

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

**EFEITO CLÍNICO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM LESÕES
CUTÂNEAS, TENDÍNEAS E LIGAMENTARES DE EQUINOS**

Santa Maria, RS, 2016

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

**EFEITO CLÍNICO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM LESÕES
CUTÂNEAS, TENDÍNEAS E LIGAMENTARES DE EQUINOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Flávio Desessards De La Côte

Santa Maria, RS, 2016

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira

**EFEITO CLÍNICO DA APLICAÇÃO DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM LESÕES CUTÂNEAS, TENDÍNEAS E
LIGAMENTARES DE EQUINOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**

Aprovado em 11 de março em 2016

Flávio Desessards De La Côte, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)

Daniel Curvello de Mendonça Muller, Dr. (UFSM)

Jarbas Francisco da Costa Castro Júnior, Dr. (Clínica Hípica)

Maria Andréia Inkelmann, Dra. (UNIJUÍ)

Santa Maria, RS, 2016

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por guiar meus caminhos;

À Universidade Federal de Santa Maria, pela excelência em graduação e pós-graduação que tive a oportunidade de realizar;

Ao meu orientador Prof. PhD Flávio Desessards De La Côte pela orientação, confiança e pela oportunidade de aprendizado nesses oito anos de convívio, e por permitir que eu assumisse, no período de doutorado, o concurso para docente no magistério superior na Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul – UNIJUI.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Karin Erica Brass, pelos ensinamentos, contribuição na elaboração dos trabalhos e confiança nesses anos de convivência;

À Maria, secretária do curso do PPGMV pela sua competência, organização e empenho todos os dias à disposição de nossos estudos e pesquisas

Ao Haras Doce Vale e a Fazenda Parceria Santa Maria pela disponibilização dos animais utilizados no estudo;

Ao meu pai Elbio “*in memorian*” pela educação, sabedoria, pelas cobranças sinceras que contribuíram de forma significativa na minha formação pessoal e pelos momentos felizes pelos quais passamos juntos;

À minha mãe Neyt por me proporcionar uma vida digna, pelo apoio em minhas decisões, pela amizade, companheirismo e amor em todos os momentos;

Ao meu noivo Gustavo Toscan, pelo carinho, apoio, aprendizado, incentivo e por estar ao meu lado em todos os momentos;

Aos meus amigos e colegas Marcos da Silva Azevedo, Camila Cantarelli e Miguel Gallio que não mediram esforços em ajudar na execução do trabalho e tornaram meus dias mais felizes pelas companhias, e aos demais amigos Fabiano da Rocha Trevisan, Gabriele Biavaschi da Silva, Grasiela De Bastiani, Stefano Dau e Diego Rafael pela amizade e pelos anos de convivência;

Aos amigos Aline da Rocha Vivian e Márcio Stanicki pela amizade, ajuda e acolhida nos anos de convívio.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO CLÍNICO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM LESÕES CUTÂNEAS, TENDÍNEAS E LIGAMENTARES DE EQUINOS

