada, composta por feno de *coast-cross* e ração comercial.

Os 22 animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos distintos (Quadro 1):

O primeiro grupo (G1) foi composto por quatro animais, denominado grupo sadio e formado por oito membros torácicos sadios provindos de cadáveres frescos. Este grupo não foi submetido à indução da tendinite, exposto ao LASER terapêutico ou infiltrado com PRP, porém foi avaliado por imunoistoquímica e birrefringência do colágeno.

O segundo grupo (G2) foi constituído por seis animais vivos, denominado grupo controle e formado por seis membros torácicos os quais foram submetidos à indução da tendinite, porém o local da lesão não recebeu qualquer tipo de tratamento. Esse grupo também foi avaliado por imunoistoquímica e birrefringência do colágeno.

O terceiro grupo (G3) foi constituído por seis animais vivos e formado por seis membros torácicos, os quais foram submetidos à indução da tendinite, ao tratamento por PRP e, avaliação por imunoistoquímica e birrefringência do colágeno.

O quarto grupo (G4) foi constituído por seis animais vivos e formado por seis membros torácicos, os quais foram submetidos à indução da tendinite, ao tratamento por PRP e LASER terapêutico, além de avaliação por imunoistoquímica e birrefringência do colágeno.

Como critério de inclusão dos animais no experimento foi considerado a inexistência de histórico de lesões no TFDS. Além disso, nos animais vivos foi realizada essa confirmação após avaliação física e ultrassonográfica do tendão em toda sua extensão.

Quadro 1 – Descrição dos animais segundo grupo, raça, sexo, idade (anos), peso (kg) e membro que recebeu tratamento – São Paulo – 2011 a 2013

ANIMAL	GRUPO	RAÇA	SEXO	IDADE	PESO	GRUPO	MEMBRO
1	1	SRD	M	2	...	Sadio	D/E
2	1	BH	F	8	400	Sadio	D/E
3	1	SRD	M	9	400	Sadio	D/E
4	1	PSI	F	12	...	Sadio	D/E
5	2	SRD	F	14	413	Controle	E
6	2	SRD	F	9	345	Controle	D
7	2	SRD	F	...	360	Controle	E
8	2	SRD	F	18	380	Controle	D
9	2	SRD	F	16	405	Controle	E
10	2	SRD	F	9	360	Controle	D
11	3	SRD	F	15	330	PRP	D
12	3	SRD	F	5	390	PRP	E
13	3	SRD	F	16	310	PRP	E
14	3	SRD	F	6	360	PRP	E
15	3	SRD	F	9	360	PRP	D
16	3	SRD	F	...	...	PRP	D
17	4	SRD	F	8	400	PRP + LASER	D
18	4	SRD	M	8	365	PRP + LASER	E
19	4	SRD	F	8	360	PRP + LASER	D
20	4	SRD	M	8	360	PRP + LASER	E
21	4	SRD	M	8	400	PRP + LASER	D
24	4	SRD	M	8	380	PRP + LASER	E

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: SRD = sem raça definida; BH = brasileiro de hipismo; PSI = puro sangue inglês; M = macho; F = fêmea; PRP = plasma rico em plaquetas; D = direito; E = esquerdo.

4.3 ANALGESIA DOS ANIMAIS

Para os procedimentos invasivos como infiltração de collagenase, de PRP e realização da biópsia, a sedação dos animais foi realizada com detomidina a 1% (0,01 mg/kg) por via intravenosa (i.v.), ou quando necessário foi utilizado o butorfanol (0,05 mg/kg) por via i.v., seguida de anestesia local por infiltração perineural com 3 ml de mepivacaína a 3% sem vasoconstritor. Além disso, no dia da biópsia do tendão foi iniciado o tratamento anti-inflamatório não-esteróide para promover ação analgésica e redutora de edema. O princípio ativo foi fenilbutazona na dose de 4,4 mg/kg a cada 24 horas por três dias consecutivos.

4.3.1 Anestesia local por infiltração perineural

A anestesia local por infiltração perineural precedeu os seguintes procedimentos: infiltração com collagenase, infiltração com PRP e a biópsia do TFDS. Após a limpeza e desinfecção local com clorexidina degermante a 2% e alcoólica a 0,5%, uma agulha hipodérmica de 0,45mm x 13 mm foi introduzida na base do osso acessório cárpico e direcionada levemente para a região látero-dorsal (Figuras 1A e 1B). Neste local foi injetado 3 ml de mepivacaina a 3% sem vasoconstritor com o objetivo de dessensibilizar o nervo palmar lateral.

Figura 1 – Procedimento de anestesia local por infiltração perineural – São Paulo – 2013

Fonte: (BASSAGE; ROSS, 2011).

Legenda: (A) Imagem ilustrativa demonstrando o local onde a agulha hipodérmica foi inserida no nervo palmar lateral, na região distal ao osso acessório cárpico.

Fonte: (SCHULTZ, 2013).

Legenda: (B) Imagem do procedimento em um dos animais do experimento

4.4 INFILTRAÇÃO POR COLAGENASE

O primeiro dia do experimento foi denominado como **T0** (dia 0 anterior ao tratamento). Neste dia a lesão foi induzida com a administração intratendínea de collagenase tipo I no tendão flexor digital superficial dos membros torácicos direito ou esquerdo dos animais do G2, G3 e G4.

A técnica iniciou com a tricotomia da região metacarpiana palmar, lateral e medial do membro com lâmina nº 50. A preparação cirúrgica desse local foi realizada com clorexidina degermante a 2% e alcoólica a 0,5%.

Posteriormente os animais foram sedados com detomidina 1% i.v., seguida de anestesia local por infiltração perineural com 3ml de mepivacaina a 3% sem vasoconstritor.

A indução da lesão foi realizada segundo procedimento descrito por Barreira (2005). O exame ultrassonográfico com transdutor linear de 7,5 a 10 MHz foi utilizado para certificar posicionamento correto de entrada da agulha no tecido alvo. O transdutor foi coberto por uma luva estéril de tamanho 8,5 contendo 10 ml de gel no seu interior, para garantir a esterilidade do procedimento sem perder a qualidade da imagem. Neste procedimento, o transdutor foi posicionado na região metacarpiana palmar para obtenção da imagem transversal da estrutura.

Com o membro apoiado no chão, após identificação do TFDS na imagem ultrassonográfica, seguiu-se a infiltração de 1 ml da solução de collagenase (2,5 mg/ml) no centro do terço médio do tendão. A introdução da agulha hipodérmica de 0,8 mm x 30 mm, descartável, posicionada lateralmente e perpendicular ao tendão, foi acompanhada na tela do aparelho até o final do procedimento (Figura 2).

Figura 2 – Imagem ultrassonográfica do momento da infiltração com collagenase – São Paulo – 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2013).

Legenda: TFDS = tendão flexor digital superficial; seta branca = agulha hipodérmica no centro do TFDS.

4.5 PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PRP

Foram colhidos 27 ml de sangue de cada animal por meio da punção da veia jugular externa, sendo distribuídos em seis tubos de vidro com anticoagulante citrato de sódio a 3,8% e capacidade para 4,5 ml cada.

Essas amostras de sangue foram homogeneizadas e um dos tubos reservado para realizar a contagem manual de plaquetas. Os tubos restantes foram primeiramente centrifugados durante 10 minutos a 120G à temperatura de 20°C. Logo em seguida, na câmara de fluxo laminar, o plasma de todos os tubos foi transferido para um único tubo falcon de 15 ml sem anticoagulante. Dando continuidade ao procedimento, a segunda centrifugação foi realizada por 10 minutos a 400G e temperatura de 20°C. Ao término da segunda centrifugação, aproximadamente 80% do volume do plasma foi descartado e, a fração remanescente foi denominada PRP.

Antes da infiltração, o PRP foi deixado em repouso em temperatura de 20°C por uma hora, para se evitar a agregação plaquetária. Em seguida, passou por mais uma hora por um processo de homogeneização suave e constante realizada por um homogeneizador para tubos, permanecendo até o momento exato da aplicação. Deste tubo contendo o PRP foi extraída uma alíquota de 0,5 ml para contagem manual do número de plaquetas. A concentração de plaquetas foi obtida a partir da razão entre o número de plaquetas do PRP/número de plaquetas do sangue total. Um mililitro foi a quantidade de PRP definida como terapêutica.

4.5.1 Infiltração do PRP

O dia do experimento para infiltração do PRP foi denominado como **T21** (21 dias ou três semanas, após a indução da tendinite com collagenase). Neste dia foi realizado o tratamento da lesão com a administração intratendínea do PRP no TFDS nos membros torácicos direito ou esquerdo dos animais do G3 e G4.

Novamente, a tricotomia da região metacarpiana palmar, lateral e medial do membro foi realizada com lâmina nº 50. A preparação cirúrgica desse local também foi realizada com clorexidina degermante a 2% e alcoólica a 0,5%.

Os animais, do mesmo modo, foram sedados com detomidina 1% i.v., seguida de anestesia local por infiltração perineural com 3 ml de mepivacaína a 3% sem vasoconstritor.

O exame ultrassonográfico foi utilizado para certificar posicionamento correto de entrada da agulha no local exato da lesão. O transdutor foi coberto por uma luva estéril de tamanho 8,5 contendo 10 ml de gel no interior, para garantir a esterilidade do procedimento sem perder a qualidade da imagem. Nesse procedimento, o transdutor foi posicionado na região metacarpiana palmar para obtenção da imagem transversal da estrutura.

Outra vez com o membro apoiado no chão, após identificação da lesão no TFDS na imagem ultrassonográfica, seguiu-se a infiltração de 1ml de PRP com a

introdução da agulha hipodérmica de 0,8 mm x 30 mm, descartável, posicionada lateralmente e perpendicular ao tendão (Figura 3). A imagem da agulha foi vista e seguida na tela do aparelho até o final do procedimento (Figura 4). Ao final, o local de introdução da agulha foi coberto por uma bandagem elástica adesiva (Tensoplast®) por quatro dias.

Figura 3 – Imagem do momento da administração intratendínea do plasma rico em plaquetas guiada por ultrassom – São Paulo – 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2013).

Figura 4 – Imagem ultrassonográfica do momento da infiltração do plasma rico em plaquetas – São Paulo – 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2013).

Legenda: TFDS = tendão flexor digital superficial; seta branca = agulha hipodérmica no local da lesão do TFDS.

4.6 PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM LASER TERAPÊUTICO

O dia do experimento para início do tratamento com o LASER terapêutico de baixa intensidade foi denominado como **T14** (14 dias ou duas semanas após a indução da tendinite com collagenase). Nesse dia o tratamento teve início nos membros torácicos dos animais do G4, seguindo a descrição do protocolo:

LASER terapêutico, comprimento de onda de 904 nm (diodo semiconductor Ga-As), 500 mW de potência, na frequência de 584 PPS (pulsos por segundo), dose total do tratamento de 6 J (três regiões de aplicação, sendo que cada região recebeu 2 J) e área do feixe de 1,04 cm².