AUTOR: ROBERTA CARNEIRO DA FONTOURA PEREIRA

ORIENTADOR: FLÁVIO DESESSARDS DE LA CORTE

Santa Maria, 11 de março de 2016.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto obtido do sangue total, através de uma ou duas centrifugações, resultando em um pequeno volume deste plasma contendo elevado número de plaquetas e fatores de crescimento. Estes fatores de crescimento, provenientes dos α -grânulos plaquetários, são componentes importantes na homeostase de tecidos lesados, iniciando e regulando alguns estágios da cicatrização tecidual, por promover quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição de matriz extracelular. As tendinites e desmites são patologias caracterizadas pela degeneração de tendões e ligamentos. O mecanismo de degeneração tecidual destas estruturas é atribuído a fatores mecânicos, vasculares e inflamatórios. As lesões tendíneas e ligamentares comprometem a performance atlética de equinos e cursam com longos períodos de cicatrização, devido às características de composição histológica, anatômica e biomecânica destas estruturas. A cicatrização das feridas localizadas distais ao carpo ou tarso de equinos é geralmente complicada pela falta de tecido de revestimento, menor suprimento sanguíneo, baixa concentração de oxigênio nos tecidos e maior risco de contaminação bacteriana. Em muitos casos quando não tratadas adequadamente, as feridas poderão tornar-se crônicas, com crescimento exacerbado do tecido de granulação. Na presente tese, são apresentados estudos com equinos com a finalidade de avaliar o efeito clínico, do número de plaquetas em relação ao tempo de cicatrização e índice de recidivas da utilização do PRP associado à exercícios controlados no tratamento de lesões tendíneas e ligamentares, avaliados por meio do exame clínico e ultrassonográfico (CAPÍTULO 1). Neste estudo também foi avaliado o processo de cicatrização de feridas cirúrgicas experimentais, localizadas na região distal dos membros locomotores, tratadas com três métodos distintos de aplicação do PRP e avaliada através da evolução clínica e histopatológica. Objetivou-se determinar a melhor forma de aplicação do PRP em feridas cutâneas de equinos (CAPÍTULO 2). No capítulo 1, foram incluídos oito equinos, com idade média de 5 anos ($\pm 2,6$), diagnosticados com lesões em tendões e ligamentos, através da avaliação clínica e ultrassonográfica. Esses animais foram submetidos ao tratamento intralesional com PRP, guiado por ultrassonografia. Os animais diagnosticados com tendinite (4/8) tiveram escore das lesões de 2,3 ($\pm 0,57$)(escala 1 a 3), média da concentração plaquetária de 512.250 / μ l (± 144.965) e tempo médio de cicatrização de 262 dias (± 82) (tabela 2). Em contrapartida, os animais com desmite (4/8) no ligamento suspensório apresentaram escore das lesões de 2,6 ($\pm 0,57$)(escala 0 a 3), média da concentração plaquetária de 566.500 / μ l (± 97.722) e tempo médio de cicatrização de 120 dias (± 42) (tabela 3). Não foi observada correlação entre o número de plaquetas do PRP e o tempo de cicatrização das tendinites e desmites. A monitoração clínica e ultrassonográfica da resposta às injeções intralesionais de PRP, seguidas de programa de incremento gradual de exercício, permitiu que os cavalos retornassem à sua atividade atlética prévia sem recidiva das lesões.

No capítulo 2 foram utilizados oito equinos hípidos, com idade média de 8 anos ($\pm 3,76$), onde foram criadas quatro feridas cutâneas de 4 cm² de área, no aspecto dorsolateral do terceiro osso metacarpiano, duas no membro torácico esquerdo (A1 e A2) e duas no membro torácico direito (A3 e A4). As lesões cutâneas foram tratadas com três aplicações de PRP de acordo com o grupo estabelecido aleatoriamente. No grupo (G) I, as lesões cutâneas foram tratadas com infiltração de PRP nas bordas da ferida, no GII o PRP foi utilizado na forma gel sobre a área total da ferida, no GIII foi usado PRP homólogo e o GIV serviu como grupo controle (apenas aplicação de solução fisiológica) com infiltração nas bordas da ferida. Desta maneira, os quatro tratamentos foram aplicados nas 4 feridas de um mesmo animal. Para cada grupo de tratamento obtivemos oito repetições em regiões distintas nos membros torácicos, nos oito cavalos avaliados. No GII houve redução de 15 dias no tempo de cicatrização quando comparada às feridas do GIV. Na análise histopatológica o GII apresentou maior frequência de inflamação leve e neovascularização leve a moderada, nas biópsias 1 e 2. O GIV apresentou a maior intensidade de granulação das feridas entre os grupos avaliados. O PRP na forma gel, tanto na avaliação clínica como na histopatológica apresentou o melhor resultado na aplicação em feridas cutâneas no membro distal de equinos. O PRP homólogo também pode ser utilizado como terapia celular adjuvante na cicatrização cutânea de equinos.

Palavras-chave: PRP, lesões cutâneas, tendões, ligamentos, ultrassonografia.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

CLINICAL EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA ON CUTANEOUS, TENDINOUS AND LIGAMENT LESIONS IN HORSES

AUTHOR: ROBERTA CARNEIRO DA FONTOURA PEREIRA
ADVISER: FLÁVIO DESESSARDS DE LA CORTE
Santa Maria, March 11th, 2016.