O aparelho foi posicionado perpendicularmente em contato com a pele sobre o exato local da lesão, em três pontos diferentes: um palmar, outro lateral e o restante medial. Este mesmo protocolo foi repetido a cada 48 horas durante duas

semanas (T14 ao T28) e, a partir de então, foi realizado semanalmente até o momento da biópsia (T28 ao T56).

4.7 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO CONTROLADO

Somente os animais do G4 foram submetidos ao programa de exercício controlado. O regime de criação dos animais do G2 e G3 era com os animais soltos em piquetes, por outro lado, os animais do G4 ficaram confinados em baias durante todo o experimento. Por esse motivo, os animais do G4 foram conduzidos ao exercício controlado, do T14 ao T56. O protocolo seguido por esses animais foi o seguinte: conduzidos na guia, uma vez ao dia, para caminhar 10 minutos ao passo.

4.8 AVALIAÇÃO FÍSICA

O exame físico dos animais do G2, G3 e G4 foi realizado semanalmente, tendo início no momento anterior a indução da lesão por collagenase até o momento anterior a realização da biópsia.

Com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória no membro lesado, a avaliação física constou de: inspeção, palpação e avaliação da dinâmica do animal. Com a inspeção junto com a palpação foi possível determinar o aumento de volume da área acometida, presença de edema na área lesada, presença de calor e a sensibilidade do animal à palpação do local da lesão. Por último, foi avaliada a dinâmica do animal, somente ao trote, em linha reta e sobre o chão duro, observando-se a presença ou não de claudicação.

4.8.1 Critérios de avaliação física

Para fins de análise, foi atribuído à avaliação física um sistema de escala numérica para o aumento de volume local, sensibilidade à palpação e presença de

calor (Quadro 2). Ainda para avaliar o aumento de volume no local da lesão, com ajuda de uma fita métrica foi mensurado o perímetro da circunferência da região metacarpiana correspondente ao local da lesão no TFDS. Para a avaliação da dinâmica do animal foi observado apenas presença ou não de claudicação (Quadro 3).

Quadro 2 – Descrição da escala em escore para o aumento de volume local, sensibilidade à palpação e presença de calor – São Paulo – 2011 a 2013

ESCORE	DESCRIÇÃO
0	normal
1	leve
2	moderada
3	grave

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Quadro 3 – Descrição da avaliação da dinâmica do animal quanto à presença ou não de claudicação – São Paulo – 2011 a 2013

ESCORE	DESCRIÇÃO
0	sem claudicação
1	com claudicação

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

4.9 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Os exames foram realizados com o equipamento de ultrassom diagnóstico ESAOTE MyLab 30 VET com transdutor eletrônico linear multifrequencial de 7,5 a 10 MHz. No aparelho de ultrassom, a imagem foi configurada para 5 cm de profundidade, com o foco entre 3 a 4cm e ganho geral de 67%. Todos os exames ultrassonográficos foram realizados com o auxílio de um *standoff*, um anteparo de

silicone que se acopla ao transdutor do ultrassom para diminuir as interferências entre a pele e o transdutor, permitindo uma melhor qualidade da imagem.

O exame ultrassonográfico dos animais do G2, G3 e G4 foi realizado semanalmente, tendo início no momento anterior a indução da lesão por collagenase até o momento anterior a realização da biópsia.

Anterior à avaliação ultrassonográfica precedeu-se a tricotomia da região metacarpiana palmar, lateral e medial dos membros torácicos com lâmina nº 50. Durante o exame os animais permaneceram em posição quadrupedal, em tronco de contenção próprio para equinos.

4.9.1 Critérios de avaliação ultrassonográfica

As avaliações dos tendões dos animais estudados e suas lesões tendíneas foram realizadas por toda sua extensão, tanto no plano transversal como no longitudinal. As características subjetivas adotadas no acompanhamento do tendão e da evolução da área lesada foram: ecogenicidade do tendão e da lesão no plano transversal, área em cm^2 do tendão e da lesão, porcentagem de área lesada com relação à área do tendão e alinhamento das fibras tendíneas no plano longitudinal.

Para fins de análise, foi atribuído para ecogenicidade do tendão e da lesão um sistema de escala numérica (Quadro 4). Também foram mensurados área em cm^2 do tendão e da lesão, além de porcentagem de área lesada com relação à área do tendão, sendo todos no plano transversal com o objetivo de avaliar a evolução da tendinite. Apenas para o alinhamento das fibras tendíneas no plano longitudinal foi determinado o grau de perda do alinhamento das fibras (Quadro 5):

Quadro 4 – Escore correspondente a ecogenicidade do tendão e da lesão na avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2011 a 2013

ESCORE	DESCRIÇÃO DA ECOGENICIDADE
0	isoecogênico
1	$\geq 75\%$ do tecido com ecogenicidade
2	50% ecogênico, 50% anecogênico
3	$\leq 25\%$ ecogênico

Fonte: (RANTANEN; JORGENSEN; GENOVESE, 2011 adaptado por SCHULTZ, 2011).

Quadro 5 – Escore correspondente ao alinhamento das fibras de colágeno do tendão, no local da lesão, na avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2011 a 2013

ESCORE	DESCRIÇÃO DO ALINHAMENTO
0	$\geq 75\%$ de paralelismo
1	50-75% de paralelismo
2	25-50% de paralelismo
3	$\leq$ de 25% de paralelismo

Fonte: (RANTANEN; JORGENSEN; GENOVESE, 2011).

4.10 BIÓPSIA

A colheita do fragmento tendíneo foi realizada após oito semanas da infiltração com collagenase, denominado **T56** (56 dias ou oito semanas após a indução da tendinite com collagenase). Este procedimento foi realizado no TFDS dos grupos G2, G3 e G4, , nos membros torácicos direito ou esquerdo dos animais do G3 e G4.

Repetiu-se a tricotomia da região metacarpiana palmar, lateral e medial do membro. A preparação cirúrgica deste local também foi realizada com clorexidina degermante a 2% e alcoólica a 0,5%.

Os animais, novamente foram sedados com detomidina 1% i.v., seguida de anestesia local por infiltração perineural com 3ml mepivacaina a 3% sem vasoconstritor.

O exame ultrassonográfico foi utilizado para certificar o posicionamento correto de entrada da agulha no local exato da colheita. O transdutor foi coberto por uma luva estéril de tamanho 8,5 contendo 10 ml de gel no seu interior, para garantir a esterilidade do procedimento sem perder a qualidade da imagem.

O membro foi posicionado em flexão de 90° e o transdutor colocado em posição longitudinal em relação ao eixo longitudinal das fibras do TDFS. Em seguida, a 0,5 cm distal ao transdutor foi realizada uma incisão na pele de aproximadamente 1cm com o auxílio de uma lâmina de bisturi n° 11.

No local da incisão, uma agulha de biópsia (14 gauge x 16 cm de comprimento) foi introduzida e, com o auxílio do instrumento automático de biópsia as amostras tendíneas foram colhidas. Para esta finalidade posicionou-se o TFDS do animal entre o polegar e o dedo indicador, seguida pelo disparo do instrumento automático de biópsia angulado à 20° no sentido longitudinal em relação as fibras do tendão (Figuras 5 e 6). Também foram colhidas biópsias de tendões sadios das regiões equivalentes do G1. Esse procedimento foi realizado objetivando a colheita de amostras para avaliação imunoistoquímica e análise da birrefringência intrínseca do colágeno.

Ao término desse procedimento o local de introdução da agulha foi coberto por uma bandagem elástica adesiva (Tensoplast®) por quatro dias, exceto para os animais do G1. Também foi prescrito para os animais anti-inflamatório não-esteroidal. A substância ativa utilizada foi a fenilbutazona.

Figura 5 – Imagem do momento da introdução da agulha para a realização da biópsia – São Paulo – 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Figura 6 – Imagem ultrassonográfica do momento da realização da biópsia – São Paulo – 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: TFDS = tendão flexor digital superficial; seta branca = agulha de biópsia no local da lesão do TFDS.

4.11 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de tecido tendíneo foram fixadas em solução tamponada de formol a 4% por 48 horas para avaliação imunoistoquímica e análise da birrefringência intrínseca do colágeno.

Em temperatura ambiente, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol: um banho de imersão a 70% *overnight*; dois, de etanol a 95%, por 90 minutos; seguidos de cinco banhos com álcool absoluto por duas horas cada. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol em três séries de 90 minutos cada. Após a diafanização, as amostras foram imersas em dois banhos de parafina, sendo o primeiro com duração de duas horas e o segundo com duração de quatro horas e incluídas em Paraplast®. Foram realizados cortes de 5µm de espessura nas amostras colhidas e colocados sobre lâminas com adesivo.

4.11.1 Avaliação imunoistoquímica

As técnicas de imunoistoquímica foram utilizadas para investigar a distribuição dos glicosaminoglicanos: decorim, biglicam e fibromodulim e agregam. Os fragmentos foram processados no Laboratório de imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os fragmentos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 30 minutos cada e, um banho de xilol e etanol por mais 15 minutos. Em seguida foi realizada a reidratação em uma série decrescente de etanol: dois banhos em etanol absoluto por cinco minutos cada, etanol a 95% e etanol a 70% por cinco minutos cada. Posteriormente, as lâminas passaram por uma lavagem em água corrente.

Realizou-se a recuperação antigênica com o uso da condroitinase AC (gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Yara M. Michelacci do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo), na estufa a 37°C por uma hora. Após lavagem com água corrente por 10 minutos, seguida de lavagem em água destilada por mais cinco minutos, as lâminas foram

bloqueadas com solução de peróxido de hidrogênio a 6% em água destilada por 30 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz. Prosseguiu-se com a lavagem em água corrente por 10 minutos, por mais cinco minutos em água destilada e, finalmente por mais cinco minutos em tampão PBS.

Todos os anticorpos primários foram utilizados na diluição 1:100. Em seguida, foram distribuídos sobre as lâminas e essas foram incubadas *overnight* em câmara úmida na estufa a 37°C. Após a incubação as lâminas foram lavadas por três vezes consecutivas por cinco minutos cada em PBS. O anticorpo secundário utilizado foi o *SuperPicture*, assim as lâminas foram encubadas por 30 minutos na câmara úmida em estufa a 37°C. Após a lavagem por três vezes consecutivas por cinco minutos cada em PBS, o material foi encubado com cromógeno diaminobenzidina (DAB) por cinco minutos a 37°C. Novamente, prosseguiu-se com a lavagem em água corrente, por cinco minutos e, por mais cinco minutos em água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina por três minutos e, finalmente o material foi lavado em água corrente por cinco minutos.