Platelet rich plasma (PRP) is a product obtained from whole blood through one or two centrifugations, resulting in small volume of plasma containing high number of platelets and growth factors. The growth factors from the α -granules are platelet components that are important in the homeostasis of injured tissues beginning and regulating some stages of tissue healing, promoting chemotaxis, cell proliferation and differentiation, neovascularization and deposition of extracellular matrix. Wound healing of skin lesions distal to the carpus or tarsus of horses, usually are complicated by the reduced blood supply, low oxygen tension and increased risk of bacterial contamination. In many cases when wounds are not treated properly, they can become chronic with excessive formation of granulation tissue. Tendinitis and desmitis are pathologies characterized by degeneration of tendons and ligaments. The tissue degeneration mechanism of these structures is attributed to mechanical factors, vascular and inflammatory. Tendinitis and desmitis are common pathologies of equine athletes, these diseases tend to have long recovery periods, due to histological, anatomic and biomechanical features of tendons and ligaments. This thesis presents studies of 8 horses, in order to evaluate the clinical effect and the presence of recurrence lesions, of use of PRP and exercise controlled in the treatment of tendon and ligament injuries, through the clinical and ultrasonographic evaluation (CHAPTER 1), review by clinical and histopathological evolution the healing process of surgical wounds located at the distal region of forelimbs treated by three different methods of application of PRP (CHAPTER 2), and also determine the best form to PRP application to equine skin wounds (CHAPTER 2.) In Chapter 1, it included eight horses, with an average age of 5 years (± 2.6) diagnosed with injuries in tendons and ligaments, through clinical and ultrasonographic evaluation. These animals underwent treatment with intralesional PRP, guided by ultrasound. The animals μL diagnosed with tendonitis (4/8) had lesion scores of 2.3 (± 0.57) (score 1 to 3), mean platelet concentration of 512.250 / μL (± 144.965) and average healing time of 262 days (± 82) (Table 2). In contrast, animals with desmitis (4/8) in the suspensory ligament injuries had a score of 2.6 (± 0.57) (score 1 to 3), mean platelet concentration of 566.500 / μL (± 97.722) and average healing time 120 days (± 42) (table 3). In this study no correlation was found between the number of platelets in the PRP, and the time for healing of tendonitis and desmitis. Clinical and ultrasonographic monitoring of intralesional injections of PRP, followed by gradual increase of exercise program, allowed the horses to return to his previous athletic activity without recurrence of the lesions. In Chapter 2 we used

eight healthy horses, with an average age of 8 years (± 3.76), which were created four wounds of 4 cm² area in the dorsolateral aspect of the third cannon bone, two on the left forelimb (A1 and A2) and two on the right forelimb (A3 and A4) (figure 1). The cutaneous lesions were treated according to the established treatment group. In the same animal, each of the four wounds were assigned to one of four treatment groups at random, for each treatment group obtained eight replicates in different regions in the forelimbs (Figure 1). In the group (G) I, the skin lesions were treated with PRP infiltration of the wound edges, the GII PRP was used in gel form, the GIII was used homologous PRP and GIV as a control group (without PRP application). In the wounds treated with the GII was reduced to a fortnight in healing time compared the wounds treated with the GIV. Histopathology GII presented a higher frequency of mild inflammation and neovascularization mild to moderate in biopsies 1 and 2. The GIV had the highest intensity of granulating wounds between the groups. PRP in gel form, both in the clinical evaluation as the histopathology showed the best result in the application on wounds in the distal member of horses. The homologous PRP can also be used as adjuvant in equine wound healing.

Keywords: PRP, skin lesions, tendons, ligaments, ultrasound

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	16
Figura 2	18

CAPÍTULO 2

Figure 1	57
Figure 2	58
Figure 3	59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1	40
Table 2.....	41