4.11.1.1 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados sob microscópio óptico binocular sem que houvesse identificação do animal, membro ou grupo referente.

Para determinar a expressão dos anticorpos nas amostras coletadas todos os campos do fragmento foram analisados e, para cada lâmina foi observado a porcentagem de marcação de cada anticorpo e a intensidade dessa marcação. O escore final é referente à porcentagem de área marcada vezes a intensidade dessa marcação (Quadros 6 e 7).

Quadro 6 – Escore correspondente a porcentagem (%) de área marcada com o anticorpo primário no local da lesão na avaliação imunoistoquímica – São Paulo – 2014

ESCORE	% DE ÁREA MARCADA
0	0 – 5%
1	5 – 33%
2	33 – 66%
3	> 66%

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Quadro 7 – Escore correspondente a intensidade de marcação do anticorpo primário no local da lesão na avaliação imunoistoquímica – São Paulo – 2014

ESCORE	INTENSIDADE
0	negativo
1	fraco
2	moderado
3	intenso

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

4.11.2 Análise da birrefringência do colágeno

A análise da birrefringência foi utilizada para detectar ou mensurar a variação da organização dos feixes de colágeno durante o processo de reparação, por meio de sua propriedade óptica anisotrópica. Os fragmentos foram processados no laboratório de eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Cada lâmina ficou imersa em água destilada pelo tempo mínimo de 30 minutos, com a finalidade de reidratar os fragmentos contidos na sua superfície. Em seguida, foram analisadas sob microscopia de luz polarizada quanto a organização, estado de agregação e orientação molecular das fibras de colágeno no tendão pela medida da birrefringência.

Para realização das mensurações, o eixo longitudinal das fibras de colágeno foi orientado à 45° em relação à direção de propagação da luz polarizada. O retardo óptico foi medido utilizando o compensador de Senarmont $\lambda/4$. Foram realizadas oito

medidas de três fragmentos de tecido diferentes de cada animal. As medidas obtidas em graus foram transformadas para ηm multiplicando-as por 3,03.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das variáveis resultantes da avaliação física e ultrassonográfica foi conduzida de forma descritiva com o objetivo de caracterizar estas variáveis por meio de medidas de tendência central (média e mediana), de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) e inferencial, buscando comparar as distribuições dos grupos G2, G3 e G4. Na análise das variáveis foram utilizados quatro momentos diferentes (semana 0, semana 1, semana 4 e semana 8). Para tanto, o teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado, a 0,05 de significância, com o auxílio do software SPSS v. 15. Optou-se por utilizar uma prova não paramétrica dado o tamanho da amostra. Quando observada diferença estatística, uma análise *post hoc* foi conduzida por meio do pacote *pgirmess* do *software* livre R ($\alpha=0,05$).

Foram realizadas ainda análises pareadas a partir do teste de Friedman ($\alpha=0,05$) com o objetivo de avaliar se houve diferença entre as distribuições dos quatro períodos para cada um dos três grupos de estudo. Para os casos em que foi observada diferença significativa, análises *post hoc* foram realizadas com o auxílio do pacote *agricolae* do *software* livre R ($\alpha=0,05$).

Para a análise dos dados de imunoistoquímica, primeiramente foi realizado o cálculo de medidas de tendência central e de dispersão. O teste de *Kruskal-Wallis* foi conduzido a 0,05 de significância para comparar as distribuições dos grupos G1, G2, G3 e G4. Quando observada diferença estatística, uma análise *post hoc* foi conduzida por meio do pacote *pgirmess* do *software* livre R ($\alpha=0,05$).

E, para a análise de birrefringência do colágeno, primeiramente foi realizado o teste ANOVA para comparação entre os grupos. Em seguida, análise *post hoc* paramétrica com o teste de Tukey quando observada diferença estatística.

4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 7 – Esquema organizacional do delineamento experimental – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

5 RESULTADOS

5.1 ANALGESIA DOS ANIMAIS

A sedação dos animais com detomidina a 1% (0,01 mg/kg) por via intravenosa i.v. e associada ao butorfanol (0,05 mg/kg) quando necessário, e a anestesia local com 3 ml de mepivacaina a 3% sem vasoconstritor por infiltração perineural, mostraram-se eficazes, tanto para realização da infiltração com a solução de colagenase como para a infiltração com PRP e para realização da biópsia.

5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A infiltração com solução de colagenase nos membros torácicos resultou em alterações clínicas no local da lesão, sendo indicadoras de inflamação, como aumento de volume, aumento de sensibilidade e elevação de temperatura em todos os animais do experimento. Esses animais também apresentaram alterações de dinâmica, evidenciando a claudicação.

O aumento de volume na região lesada foi observado tanto na inspeção como na palpação. Essa alteração foi notada logo na primeira avaliação após a infiltração com colagenase (semana 1), permanecendo na maioria dos animais dos grupos G2, G3 e G4, independente do tratamento, até o final do experimento ($p < 0,05$) (Tabela 1 e Gráfico 1).

O aumento de volume dos membros do G2 e G3 apresentou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) na semana 4 (Gráfico 2).

Tabela 1 – Escore da avaliação do aumento de volume do TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	AUMENTO DE VOLUME			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	0	3	1	1
	6	0	3	2	1
	7	0	3	1	1
	8	0	3	1	0
	9	0	3	1	1
	10	0	3	1	0
	MEDIANA	0 A	3 B	1 a C	1 D
G3	11	0	3	2	1
	12	0	3	2	1
	13	0	3	3	1
	14	0	3	3	1
	15	0	3	3	1
	16	0	3	2	1
	MEDIANA	0 A	3 B	2,5 b C	1 D
G4	17	0	3	2	1
	18	0	3	2	1
	19	0	3	1	0
	20	0	3	2	1
	21	0	3	2	1
	22	0	3	3	0
	MEDIANA	0 A	3 B	2 ab C	1 D

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 1 – Demonstração dos resultados da avaliação clínica para o aumento de volume do tendão dos membros torácicos dos animais dos grupos G2, G3 e G4 durante o experimento – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Gráfico 2 – Demonstração do aumento de volume dos membros torácicos do G2, G3 e G4 na semana 4 – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Foi registrado o aumento de temperatura na região lesada na primeira semana após a infiltração com colagenase. Essa alteração desapareceu após a quarta semana. Identificou-se que o animal nº 8 não apresentou alteração de temperatura no local da lesão em qualquer momento do experimento (Tabela 2 e Gráfico 3).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto a alteração de temperatura no local da lesão.

Tabela 2 – Escore da avaliação da presença de calor no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	PRESENÇA DE CALOR			
		0	1	4	8
G2	5	0	3	0	0
	6	0	3	0	0
	7	0	3	0	0
	8	0	0	0	0
	9	0	3	0	0
	10	0	3	0	0
	MEDIANA	0 A	3 B	0 A	0 A
G3	11	0	3	0	0
	12	0	3	1	0
	13	0	3	0	0
	14	0	3	0	0
	15	0	3	0	0
	16	0	3	0	0
	MEDIANA	0 A	3 B	0 A	0 A
G4	17	0	3	0	0
	18	0	3	0	0
	19	0	3	0	0
	20	0	3	0	0
	21	0	3	0	0
	22	0	3	0	0
	MEDIANA	0 A	3 B	0 A	0 A

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 3 – Demonstração dos resultados da avaliação clínica para o aumento de temperatura no local da lesão nos membros torácicos dos animais dos grupos G2, G3 e G4 durante o experimento – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Todos os animais do experimento apresentaram sensibilidade à palpação na primeira semana após a infiltração com collagenase. Essa sensibilidade foi diminuindo progressivamente com a decorrer das semana. Verificou-se que o G4 foi o único grupo que não mais apresentou sensibilidade à palpação ao término do experimento ($p < 0,05$) (Tabela 3 e Gráfico 4).

Não houve diferença significativa entre os grupos para o item sensibilidade à palpação.

Tabela 3 – Escore da avaliação da sensibilidade à palpação no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	SENSIBILIDADE À PALPAÇÃO			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	0	3	3	1
	6	0	3	2	2
	7	0	3	1	0
	8	0	3	1	1
	9	0	3	2	1
	10	0	3	2	1
	MEDIANA	0 A	3 B	2 C	1 D
G3	11	0	3	2	0
	12	0	3	2	0
	13	0	2	3	1
	14	0	3	2	0
	15	0	3	3	1
	16	0	3	3	1
	MEDIANA	0 A	3 B	2,5 B	0,5 C
G4	17	0	3	2	1
	18	0	3	2	1
	19	0	3	1	0
	20	0	3	2	0
	21	0	3	3	0
	22	0	3	2	0
	MEDIANA	0 A	3 B	2 C	0 A

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 4 – Demonstração dos resultados da avaliação clínica para sensibilidade à palpação dos membros torácicos dos animais dos grupos G2, G3 e G4 durante o experimento – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Registrou-se aumento do perímetro da circunferência na região metacarpiana no local da lesão dos animais dos grupos G2 e G3 na primeira semana após a infiltração com a colagenase. Nas semanas seguintes, esse perímetro manteve-se estável (Tabela 4). Entretanto, não foi observada qualquer diferença significativa entre as semanas no G4 (Gráfico 5).

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao perímetro da circunferência da região metacarpiana, mensurada no local da lesão

Tabela 4 - Perímetros das circunferências (cm) na região metacarpiana no local da lesão, no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	PERÍMETRO			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	17,9	19,0	18,7	19,2
	6	16,9	17,1	17,7	17,9
	7	17,0	18,4	17,4	17,7
	8	18,0	18,2	18,7	19,5
	9	18,3	19,2	18,8	19,2
	10	17,3	18,5	18,0	17,8
	MÉDIA	17,6 A	18,4 B	18,2 B	18,6 B
	DP	0,58	0,74	0,60	0,83
G3	11	17,3	19,2	18,3	17,8
	12	18,1	19,0	18,4	18,7
	13	18,2	19,2	19,2	19,0
	14	17,2	18,6	19,2	18,6
	15		18,8	19,3	18,6
	16	17,4	18,9	18,9	18,8
	MÉDIA	17,6 A	19,0 B	18,9 B	18,6 C
	DP	0,47	0,23	0,44	0,41
G4	17	18,8	18,6	19,0	19,0
	18	17,2		18,2	17,9
	19	20,2	17,3	16,8	17,0
	20	17,0		18,0	18,1
	21	17,3	17,7	19,2	19,1
	22	18,4	18,9	19,5	19,7
	MÉDIA	18,2	18,1	18,5	18,5
	DP	1,24	0,75	1,00	0,98

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 5 – Demonstração dos resultados da avaliação clínica para o perímetro da circunferência na região metacarpiana dos membros torácicos dos animais dos grupos G2, G3 e G4 durante o experimento – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

A claudicação esteve presente desde a primeira semana após a administração de colagenase, perdurando até a quarta semana nos animais do G2, G3 e G4 (Tabela 5 e Gráfico 6).