CAPÍTULO 2

Table 1	54
---------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1.Ferida de membros em equinos	14
2.1.1. Morfologia do tecido tegumentar.....	15
2.1.2. Cicatrização cutânea em equinos.....	16
2.1.3. Tratamentos convencionais para cicatrização cutânea.....	19
2.2. Tendinites e desmites em equinos.....	19
2.2.1. Morfologia do tecido tendíneo e ligamentar.....	19
2.2.2. Etiologia das tendinites e desmites.....	21
2.2.3. Diagnóstico das tendinites e desmites.....	21
2.3.4. Cicatrização de tendões e ligamentos.....	22
2.3. Plasma rico em plaquetas.....	22
2.3.1. O que é o PRP?.....	22
2.3.2. O gel de PRP.....	23
2.3.3. Utilização do PRP na espécie equina.....	24
3. CAPÍTULO 1 - Effect of platelet-rich plasma in the treatment of tendonitis and desmitis in horses: Prospective study of eight clinical cases.....	25
ABSTRACT.....	26
RESUMO.....	27
INTRODUCTION.....	28
MATERIALS AND METHODS.....	29
RESULTS.....	32
DISCUSSION.....	33
CONCLUSIONS.....	35
BIOETHICS AND BIOSSECURITY COMMITTEE APROVAL.....	35
REFERENCES.....	36
4. CAPÍTULO 2 - Three different methods to use Platelet-rich plasma in the treatment of wound healing in equine distal limb.....	42
Summary.....	44
Introduction.....	45
Materials and methods.....	46
Results.....	50
Discussion.....	51
Conclusions.....	53
References.....	60
5. CONCLUSÃO.....	63
6.REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

As feridas cutâneas localizadas na porção distal dos membros (abaixo do carpo e tarso) são de ocorrência comum em equinos. Elas acontecem devido à fatores relacionados ao animal, como seu comportamento ativo, fatores relacionados ao ambiente, como instalações inadequadas e pastagens sujas, e fatores relacionados ao homem, como o manejo inadequado desta espécie animal (NETO, 2003).

As cicatrização de feridas cutâneas pode ser classificada em cicatrização de primeira intenção ou segunda intenção. A cicatrização por primeira intenção ocorre quando os bordos da ferida estão próximos e as feridas são classificadas como não contaminadas. A cicatrização de segunda intenção ocorre em feridas cujos bordos estão distantes e as feridas classificadas como contaminadas (após seis horas da lesão) (McGAVIN & ZACHARY, 2007).

Existem peculiaridades na cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas localizadas no membro distal quando comparadas a cicatrização de feridas localizadas no tronco de equinos. Isso ocorre devido à intensa inflamação tecidual observada nas feridas cutâneas localizadas nas extremidades distais que tem como consequência a formação excessiva de tecido de granulação acima dos bordos das lesões dificultando, desta forma, a retração cicatricial e tornando a cicatrização mais lenta nestas regiões anatômicas. Este aspecto constitui um desafio para o médico veterinário que elege, para determinados casos, a cicatrização por segunda intenção como método de tratamento, seja pelas condições locais e tempo decorrentes da lesão ou pela falta de tecido para cobertura na tentativa de sutura da lesão. BERRY & SULLINS (2003) afirmam que o menor suprimento sanguíneo, menor tensão de oxigênio, temperatura mais baixa e a presença de quantidades insuficientes de citocinas determinam os diferentes padrões de cicatrização entre as diversas regiões anatômicas do equino.

NETO (2003) cita a desnutrição, hipovolemia, hipotensão, hipóxia, hipotermia, infecção e o uso de medicamentos de ação anti-inflamatória, como fatores que podem retardar a reparação cutânea em equinos. O manejo inadequado no tratamento de feridas localizadas na porção distal dos membros de equinos pode resultar em uma complicação comum que é a formação de cicatriz exuberante. Fretz et al., (1983), consideraram a remoção cirúrgica a melhor opção para o tratamento do tecido de granulação exuberante, em pôneis, com leões nas regiões dorsal do terceiro metacarpiano e metatarsiano. A estética de uma cicatriz com granulação exacerbada pode ser motivo de depreciação comercial de cavalos destinados a julgamento morfológico, onde a sua integridade é fundamental na apresentação.

Os tendões e ligamentos, de cavalos atletas, quando submetidos a atividade de alto impacto, são susceptíveis a lesões devido a uma limitada capacidade de adaptação ao estresse contribuindo para o surgimento de degeneração progressiva. Dentre as lesões ligamentares, a de maior frequência é a desmíte do ligamento suspensório. Esta é uma importante causa de claudicação em equinos, seja ela primária ou compensatória, reduzindo o desempenho do animal (DOWLING et al., 2000; McCLURE et al., 2004). As lesões que afetam tendões e ligamentos podem chegar a um terço em equinos de esporte. Especificamente em cavalos de corrida, esta porcentagem pode chegar a 43%, sendo considerada a principal causa do afastamento de cavalos Puro-Sangue de Corrida, e maior casuística de lesões observadas no tendão flexor digital superficial (GOH et al., 2003; NIXON et al., 2008).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto obtido através da centrifugação de sangue autógeno, resultando em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e fatores de crescimento (VENDRAMIN et al., 2006). Este componente pode ser obtido mediante uma (MESSORA et al., 2009) ou duas centrifugações (VENDRAMIN et al., 2006; CARMONA, 2006; BARBOSA et al., 2008).

Dados da literatura relatam que o PRP, tem sido amplamente utilizado na medicina humana (SANCHEZ et al., 2007; SANCHEZ et al., 2012; GUERREIRO et al., 2015), na odontologia (MARX et al., 1998; JUNIOR et al., 2008) e na medicina veterinária (CARTER et al., 2003; CARMONA et al., 2007; ARGUELES et al., 2008; SCHNABEL et al., 2008; DE ROSSI et al., 2009; CARMONA & LÓPEZ, 2011; TORRICELLI et al., 2011; ROMAGNOLI et al., 2015) como uma terapia alternativa no tratamento de lesões em diferentes tecidos.

A presente tese teve como objetivo avaliar a utilização do PRP como ferramenta alternativa no tratamento de feridas no tecido cutâneo, tendíneo e ligamentar de equinos. No tecido cutâneo foi avaliada a possibilidade de uso de diferentes formas de aplicação do PRP em feridas cutâneas localizadas no membro distal de cavalos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Feridas de membro distal em equinos

Em equinos, lacerações de pele na região distal dos membros ocorrem com muita frequência devido ao comportamento ativo associado à realização de atividades atléticas, o que predispõem a lesões traumáticas. Barulhos e ruídos estranhos, tais como os causados por trovões, estrondos de motores ou bombas e disparos de armas de fogo, assustam os equinos e

fazem com que estes se atirem contra cercas e objetos, sem preservação de sua integridade física. Os arames constituem a causa mais comum de lacerações nos membros distais em equinos. A cicatrização das feridas localizadas nas extremidades distais de equinos, localizadas abaixo do carpo e do tarso, são geralmente complicadas pela falta de tecido de revestimento, menor suprimento sanguíneo, baixa concentração de oxigênio nos tecidos, movimento articular, maior risco de contaminação e desequilíbrio dos fatores de crescimento (DYSON, 1997; EVERTS et al., 2006). Em muitos casos onde as feridas não são tratadas adequadamente, estas poderão se tornar crônicas com crescimento exuberante de tecido de granulação, que ocorre devido à síntese de colágeno ser muito superior à lise e apoptose dos componentes celulares do tecido de granulação (SALDAMALACHIA, 2004). Muller et al., (2000), avaliaram o comportamento do crescimento de fibroblastos de equinos, da região do tronco em comparação com o crescimento de fibroblastos da região distal dos membros, e também compararam o crescimento de fibroblastos de pôneis, da região do tronco em relação com a região distal dos membros. Estes autores concluíram que existe um maior crescimento de fibroblastos na região distal dos membros de equinos, do que fibroblastos na região tronco. Houve também maior crescimento de fibroblastos na região distal dos membros, de equinos, quando comparado a qualquer região anatômica em pônies.

2.1.1 Morfologia do tecido tegumentar

A pele recobre toda a superfície do corpo e é o seu maior órgão. Ela exerce diversas funções como regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra diversos agentes do meio ambiente e funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). Ela é constituída por três camadas: epiderme (epitélio), derme e tecido subcutâneo (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa composta por três linhagens celulares diferentes: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo (HACKETT, 1978).

A epiderme está organizada em camadas e à medida que as mais superficiais são eliminadas, as mais profundas são restauradas por divisão celular. Ela é constituída por cinco camadas: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada germinativa é a mais profunda, fazendo limite com a derme, e a camada córnea é a mais superficial. A camada córnea, constituída por células escamosas, cheias de queratina, proporciona proteção contra traumas físicos e químicos. As várias camadas de queratinócitos intimamente unidos uns aos outros, formam uma barreira contra a invasão de microorganismos e água (PARKS, 1999).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. Nesta camada estão situados os anexos da pele, muitos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Ela é dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna. A derme é constituída de diferentes linhagens celulares como fibroblastos, macrófagos, mastócitos, leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) (HANSELKA, 1982). Esta camada fornece uma base firme para a epiderme e para os anexos cutâneos. As fibras colágenas proporcionam grande força de tensão e as fibras elásticas dão flexibilidade à pele. Os plexos vasculares fornecem sangue para a epiderme, sem penetrá-la. As camadas mais profundas da derme se misturam com o tecido subcutâneo, que por sua vez está frouxamente ligado à fáscia subjacente. Elementos epiteliais denominados glândulas e folículos pilosos se estendem para a derme e tecido subcutâneo (PARKS, 1999).