Para a claudicação não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Tabela 5 – Escore da presença ou não de claudicação no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	CLAUDICAÇÃO			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	0	1	1	0
	6	0	1	1	0
	7	0	1	1	0
	8	0	1	1	1
	9	0	1	0	0
	10	0	1	0	0
	MEDIANA	0 A	1 B	1 B	0 A
G3	11	0	1	0	0
	12	0	1	1	0
	13	0	1	1	0
	14	0	1	1	0
	15	0	1	1	0
	16	0	1	1	0
	MEDIANA	0 A	1 B	1 B	0 A
G4	17	0	1	0	0
	18	0	1	1	0
	19	0	1	0	0
	20	0	0	0	0
	21	0	1	1	0
	22	0	1	1	1
	MEDIANA	0 A	1 B	0,5 B	0 B

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda : letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 6 – Demonstração dos resultados da avaliação clínica para a claudicação apresentada pelos animais dos grupos G2, G3 e G4 durante o experimento– São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

5.3 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Foi demonstrada a partir da avaliação ultrassonográfica longitudinal e transversal do tendão, a diminuição da ecogenicidade uma semana após infiltração com collagenase. Esta alteração apresentou-se mais acentuada na quarta semana, tanto nos membros tratados como os não tratados. Entretanto, os tendões dos membros que receberam os tratamentos do G3 e G4 demonstraram melhora na ecogenicidade ao final do experimento, o que não ocorreu nos membros que não receberam o tratamento (Tabela 6 e Gráfico 7).

A ecogenicidade do tendão apresentou diferença estatística significativa entre os grupos na semana 8 ($p=0,05$) (Gráfico 8).

Tabela 6 – Escore da ecogenicidade do tendão por avaliação ultrassonográfica no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas, – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	ECOGENICIDADE TENDÃO			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	0	2	2	2
	6	0	2	2	2
	7	0	0	2	2
	8	0	1	2	1
	9	0	1	1	1
	10	0	1	1	2
	MEDIANA	0 A	1 B	2 B	2a B
G3	11	0	1	1	1
	12	0	1	1	1
	13	0	1	2	1
	14	0	2	3	1
	15	0	1	2	1
	16	0	2	3	1
	MEDIANA	0 A	1 B	2 C	1b B
G4	17	0		3	1
	18	0		2	1
	19	0	1	1	1
	20	0	1	2	1
	21	0	3	3	1
	22	0	1	1	0
	MEDIANA	0 A	1 BC	2 B	1b C

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda : letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p<0,05$.
Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p<0,05$.

Gráfico 7 – Demonstração dos resultados da avaliação ultrassonográfica para a ecogenicidade do tendão nos membros dos animais dos grupos G2, G3 e G4 durante o experimento– São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Gráfico 8 – Demonstração da ecogenicidade do tendão entre os grupos G2, G3 e G4 na semana 8 – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Fato também demonstrado com relação a ecogenicidade da lesão a partir da avaliação ultrassonográfica longitudinal e transversal. Foi observado após uma semana da infiltração com colagenase, que todos os animais possuíam uma lesão hipoecogênica. Na quarta semana, todos os membros tratados como os não tratados já demonstravam uma lesão com aspecto anecoico. Ao final do experimento os tendões dos membros que receberam o tratamento do G3 e G4 demonstraram melhora maior na ecogenicidade da lesão, diferente dos membros do G2 que não receberam o tratamento (Tabela 7).

A ecogenicidade da lesão apresentou diferença estatística significativa entre os grupos na semana 8 ($p=0,05$) (Gráfico 9).

Tabela 7 – Escore da ecogenicidade da lesão por avaliação ultrassonográfica no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	ECOGENICIDADE LESÃO			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	0	3	3	2
	6	0	3	3	3
	7	0	2	3	2
	8	0	3	3	2
	9	0	2	3	3
	10	0	1	3	2
	MEDIANA	0 A	2,5 B	3 C	2 a B
G3	11	0	1	3	1
	12	0	3	3	2
	13	0	2	3	1
	14	0	2	3	1
	15	0	2	3	1
	16	0	2	3	1
	MEDIANA	0 A	2 B	3 C	1 b D
G4	17	0		3	1
	18	0		3	2
	19	0	3	3	0
	20	0	1	3	1
	21	0	3	3	1
	22	0	1	3	1
	MEDIANA	0 A	2 B	3 B	1 b C

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 9 – Escore da ecogenicidade da lesão por avaliação ultrassonográfica no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Analisando os tendões dos animais do G2 e G3 durante toda pesquisa, foi observada uma perda no paralelismo das fibras no local da lesão, logo após a infiltração com collagenase, que perdurou até o final do experimento. O mesmo não aconteceu com os animais do G4, que ao final de 8 semanas apresentou melhora (Tabela 8).

A análise estatística demonstrou a diferença entre os grupos na semana 8 ($p < 0,05$) (Gráfico 10).

Tabela 8 – Escore do grau de alinhamento das fibras tendíneas no plano longitudinal no local da lesão, por avaliação ultrassonográfica no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	ALINHAMENTO			
		0	1	4	8
G2	5	0	3	2	3
	6	0	2	3	3
	7	0	2	3	3
	8	0	1	3	3
	9	0	2	2	2
	10	0	1	2	3
	MEDIANA	0 A	2 B	2,5 BC	3 a C
G3	11	0	2	3	3
	12	0	2	2	2
	13	0	3	3	3
	14	0	3	3	3
	15	0	3	3	3
	16	0	2	3	3
	MEDIANA	0 A	2,5 B	3 C	3 a C
G4	17	0		3	2
	18	0		2	2
	19	0	3	3	2
	20	0	2	3	2
	21	0	3	3	3
	22	0	1	3	2
	MEDIANA	0 A	2,5 B	3 C	2 b B

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Gráfico 10 – Demonstração do alinhamento das fibras tendíneas no plano longitudinal no local da lesão entre os grupos G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Registrou-se aumento gradativo da medida da área transversal do tendão até a quarta semana do experimento, nos grupos G2, G3 e G4, após a infiltração com collagenase, independente da infiltração do PRP. A partir desse momento, foi observado diminuição desse parâmetro nos animais do G2 e G3, mantido estável no G4 (Tabela 9). Dessa forma constatou-se nitidamente que os tendões de todos os animais do experimento não retornaram ao seu tamanho original.

Contudo, para a medida da área transversal do tendão, a análise estatística não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 9 - Área do tendão (mm²) por avaliação ultrassonográfica no plano transversal no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2014

GRUPO	ANIMAIS	ÁREA TRANSVERSAL DO TENDÃO			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	65	93	113	122
	6	57	101	99	106
	7	42	76	82	72
	8	75	89	119	93
	9	75	95	92	93
	10	51	71	74	76
	MÉDIA	60,83 A	87,50 B	96,50 C	93,67 D
	DP	13,30	11,62	17,44	18,64
G3	11	71	88	98	93
	12	65	66	83	75
	13	72	100	111	105
	14	57	91	159	127
	15	54	108	162	170
	16	52	95	133	149
	MÉDIA	61,83 A	91,33 B	124,33 C	119,83 D
	DP	8,70	14,28	32,48	35,69
G4	17			134	156
	18			171	197
	19	64	88	107	97
	20	71	77	113	92
	21	48	76	155	138
	22	65	94	126	128
	MÉDIA	62 A	83,75 B	134,33 C	134,67 D
	DP	9,83	8,73	24,67	39,08

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

A medida da área transversal da lesão também apresentou aumento gradativo até a quarta semana do experimento após a infiltração com collagenase, independente da infiltração do PRP. A partir desse momento, foi observado diminuição desses parâmetros nos animais do G3 e G4. Já os animais do G2 mantiveram a área da lesão estável (Tabela 10).

Da mesma forma, para a medida da área transversal da lesão o teste estatístico não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 10 - Área da lesão (mm²) por avaliação ultrassonográfica no plano transversal no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	ÁREA TRANSVERSAL DA LESÃO			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	0	16	39	45
	6	0	20	25	34
	7	0	12	22	22
	8	0	14	36	24
	9	0	18	19	16
	10	0	13	16	16
	MÉDIA	0 A	15,50 B	26,17 C	26,17 C
	DP	0	3,08	9,33	11,36
G3	11	0	10	22	18
	12	0	8	15	16
	13	0	16	30	22
	14	0	56	90	59
	15	0	22	42	38
	16	0	42	58	37
	MÉDIA	0 A	25,67 B	42,83 C	31,67 D
	DP	0	19,24	27,67	16,38
G4	17	0		75	65
	18	0		108	83
	19	0	14	22	3
	20	0	14	37	25
	21	0	22	75	23
	22	0	20	38	52
	MÉDIA	0 A	17,50 B	59,17 C	41,83 BC
	DP	0	4,12	32,27	29,94

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Comprovou-se aumento gradativo na porcentagem de área lesada até a quarta semana do experimento, tanto após a infiltração com collagenase como após infiltração do PRP. A partir desse momento, foi observada diminuição desses parâmetros em todos os animais do G2, G3 e G4 (Tabela 11). A análise estatística não apresentou diferença significativa entre os grupos para a medida da porcentagem de área lesada.

Tabela 11 – Porcentagem de área lesada (%) por avaliação ultrassonográfica no plano transversal no TFDS dos membros torácicos nos diferentes grupos e diferentes semanas – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	PORCENTAGEM DE ÁREA LESADA			
		SEMANAS			
		0	1	4	8
G2	5	0	18	35	37
	6	0	20	25	33
	7	0	12	15	13
	8	0	15	30	26
	9	0	19	21	17
	10	0	19	21	20
	MÉDIA	0 A	17,17 B	24,50 C	24,33 C
	DP	0	3,06	7,15	9,37
G3	11	0	12	22	19
	12	0	13	18	22
	13	0	16	27	21
	14	0	54	57	46
	15	0	18	21	22
	16	0	44	44	25
	MÉDIA	0 A	26,17 B	31,50 C	25,83 BC
	DP	0	18,09	15,55	10,07
G4	17	0		56	42
	18	0		63	42
	19	0	16	21	3
	20	0	19	33	28
	21	0	29	49	17
	22	0	21	30	41
	MÉDIA	0 A	21,25 B	42,00 C	28,83 BC
	DP	0	5,56	16,44	16,14

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

5.4 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

5.4.1 Anticorpo decorim

Quando analisada a expressão do anticorpo decorim, as amostras dos animais do G1, G2, G3 e G4 não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si (Tabela 12 e Figura 8A, 8B, 8C e 8D).

Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do decorim nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	MÉDIA	DP
G1	5,63	1,69
G2	4,60	3,51
G3	4,00	3,08
G4	4,33	2,88

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

5.4.2 Anticorpo biglicam

Quando analisada a expressão do anticorpo biglicam, as únicas amostras que novamente apresentaram diferença estatística com relação às amostras de tendão sadio G1 foram as amostras do G4 ($p < 0,05$) (Tabela 13 e Figura 8H).

Para todas as amostras do G1, G2 e G3 não foram encontradas diferenças estatísticas significantes (Tabela 13 e Figuras 8E, 8F e 8G).

Tabela 13 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do biglicam nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	MÉDIA	DP
G1	0,63 a	0,52
G2	2,17 ab	1,17
G3	1,33 ab	1,03
G4	2,50 b	1,23

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

5.4.3 Anticorpo fibromodulim

Quando analisada a expressão do anticorpo fibromodulim, as únicas amostras que apresentaram diferença estatística com relação às amostras de tendão sadio G1 foram as amostras do G4 ($p < 0,05$) (Tabela 14 e Figura 8L).

Para todas as amostras do G1, G2 e G3, não foi encontrada diferença estatística (Tabela 14 e Figuras 8I, 8J e 8K).

Tabela 14 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do fibromodulim nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	MÉDIA	DP
G1	0,63 a	0,52
G2	3,40 ab	1,95
G3	4,00 ab	2,74
G4	5,00 b	3,23

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

5.4.4 Anticorpo agrecam

Quando analisada a expressão do anticorpo agrecam, as amostras que apresentaram diferença estatística com relação às amostras de tendão sadio G1 (Figura 8M) foram as amostras do G2 e G4 ($p < 0,05$) (Tabela 15).

Entretanto, quando comparadas as amostras dos animais do G2, G3 e G4 entre si, não foram observadas diferenças estatísticas significantes (Tabela 15 e Figuras 8N, 8O e 8P).

Tabela 15 – Médias e desvio padrão dos escores de expressão do agrecam nos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	MÉDIA	DP
G1	1,00 a	0,00
G2	4,33 b	1,52
G3	1,80 ab	1,30
G4	4,33 b	1,51

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Figura 8 – Imagem microscópica da imunomarcação na matriz extracelular do tendão para os anticorpos decorin, biglicam, fibromodulim e agregam (Aumento de 20x) – São Paulo – 2014

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: decorin (A) grupo controle G1, (B) grupo com lesão sem tratamento G2, (C) grupo com tratamento do PRP G3 e (D) grupo com tratamento do PRP e laser G4; para o anticorpo biglicam (E) grupo controle G1, (F) grupo com lesão sem tratamento G2, (G) grupo com tratamento do PRP G3 (H) grupo com tratamento do PRP e laser G4; para o anticorpo fibromodulim (I) grupo controle G1, (J) grupo com lesão sem tratamento G2, (K) grupo com tratamento do PRP G3 e (L) grupo com tratamento do PRP e laser G4; e para o anticorpo agregam (M) grupo controle G1, (N) grupo com lesão sem tratamento G2, (O) grupo com tratamento do PRP G3 e (P) grupo com tratamento do PRP e laser G4.

5.5 ANÁLISE DA BIRREFRINGÊNCIA DO COLÁGENO

Os resultados demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os valores de G1 (Figura 9A), tendões sadios, e todos os outros tendões dos grupos G2, G3 e G4 (Tabela 16 e Figuras 9B, 9C e 9D). Os maiores valores de OR foram os dos tendões sadios (G1). Os valores OR desse grupo foram maiores que os valores atribuídos para os membros que não receberam o tratamento do G2, ou mesmo, para os membros que receberam o tratamento do G3 e G4 (Tabela 16).

Bem como, os tendões dos animais do G4 também não apresentaram diferença estatística para os tendões dos animais do G3 ($p = 0,628$), mas apresentaram diferença significativa para os tendões dos animais do G2 ($p = 0,025$) (Tabela 16).

Tabela 16 – Média e desvio padrão dos retardos ópticos (ηm) dos tendões do G1, G2, G3 e G4 – São Paulo – 2011 a 2013

Grupo	MÉDIA	DP
G1	27,03 a	6,58
G2	14,06 b	2,93
G3	14,93 bc	2,93
G4	15,40 c	3,99

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $p < 0,05$.

Figura 9 - Análise quantitativa da birrefringência das amostras dos tendões dos grupos G1, G2, G3 e G4, com seu eixo longitudinal orientado a 45° em relação a direção de propagação da luz polarizada. (Aumento de 20x) – São Paulo – 2014

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

Legenda: (A) tendões saudáveis do G1, (B) tendões com lesão do G2, (C) tendões que receberam o tratamento com PRP do G3 e (D) tendões que receberam o tratamento com PRP e laser.

5.6 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O protocolo estabelecido nesse estudo demonstrou que a concentração final de plaquetas foi de 2,90 e 2,45 vezes maior que sua quantidade inicial, nos grupos G3 e G4 respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17 – Demonstração da contagem de plaquetas no sangue total (inicial) e no plasma rico plaquetas (final), com o correspondente fator de multiplicação – São Paulo – 2011 a 2013

GRUPO	ANIMAIS	CONCENTRAÇÃO DE PLAQUETAS		CONCENTRAÇÃO
		INICIAL $\times 10^3/\mu\text{l}$	FINAL $\times 10^3/\mu\text{l}$	
G3	11	166	577	3,48
	12	193	595	3,08
	13	151	561	3,72
	14	231	833	3,61
	15	226	379	1,68
	16	210	384	1,83
	MÉDIA	196,17	554,83	2,90
	DP	32,42	167,11	0,91
G4	17	185	295	1,59
	18	171	498	2,91
	19	199	520	2,61
	20	192	455	2,37
	21	138	373	2,70
	22	213	530	2,49
	MÉDIA	183	445,17	2,45
	DP	26,12	93,21	0,46

Fonte: (SCHULTZ, 2014).

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

As alterações clínicas observadas no local da lesão durante a primeira semana após infiltração com collagenase e constatadas em todos os animais deste trabalho, como aumento de volume, aumento de sensibilidade e elevação de temperatura, assemelham-se aos sintomas clínicos descritos por Ross et al. (2011) sobre a tendinite do TFDS de ocorrência natural.

Independente do tratamento, o aumento de volume do tendão permaneceu na maioria dos animais dos grupos G2, G3 e G4 até o final do experimento. Williams et al. (1984) demonstraram que em cavalos com lesão induzida por collagenase, o aumento de volume do tendão diminuiu progressivamente durante um período de 12 meses. Entretanto, essa estrutura permaneceu aumentada durante um período de 14 meses após a infiltração.

Todavia, após uma semana da infiltração com PRP, um aumento de volume mais proeminente foi observado no tendão dos animais do grupo G3 quando comparados com os animais do G2, os quais não receberam tratamento. Essa mesma diferença não foi encontrada entre os animais dos grupos G2 e G4. Além do tratamento com o PRP, os animais do grupo G4 também receberam a irradiação com o laser, o que pode ter suavizado a alteração causada pela aplicação do PRP. Em um estudo experimental, utilizando o laser para o tratamento da tendinite em galinhas, Xu et al. (1991) constataram ao exame macroscópico que os tendões não tratados eram mais espessos que os tendões que receberam o tratamento com laser.

Muito semelhante ocorreu com a avaliação da sensibilidade à palpação local nos animais do G4, os quais apresentaram o menor escore ao final do experimento. Provavelmente o LASER tenha contribuído para diminuir esta sensibilidade nos pacientes do G4. Machado et al. (2000) relataram o mesmo resultado, demonstrando um efeito analgésico local quando o laser de arseneto de gálio foi aplicado na dosimetria de $8/Jcm^2$. De forma distinta, no trabalho de Freitas (2004)

onde os equinos não foram expostos a qualquer tipo de tratamento, estes ainda apresentaram sensibilidade à palpação após 90 dias de indução da lesão com colagenase.

6.2 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

A avaliação ultrassonográfica deve ser utilizada tanto para confirmar o diagnóstico da lesão no TFDS como para avaliar objetivamente a sua gravidade, além de acompanhar o progresso da cicatrização (ROSS, et al., 2011). Neste trabalho, este instrumento mostrou-se eficiente, não só no diagnóstico e acompanhamento da cicatrização da lesão, como no auxílio dos procedimentos de indução da lesão, infiltração de PRP e biópsia.

De um modo geral, as avaliações ultrassonográficas de lesões tratadas com PRP revelam uma evolução positiva (ARGÜELLES et al, 2008; CARMONA; PRADES; ARGÜELLES, 2009; PRADES, 2009; RINDERMAN et al., 2010). O mesmo não tem ocorrido com o laser, onde os trabalhos que realizaram o acompanhamento ultrassonográfico dos seus pacientes não conseguiram detectar diferenças em relação ao grupo controle (BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006; MIKAIL, 2008). Isso ocorreu provavelmente porque muitos trabalhos utilizaram o membro contralateral como controle. É conhecido que o efeito do laser não se limita apenas ao local da irradiação, ou seja, este efeito pode atingir partes distantes do corpo por meio de mediadores metabólicos, inclusive o membro contralateral do paciente (TÚNER; HODE, 1998).

Para os parâmetros de ecogenicidade do tendão e da lesão, os animais dos grupos tratados G3 e G4 apresentaram uma melhora significativa ao final do experimento quando comparados com os animais do grupo G2, que não receberam tratamento. Existe uma correlação direta entre a quantidade de colágeno e a intensidade da ecogenicidade. A medida que os fibroblastos chegam a área de lesão a intensidade da ecogenicidade aumenta discretamente. Entretanto, o aumento mais significativo da ecogenicidade das lesões está correlacionado com a produção de colágeno, resultante dos fibroblastos durante o processo de cicatrização (HENRY; PATTON; GOBLE, 1986). Segundo Prades (2009), os fatores de crescimento

presentes no PRP possuem efeitos anabólicos sobre os tenócitos e a síntese de MEC. E, além dos fibroblastos, a irradiação com laser pode aumentar a expressão do colágeno tipo I (CHEN et al., 2008).

Analisando o paralelismo das fibras no local da lesão, observamos que os animais que receberam o tratamento com laser (G4) apresentaram o melhor resultado ao final do experimento. Segundo Van Schie et al. (2001), o alinhamento dos feixes de colágeno ao longo do eixo longitudinal do tendão é refletido em imagens ultrassonográficas homogêneas e alinhadas, o que pode ser interpretado como o restabelecimento do arranjo original. Vários trabalhos relatam o efeito do laser terapêutico interferindo na produção e no alinhamento das fibras de colágenos (CARRINHO et al., 2006; CHEN et al., 2009; NEVES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

6.3 IMUNOISTOQUÍMICA

Os resultados dessa pesquisa demonstraram que todos os proteoglicanos, com exceção do decorim, tiveram sua expressão acentuada nas amostras do grupo G4 tratados com laser, quando comparados com as amostras do tendão hígido G1. Já no grupo G2 observou-se aumento da expressão de agrecan em relação ao G1. Para as expressões de fibromodulim e biglican nos grupos G2 e G3 não foram observadas alterações em relação ao G1.