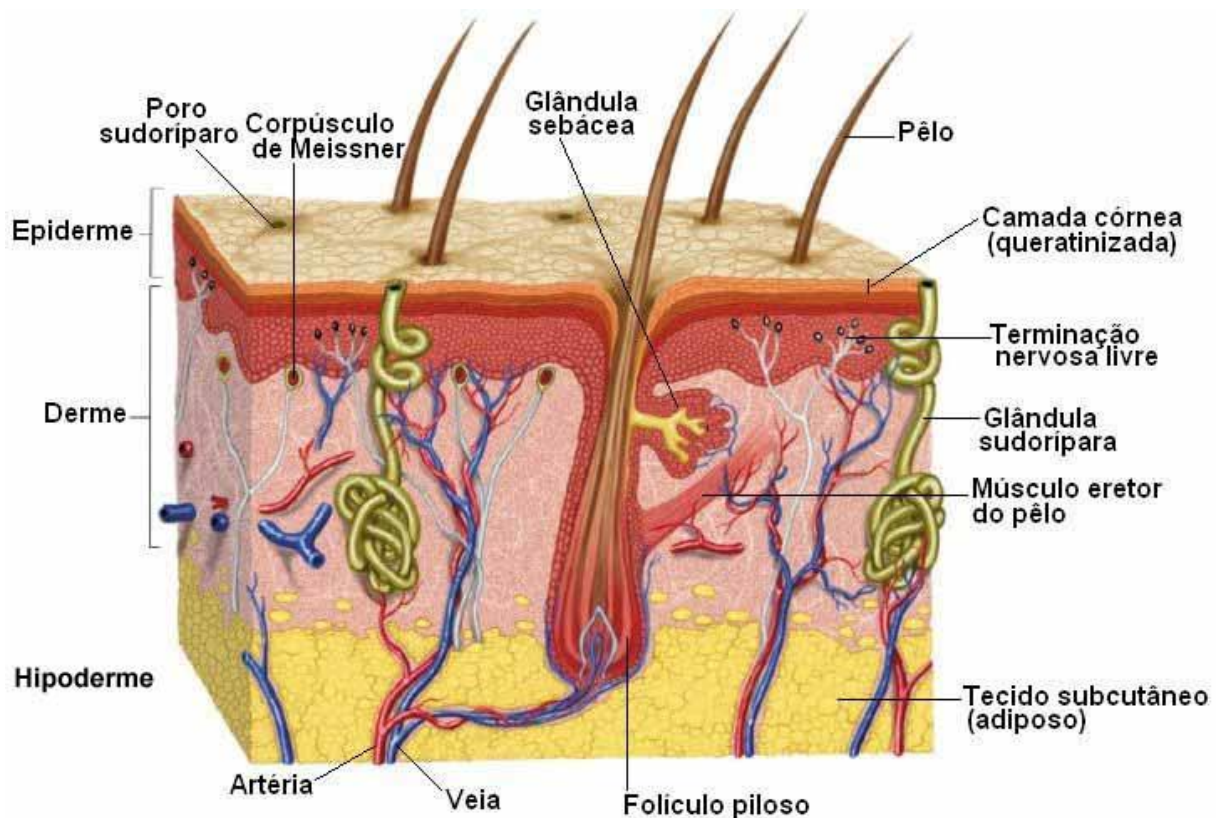


Figura 1- Imagem demonstrando a constituição da pele em três camadas: epiderme, derme e subcutâneo. FONTE: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004.

2.1.2 Cicatrização cutânea nos equinos

O reparo tissular envolve uma cascata de eventos, iniciada pela interação entre alguns tipos celulares, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular. A perfeita interação destes fatores determina a qualidade e a velocidade da cicatrização de uma lesão. Idade avançada, desnutrição, hipotensão, anemia, uso de pomadas a base de corticóides e diabetes são fatores que influenciam o processo de cicatrização após lesões traumáticas ou cirúrgicas (DE ROSSI et al., 2009). A cicatrização de feridas nas diferentes espécies animais é dividida nas fases de coagulação e inflamação, fibroplasia e remodelação.