Um estudo demonstrou que os efeitos da irradiação com laser de 660 nm a 5 J/cm² sobre as células de fibroblastos da pele humana podem aumentar ou diminuir a expressão dos genes envolvidos na produção de colágeno, adesão e distribuição celular, enzimas de remodelamento, citoesqueleto, citocinas inflamatórias e quimiocinas, fatores de crescimento e de transdução de sinal (HOURELD; AYUK; ABRAHAMSE, 2014). Entretanto, não foi encontrado na literatura informações que correlacionem a irradiação do laser e o aumento dos proteoglicanos na MEC de tendões. Em estudo verificando o efeito do laser de baixa intensidade em tecido ósseo de ratos foi possível demonstrar mudanças qualitativas e quantitativas na expressão de condroitim sulfato, ácido hialurônico e pequenos proteoglicanos (MERLI et al., 2012).

O aumento da síntese de proteoglicanos nas tendinopatias pode ocorrer, em parte, pelo aumento da celularidade. CHEN et al. (2008) citam que o laser terapêutico acelera a cicatrização devido a proliferação de fibroblastos e produção da MEC.

Samiric et al. (2009) descreveram um aumento significativo no conteúdo de agregam, biglicam e fibromodulim, em tendões patelares de humanos com lesão crônica, associando esse aumento a alta taxa de *turnover* característica desses proteoglicanos. Este fato pode explicar porque apenas esses proteoglicanos tiveram um aumento na expressão no presente estudo, o que não ocorreu com o decorim.

Assim como no nosso estudo, onde não foi encontrada diferença na expressão de decorim entre os resultados do tendão normal (G1) e do tendão com lesão (G2), no tendão de Aquiles de humanos (ALFREDSON et al., 2003; CORPS et al., 2005) e no tendão patelar (SAMIRIC et al., 2009) o decorim também não demonstrou diferença significativa nas tendinopatias.

Um outro estudo em tendões de coelhos demonstrou-se que os níveis de decorim foram reduzidos significativamente após a lesão, quando comparados com os controles sem lesão (BERGLUND et al., 2006). Contudo, segundo Samiric et al. (2009) essa variação pode ser unicamente devido às diferenças estruturais e funcionais entre os tipos de tendão, função e sua localização.

No presente estudo, os animais do G3 e G4 apresentaram a expressão do decorim menor quando comparado com os animais do G2. Isto pode ser explicado pela influência dos fatores de crescimento presentes no PRP. Pois um estudo *in vitro* (KÄHÄRI; LARJAVA; UITTO, 1991) demonstrou que o decorim diminui na presença do TGF- β , tanto em fibroblastos de pele humana como de gengiva.

Essa diminuição do decorim nos grupos G3 e G4 pode ser uma indicação do sucesso do tratamento. Uma das funções do decorin é sua habilidade de inibir a proliferação celular (IOZZO, 1998), demonstrado na inibição da fibrilogênese do colágeno tipo I em tendão bovino (VOGEL; PULSSON; HEINEGÅRD, 1984). Outro estudo demonstrou que o decorim, bem como outros pequenos proteoglicanos ricos em leucina, pode influenciar a remodelação da MEC, pois o decorim pode induzir a ativação de collagenase (IOZZO, 1998). Sendo assim, a deficiência de decorim (valores menores em G3 e G4) pode indicar uma progressão mais rápida e prematura da fibrilogênese (ZHANG et al., 2006).

O biglicam normalmente se acumula e se mantém em níveis elevados por longos períodos após a lesão em tendão. Em tendões de coelho, a expressão do biglicam foi significativamente maior em todos os momentos após a lesão, começando a diminuir entre 12 e 24 dias após a lesão, mas permanecendo significativamente maior (2 a 4 vezes) quando comparado com os controles sem lesão (BERGLUND et al., 2006). Também foi observado o aumento na expressão gênica do biglicam na tendinopatia do tendão de Aquiles em humanos (CORPS et al., 2005). Como nossa avaliação ocorreu oito semanas após a indução com colagenase, esse proteoglicano provavelmente retornou ao seu nível basal nas amostras do G2.

Os níveis de agrecam no tendão de coelhos aumentam significativamente logo após lesão, estando normalizados no tecido após 24 dias (BERGLUND et al., 2006). Também foi observado o aumento na expressão gênica do agrecam na tendinopatia do tendão de Aquiles em humanos (CORPS et al., 2005). Como ocorreu com o biglicam, os níveis do agrecam devem ter retornado ao seu nível basal nas amostras do G2, após oito semanas da indução da lesão.

Os tendões com lesão contêm níveis mais elevados de fibromodulim que tendões normais, indicando uma acúmulo desse proteoglicano na matriz extracelular, sugerindo uma mudança no metabolismo da fibromodulim (SAMIRIC et al., 2009). Essa alteração foi encontrada nas amostras dos animais com lesão (G2) quando comparadas com o tendão hígido (G1).

6.4 BIRREFRINGÊNCIA

Para analisar o nível de organização das fibras colágenas no local da lesão, encontramos o valor OR por meio da birrefringência, para todos os animais de cada grupo, utilizando a microscopia de luz polarizada. A intensidade de brilho na imagem da birrefringência (representado pelo valor OR) revela o nível de agregação e organização molecular das fibras de colágeno. De acordo com Vidal (2003), a avaliação utilizada, chamada de análise de birrefringência, é o melhor método para se detectar e descrever a orientação das fibras de colágeno no tendão.

Muitos estudos têm utilizado a microscopia de luz polarizada para analisar qualitativa e quantitativamente a organização, estado de agregação e ordem molecular das fibras de colágeno por meio das medidas do retardo óptico (OR, em nm), devido à sua birrefringência (CARRINHO et al., 2006; ARRUDA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; NEVES et al., 2011).

Os valores (nm) do retardo óptico, o que corresponde ao total de birrefringência, foram maiores no grupo G1 quando comparados com valores de OR dos grupos G2, G3 e G4. No grupo G1, observa-se o valor de birrefringência padrão para tecido do tendão normal que não sofreu qualquer tipo de lesão ou intervenção, apresentando valores de 27,03 nm. Estes dados podem ser explicados pelo alto grau de agregação e organização das fibras de colágeno nos tendões neste grupo, considerando que eles não sofreram qualquer tipo de lesão, ou seja, esses tendões estavam intactos.

Os resultados também demonstraram os menores valores de OR para o grupo com lesão sem tratamento (G2), o que sugere que estes animais apresentaram uma estrutura molecular mais desorganizada das fibras de colágeno na área da lesão. O valor OR desse grupo foi de 14,06 nm, o que demonstra uma desorganização das fibras de colágeno em comparação com o grupo tratado com laser (G4) e o grupo de controle padrão (G1). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as amostras dos grupos G2 e G3.

Durante o processo de regeneração de um tendão lesado há uma tendência para o aumento dos valores de OR, o que representa uma melhora na organização do colágeno. Provavelmente, o laser foi capaz de produzir um aumento na síntese de colágeno e uma melhor agregação e alinhamento das fibras de colágeno nos animais irradiados durante o processo de reparação tecidual, representado pelo valor mais alto apresentado pelo grupo tratado com laser (G4). Apesar do grupo G4 ainda demonstrar uma diferença significativa quando comparado com os valores do grupo G1, os resultados deste estudo mostram que o grupo tratado com laser terapêutico obteve uma melhora significativa em termos de realinhamento das fibras de colágeno, de acordo com análise de birrefringência, pois obteve o maior valor de retardo óptico. O mesmo ocorreu no tendão calcâneo com lesão de ratos quando estimulados pelo laser (CARRINHO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

6.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O PRP foi administrado em 12 cavalos e em nenhum deles ocasionou qualquer efeito colateral, assim como ocorreu no estudo de Prades (2009).

No protocolo estabelecido nesse estudo, a concentração final das plaquetas alcançou a quantidade 2,67 vezes maior que a concentração inicial de plaquetas no sangue total. Uma concentração muito próxima foi encontrada por de Mos et al. (2008) e Kisiday et al. (2012). A concentração ideal de plaquetas ou fatores de crescimento necessária para o tratamento de lesões nos tecidos dos cavalos é desconhecida, apesar de alguns autores sugerirem que a resposta aos fatores de crescimento é maximizada quando a concentração de plaquetas é 4 vezes maior do que o plasma normal (PRADES, 2009). Entretanto, Boswell e seus colaboradores (2014) afirmaram que a contagem plaquetária não tem influência na evolução das lesões, pois uma modesta concentração pode obter os efeitos clínicos desejados.

Esse protocolo também buscou a menor concentração de leucócitos para o PRP, visando evitar os efeitos pró-inflamatórios. Os resultados do estudo de Boswell e seus colaboradores (2014) sugerem que minimizar a quantidade de leucócitos no PRP é mais importante do que maximizar o número de plaquetas, pois além de diminuir a expressão de moléculas pró-inflamatórias, aumenta a expressão de moléculas da MEC. Outro autor relata que a concentração de leucócitos não deve exceder sua concentração ou contagem no sangue venoso (PRADES, 2009).

Uma observação a ser feita sobre o presente protocolo foi a não utilização de qualquer agente externo de ativação de plaquetas. Segundo Foster et al. (2009), o colágeno do tipo I induz a formação mais lenta dos coágulos de plaquetas, o que pode ser superior terapeuticamente, assegurando uma libertação lenta dos fatores de crescimento para a área lesada. Quando o PRP fresco não ativado é administrado, estima-se que a liberação dos fatores de crescimento é gradual durante as 92 horas seguintes (PRADES, 2009). O contrário ocorre quando as plaquetas são ativadas por fatores externos, como por exemplo, a trombina bovina, quando 100% dos fatores de crescimento são liberados dentro de uma hora após ativação (FOSTER et al., 2009), diminuindo ao longo dos 3 ou 4 dias seguintes (PRADES, 2009). Já com a ativação por cloreto de cálcio, a liberação pode ocorrer durante sete dias (FOSTER et al., 2009).

Deve-se salientar que uma única dose de PRP foi administrada neste estudo. Segundo Aspenberg e Virchenko (2004) uma única injeção do concentrado de plaquetas pode aprimorar o reparo de tendões, já que o efeito produzido por ela pode perdurar igualmente por quatro semanas. Bosch et al. (2010, 2011) afirmaram que após uma única dose de PRP há uma melhor qualidade na cicatrização de tendões flexores superficiais de equinos, tanto nas propriedades bioquímicas quanto biomecânicas. Mesmo assim, Prades (2009) sugere que para apenas uma aplicação de PRP o tempo de cicatrização é mais lento do que quando utilizado duas ou mais aplicações. Em nosso trabalho a aplicação única de PRP foi eficaz somente quando associado ao laser.

A intervenção com a terapia regenerativa, o PRP, deve ser realizada durante a segunda fase da cicatrização do tendão. Esse momento seria quando existe a possibilidade de se intervir na reorganização estrutural da lesão, o que implicaria em termos de tempo entre os primeiros cinco a sete dias até dois meses. Também existe um consenso para não se utilizar o PRP durante os primeiros 10 a 15 dias após a lesão inicial, pois a hemorragia na lesão ainda está presente (PRADES, 2009). Sendo assim, escolhemos a terceira semana após a indução da lesão para a realização da infiltração com o PRP.

Há claramente uma falta de evidência científica para apoiar o uso do PRP. Os resultados conflitantes na literatura tornam evidente a necessidade de mais investigação antes de se recomendar este procedimento aos pacientes. Modelos confiáveis e reprodutíveis devem ser primeiro desenvolvidos, além de testes mais rigorosos e padronizados que provem seu benefício.

6.6 LASER

Tanto a seleção do comprimento de onda, como densidade de potência correta (W/cm^2) e dose (densidade de energia: joules por cm^2 [J/cm^2]) são imprescindíveis quando os melhores efeitos terapêuticos querem ser atingidos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006)

Para este estudo foi escolhido o laser de arseneto de gálio com comprimento de onda de 904 nm. Segundo Bjordal, Couppe e Ljunggren (2001), o laser de 904

nm GaAs pulsado parece atravessar a barreira da pele mais facilmente, ou seja, sem a necessidade da mesma precisão meticulosa na dose de acordo com a localização do tendão, como é necessário com os 820 nm GaAlAs lasers. Outra constatação é que os pequenos feixes e altas saídas dos lasers 820 nm podem resultar em densidade de potência e doses muito altas, o que possivelmente inibe o sucesso do tratamento em casos de tendinopatias localizadas superficialmente (BJORDAL COUPPE; LJUNGGREN, 2001). Essa opinião contradiz a de Túrner e Hode (2010) que acreditam que os lasers de GaAlAs são a melhor escolha para as tendinites.

Dois trabalhos relatam o tratamento de tendinite do TFDS induzida em equinos com o laser de 904 nm (MACHADO et al., 2000; MIKAIL, 2009). No primeiro, o tratamento com laser mostrou-se efetivo na aceleração da reparação da lesão tendínea, enquanto o segundo não demonstrou haver interferência no processo de regeneração.

A densidade de potência escolhida para este estudo foi de 500mW. Em laboratório, o laser com densidade de potência superior a 50mW/cm² parece inibir a atividade do fibroblasto e a produção de colágeno (LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994). Entretanto, um trabalho encontrou efeitos positivos com densidade de potência entre 1,4 e 3,5 W/cm², indicando um aumento gradual na organização das fibras de colágeno associada ao aumento na potência (NEVES et al., 2011).

A dose utilizada foi de 2 J por ponto, sendo irradiadas três regiões e totalizando 6 J. Alguns estudos relataram que doses inferiores a 0,1 J/cm² não produzem resultados significativos, enquanto que doses superiores a 4,5 J/cm² produzem um efeito de inibição sobre o metabolismo de fibroblastos e produção de colágeno (BJORDAL COUPPE; LJUNGGREN, 2001). Lima et al. (2012) realizaram uma pesquisa em tendão de ratos utilizando a densidade de energia entre 3 e 6 J/cm², com cinco sessões de tratamento por duas semanas, demonstrando que com as duas doses o laser é capaz de promover o rearranjo das fibras de colágeno.

O tratamento com o laser terapêutico tem demonstrado ser acumulativo, isto que dizer que a dose de um tratamento perdura até o próximo tratamento. Por isso é fundamental que os tratamentos não sejam muito próximos, para evitar que a dose acumulada eventualmente acabe logo acima, do âmbito de bioestimulação ou até no âmbito de bioinibição, tendo como consequência resultados insignificantes (TUNÉR;

HODE, 2010). Vários estudos empregam a frequência de tratamento de 3 a 5 vezes por semana durante duas a quatro semanas (BJORDAL COUPPE; LJUNGGREN, 2001). Contudo, tem sido demonstrado que é mais vantajoso fazer o tratamento em intervalos menores no início, por exemplo, em dias alternados ou a cada três dias, por duas semanas. Após esse período, realizá-la com intervalos mais longos, por exemplo, uma vez por semana (TUNÉR; HODE, 2010). Assim foi a frequência do tratamento realizado, nas primeiras duas semanas, quando foram realizadas seis sessões com dias intercalados. A partir da terceira semana de tratamento foi realizada apenas uma irradiação semanal até o final do experimento.

A regeneração dos tendões passa por diferentes fases de cicatrização. Cada estágio envolve um diferente conjunto de eventos ultraestruturais, sugerindo que estratégias terapêuticas devem ser modificadas de acordo com os eventos específicos de cada fase. Devido a fotoestimulação do laser influenciar em um ou mais estágios da cicatrização do tendão, os melhores efeitos são alcançados visando um período específico da especialização (ENWEKA et al., 1994). Com o objetivo de promover a proliferação dos fibroblastos, consequentemente a síntese de colágeno e MEC, o tratamento com laser teve início na segunda semana após a indução da lesão, durante a fase proliferativa da cicatrização do tendão.

Em trabalho com ratos também avaliando-se o tratamento com PRP e laser, demonstrou-se haver maior quantidade de colágeno tipo I quando ambos foram associados, em comparação com os tratamentos isoladamente. O contrário ocorreu com a quantidade de colágeno tipo III, quando o tratamento associando o laser ao PRP demonstrou menor quantidade de colágeno tipo III em comparação com os tratamentos isolados. Assim, esse estudo demonstrou que o tratamento combinado do PRP com laser é mais eficiente (BARBOSA, 2012).

Ainda se fazem necessárias pesquisas utilizando o laser terapêutico, isolado ou associado com as terapias celulares, com a finalidade de estabelecer o melhor protocolo para este tipo de tratamento.

7 CONCLUSÃO

- ⇒ A avaliação clínica não foi capaz de evidenciar diferenças na resolução da tendinite entre os tratamentos;
- ⇒ A avaliação ultrassonográfica demonstrou que o tratamento com PRP associado ao laser acelerou a regeneração tendínea com relação ao tratamento utilizado isoladamente com PRP;
- ⇒ O tratamento com PRP associado ao laser induziu a expressão do biglicam, fibromodulim e agregam na matriz extracelular do tendão;
- ⇒ Os valores de birrefringência demonstraram melhor organização e agregação das fibras de colágeno no tratamento com PRP associado ao laser, ao contrário do PRP utilizado isoladamente;
- ⇒ A associação do PRP com o laser de 904 nm, 500 mW de potência e dose de 6 J demonstrou ser um método eficaz para acelerar a regeneração do tendão, assim como para melhorar a organização de suas fibras de colágeno.

REFERÊNCIAS

- ABERGEL, R. P.; MEEKER, C. A.; LAM, T. S.; DWYER, R. M.; LESAVOY, M. A. UITTO, J. Control of connective tissue metabolism by lasers: recent developments and future prospects. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 11, n. 6, p. 1142-1150, 1984.
- ALFREDSON, H.; LORENTZON, M.; BACKMAN, S.; BACKMAN, A.; LERNER, U. H. cDNA-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic Achilles tendinosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 970-975, 2003.
- ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDIGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, p. 179-184, 2001.
- AMEYE, L.; ARIA, D.; JEPSEN, K.; OLDBERG, A.; XU, T.; YOUNG, M. F. Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/ fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. **The FASEB Journal**, v. 16, p. 673-680, 2002.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F.; MUÑOS, E.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **The Veterinary Record**, v. 162, p. 208-211, 2008.
- ARPORNMAEKLONG, P.; KOHEL, M.; DEPPRICH, R.; KÜBLER, N. R.; WÜRZLER, K. K. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells: An in vitro study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33, p. 60-70, 2004.
- ARRUDA, E. R. B.; RODRIGUES, N. C.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N. A. Influência de diferentes comprimentos de onda na laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendinea do rato após tenotomia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 4, p. 283-288, 2007.
- ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repairs in rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 75, n. 1, p. 93-99, 2004.
- BANES, A. J.; HORESOVSKY, G.; LARSON, C.; TSUZAKI, M.; JUDEX, S.; ARCHAMBAULT, J.; ZERNICKE, R.; HERZOG, W.; KELLEY, S.; MILLER, L.

Mechanical load stimulates expression of novel genes *in vivo* and *in vitro* in avian flexor tendon cells. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 7, p.141-153, 1999.

BARBOSA, D. **Influência do laser e baixa potência associado ou não ao plasma rico em plaquetas na cicatrização do tendão calcâneo: estudo histológico em ratos**. 2012. 68 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, 2012.

BARREIRA, A. P. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica, histopatológica e imunoistoquímica**. 2005. 82 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

BASSAGE, L. H.; ROSS, M. W. Diagnostic Analgesia. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 2. ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011. p. 115.

BERGLUND, M.; RENO, C.; HART, D. A.; WIIG, M. Patterns of mRNA expression for matrix molecules and growth factors in flexor tendon injury: differences in the regulation between tendon and tendon sheath. **Journal of Hand Surgery**, v. 31A, p. 1279–1287, 2006.

BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; IVERSEN, V. V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. **British Journal of Sports Medicine**, v. 40, p. 76-80, 2006.

BJORDAL, J. M. B.; COUPPE, C.; LJUNGGREN, A. E. Low level laser therapy for tendinopathy: evidence of a dose-response pattern. **Physical Therapy Reviews**, v. 6, p. 91-99, 2001.

BOSH, 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 flexor tendon lesions. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 21, p. 554-461, 2011.

BOSH, G.; VAN SCHIE, H. T. M.; 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 Orthopaedic Research**, v. 28, p. 211-217, 2010.

BOSWELL, S. G.; SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; SUNDMAN, E. A.; MINAS, T.; FORTIER, L. A. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 1, p. 42-49, 2014.

CARMONA, J. U.; PRADES, M.; ARGÜELLES, D. Concentrados autólogos e plaquetas como tratamento de lesiones de tejidos blandos del aparato locomotor en caballos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 41, p. 77-82, 2009.

CARRINHO, P. M.; RENNO, A. C. M.; KOEKE, P.; SALATE, A. C. B.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. Comparative study using 685-nm and 830-nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. **Photomedicine and laser Surgery**, v. 24, n. 6, p. 754-758, 2006.

CHIA-HSIN CHEN; JIN-LIAN TSAI; YAN-HSIUNG WANG; CHIA-LING LEE; JUNE-KAI CHEN; MAO-HSIUNG HUANG. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 5, p. 646-650, 2009.

CORPS, A. N.; ROBINSON, A. H. N.; MOVIN, T.; COSTA, M. L.; HAZLEMAN, B. L.; RILEY, G. P. Increased expression of aggrecan and biglycan mRNA in Achilles tendinopathy. **Rheumatology**, v. 45, p. 291-294, 2005.

CORREA, F.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; CORREA, J. C.; IVERSEN, V. V.; JOENSON, J.; BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy (GaAs $\lambda = 904$ nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, n. 4, p. 245-249, 2007.

DANIELSON, K.; BARIBAULT, H.; HOLMES, D. F.; GRAHAM, H.; KADLER, K. E.; IOZZO, R. V. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. **The Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 729-743, 1997.

DE MOS, M.; VAN DER WINDT, A.; JAHR, H.; VAN SCHIE, H. T. M.; WEINANS, H.; VERHAAR, J. A. N.; VAN OSCH, G. J. V. M. Can platelet-rich plasma enhance tendon repairs? A cell culture study. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 6, p. 1171-1178, 2008.

ENWEMEKA, C. S.; COHEN-KORNBERG, E.; DUSWALT, E. P.; WEBER, D. M.; RODRIGUEZ, I. M. Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. **Laser Therapy**, v. 6, p. 181-188, 1994.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.

FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, M. B.; RODEO, S. A. Platelet-rich plasma from basic science to clinical applications. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 11, p. 2259-2272, 2009.

FRANCHI, M.; TRIRÈ, A.; QUARANTA, M.; ORSINI, E.; OTTANI, V. Collagen structure of tendon relates to function. **The Scientific World Journal**, v. 7, p. 404-420, 2007.

FREITAS, J. M. R. **Estudo da viabilidade e utilidade de biópsias tendíneas seriadas em eqüinos como meio de diagnóstico e monitoração da tendinite**. 2004. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

GINN, K. A.; HERBERT, R. D.; KHOUW, W.; LEE, R. A randomized, controlled clinical Trial of a treatment for shoulder pain. **Physical Therapy**, v. 77, n. 8, p. 802-809, 1997.

GREEN, S.; BUCHBINDER, R.; GLAZIER, R.; FORBES, A. Systematic review of randomised controlled trials of interventions for painful shoulder: selection criteria, outcome assessment, and efficacy. **British Medical Association**, v. 316, p. 354-360, 1998.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblast. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 6, p. 705-714, 2006.

HENRY, G. A.; PATTON, C. S.; GOBLE, D. O. Ultrasonographic evaluation of iatrogenic injuries of the accessory (carpal check) ligament and superficial digital flexor tendon. **Veterinary Radiology**, v. 27, p. 132-140, 1986.

HOURELD, N. N.; AYUK, S. M.; ABRAHAMSE, H. Expression of genes in normal fibroblast cells (WS1) in response to irradiation at 660nm. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 130, p. 146-152, 2014.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 609-652, 1998.

KÄHÄRI, V. M.; LARJAVA, H.; UITTO, J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. **The journal of biological chemistry**, v. 266, n. 16, p. 10608-10615, 1991.

KISIDAY, J. D.; MCILWRAITH, C. W.; RODKEY, W. G.; FRISBIE, D. D.; STEADMAN, J. R. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. **Cartilage**, v. 3, n. 3, p. 245-254, 2012.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A. B.; AL-HAJ, H.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 30, p. 365-369, 2002.

LIMA, C. R. **Proteoglicanos de estroma mamário e fibroadenoma humanos em diferentes condições hormonais**. 2009. 247 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

LIMA, J. G. M.; OLIVEIRA FILHO, G. R.; LIMA, M. T. B. R. M.; FERREIRA, A. S.; SILVA, J. G. Influence of low intensity laser therapy (AsGa) on the cicatrization processo f mechanic tendon injury in Wistar rats. **Lasers Physics**, v. 22, n. 9, p. 1445-1448, 2012.

LOEVSCHELL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effects of low level diode laser (GaAlAs) irradiation on fibroblast of human oral mucosa in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 14, p. 347-354, 1994.

MACHADO, M. V. M.; VULCANO, L. C.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G. Efeito da laserterapia em tendinite experimento no tendão flexor digital superficial em equinos: estudo histológico e ultra-sonográfico. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 11-115, 2000.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e histopatológica**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MARCOS, R. L.; ARNOLD, G.; MAGNET, V.; RAHOUDJ, R.; MAGDALOU, J.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 272-285, 2014.

MARCOS, R. L.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; ARNOLD, G.; MAGNET, V.; RAHOUADJI, R.; WANG, X.; DEMEURIE, F.; MAGDALOU, J.; CARVALHO, M. H. C.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. **Journal of Orthopaedic research**, v. 30, n. 12, p. 1945-1951, 2012.

MARX, R. E. Platelet –rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP. **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.

MCCARREL, T. M.; MINAS, T.; FORTIER, L. A. Optimiztin of leukocyte concetration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 94, n. 9, p. E143 1-8, 2012.

MERLI, L. A. S.; MEDEIROS, V. P.; TOMA, L.; REGINATO, R. D.; KATCHBURIAN, E.; NADER, H. B.; FALOPPA, F. The low level laser therapy effect on the remodeling of bone extracellular matrix. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 1293-1301, 2012.

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

NEVES, M. A. I.; PINFILDI, C. E.; WOOD, V. T.; GOBBATO, R. C.; SILVA, F. M.; PARIZOTTO, N. A.; HOCHMAN, B.; FERREIRA, L. M. Different Power settings of LLLT on the repair of the calcaneal tendon. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 10, p. 663-668, 2001.

OLIVEIRA, F. S.; PINFILDI, C. E.; PARIZOTO, N. A.; LIEBANO, R. E.; BOSSINI, P.S.; GARCIA, É. B.; FERREIRA, L. M. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon, **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, p. 271-276, 2009.

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.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I. M.; CINGOLANI, A. Increase of próton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Letters**, v. 175, n. 1, p. 95-99, 1984.

PRADES, M. **La terapia de las lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencias clínicas y bioquímicas que validan su utilización.** 2009. 250 f. Thesis (Doctorado em Veterinària) – Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2009.

RANTANEM, N. W.; JORGENSEN, J. S.; GENOVESE, R. L. Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse.** 2. ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011. cap. 16. p.182-205.

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

RINDERMAN, G.; CISLAKOVA, M.; ARNDT, G. CARSTANJEN, B. Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. **Journal of Veterinary Science**, v . 11, n. 2, p. 173-175, 2010.

ROSS, M. W.; GENOVESE, R. L.; DYSON, S. J.; JORGENSEN, J. S. Superficial digital flexor tendonitis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse.** 2. ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011. cap 69. p. 707-726.

SAMIRIC, T.; ILIC, M. Z.; HANDLEY, C. J. Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. **Matrix Biology**, v. 23, p. 127-140, 2004.

SAMIRIC, T.; PARKINSON, J.; ILIC, M. Z.; COOK, J.; FELLER, J. A.; HANDLEY, C. J. Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. **Matrix Biology**, v. 28, p. 230-236, 2009.

SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; JACOBSON, M. S.; FORTIER, L. A. Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 3, p. 260-265, 2008.

SMITH, J. J.; ROSS, M. W.; SMITH, R. K. W. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 19, p. 43-47, 2006.

SMITH, R. K. W. Pathophysiology of tendon injury. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 2. ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011. cap. 68. p. 694-706

SMITH, R. K. W.; GOODSHIP, A. E. Tendon and ligament physiology. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine sports medicine and surgery: basic and clinical sciences of the equine athlete**. London: Saunders, 2004. cap. 8. p. 130-151.

STERGIOULAS, A.; STERGIOULA, M.; AARSKOG, R.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; BJORDAL, J. W. Excentric exercises in the treatment of recreational athletes with cronic achilles tendinopathy. **American Journal of Sports Medicien**, v, 36, n. 5, p. 881-887, 2008.

STOKES, M. B.; HUDKINS, K. L.; ZAHARIA, V.; TANEDA, S.; ALPERS, C. E. Up-regulation of extracellular matrix proteoglycans and collagen type I in human crescentic glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 59, p. 532-542, 2001.

TAYLOR, D. W.; PETRERA, M.; HENDRY, M.; THEODOROPOULOS, J. S. A systematic reiew of the use of platelet-rich plasma in sports medicine as a new treatment for tendon and ligaments injuries. **Clinical Journal of Sport Mdicine**, v. 21, n. 4, p. 344-352, 2011.

TUNÉR, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.

TUNÉR, J.; HODE, L. **The new LASER therapy handook**. Grängesberg: Prima Books AB, 2010. 847 p.

VAN SCHIE, H. T. M.; BAKKER, E. M.; JONKER, A. M.; VAN WEEREN, P. R. Efficacy computerized discrimination between structure-related and non-structure-related echoes in ultrasonographic images for the quantitative evaluatin of the structural integrity of superficial digital flexor tendons in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1159-1166, 2001.

VIDAL, B. C. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **MÍCRON**, v. 34, p. 423-432, 2003.

VIDAL, B. C. Métodos em biologia celular. In: VIDAL B. C.; MELLO, M. L. S. **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1987. p. 5-34.

VOGEL, K. G.; PULSSON, M.; HEINEGÅRD, D. S. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis the small proteoglycan of tendon. **The Biochemical Journal**, v. 223, p. 587-597, 1984.

VOLETI, P. B.; BUCKLEY, M. R.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon healing: repair and regeneration. **The Annual Review of 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 the American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 1515-1520, 2008.

WATANABE, T.; HOSAKA, Y.; YAMAMOTO, E.; UEDA, H.; SUGAVARA, K.; TAKAHASSHI, H.; TAKEHANA, K. Control of the collagen fibril diameter in the equine superficial digital flexor tendon in horses by decorin. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 9, p. 855-860, 2005.

WILLIAMS, I. F.; MCCULLAGH, K. G.; GOODSHIP, A. E.; SILVER, I. A. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. **Research in Veterinary Science**, v. 36, p. 326-338, 1984.

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

YONG—QING XU, ZHU-YI LI, LONG—JIANG WENG, MCI AN, KAI—YUN LI, SHAO—RONG CHEN, JIAN—XIN WANG, YU LU. The experimental study of the effects of helium—neon laser radiation on repair of injured tendon. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOTODYNAMIC THERAPY AND LASER MEDICINE, v. 1616, 1991, Beijing. **Proceedings SPIE**, 1993. p. 598-604.

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.

ZUFFOVA, K.; KRISOVA, S.; ZERT, Z. Platelet rich plasma treatment of superficial digital flexor tendon lesions in Racing Thoroughbreds. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 230-239, 2013.