A fase de coagulação tem início 5 a 10 minutos após o surgimento da lesão. Neste momento ocorre a vasoconstrição para minimizar a hemorragia. Logo após se inicia a fase inflamatória caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar estimulada por agentes quimiotáticos, permitindo a saída de células de defesa (leucócitos), plaquetas, fluidos e proteínas do sangue circulante, e chegada deste, ao foco da lesão. A formação do coágulo garante resistência e proteção à ferida (STASHAK, 2004).

A fase de proliferação é dividida em três subfases: re-epitelização, fibroplasia e neovascularização. Na re-epitelização ocorre a migração de queratinócitos não danificados das bordas dos anexos epiteliais quando a ferida é de espessura parcial, e apenas das margens epidérmicas em caso de feridas de espessura total. Os fatores de crescimento (FC) de transformação beta (TGF- β), FC derivado de plaquetas (PDGF) e o FC semelhante à insulina (IGF-1), são responsáveis pelo aumento de mitose e conseqüente hiperplasia do epitélio (MANDELBAUM & SANTIS, 2003).

A fibroplasia ocorre a partir da proliferação dos fibroblastos, que são células mesenquimais diferenciadas, que possuem a função de síntese de proteínas e substituição da matriz provisória (fibrina, fibronectina e hialuronato) por glicoproteínas, proteoglicanos, colágeno tipo III e por fim, colágeno tipo I (STASHAK, 2004). O FC TGF- β regula a proliferação de fibroblastos, estimula a deposição de matriz extracelular inibindo sua degradação (ROBERTS & SPORN, 1996).

A neovascularização fornece nutrientes e oxigênio para nutrir tecido em reparação. As plaquetas e os macrófagos liberam FC fibroblástico (FGF) e o FC vascular e endotelial (VEGF), que estimulam a atividade angiogênica de células endoteliais microvasculares na formação de uma rede de novos capilares. A nova rede formada se expande para o centro da lesão resultando na aparência rosada e exuberante (NETO, 2003).

O tecido de granulação é formado por vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos e produtos de fibroblastos, incluindo o colágeno, elastina, fibronectina, proteases, glicosaminoglicano sulfatado, glicosaminoglicano não sulfatado e macrófagos. Ele é produzido

três a quatro dias após a indução da lesão como um passo intermediário entre o desenvolvimento da malha formada por fibrina/fibronectina e a reestruturação de colágeno (BERRY & SULLINS, 2003). À medida que o fluxo sanguíneo e a oxigenação são restabelecidos, o principal fator desencadeador da angiogênese é reduzido e os vasos neoformados começam a diminuir (NETO, 2003).

Nas feridas que cicatrizam por granulação e fibroplasia, o fechamento ocorre por contração das paredes marginais da lesão. Esta ação é realizada pelos fibroblastos ativados que se diferenciam em miofibroblastos. Os miofibroblastos contêm fibras intracelulares de actina e miosina que formam conexões especializadas com a matriz extracelular e outras células dentro da cavidade da lesão. Os miofibroblastos aproximam as margens da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem. Se a integridade tecidual for reduzida, a contração pode ser insuficiente para fechar o defeito, resultando em granulação exuberante (STASHAK, 2004).

A fase final do processo cicatricial consiste na remodelação tecidual. Ao contrário das outras fases de cicatrização, a remodelação dos componentes do colágeno e matriz, como ácido hialurônico e proteoglicanos, persiste por longo tempo após o fechamento da ferida, é o período no qual os elementos reparativos da cicatrização são transformados em tecido maduro com características diferenciadas (NETO, 2003).

Existem particularidades na cicatrização cutânea da região do tronco de equinos quando comparada com feridas localizadas na região distal dos membros. Feridas abaixo do carpo e do tarso possuem a característica de produção excessiva do tecido de granulação, como exemplificado na figura 2, desta forma, quando a granulação quando excessiva torna-se uma complicação na cicatrização de feridas por segunda intenção. Isso ocorre devido ao desequilíbrio dos fatores de crescimento que regulam a síntese e degradação dos fibroblastos e colágeno, ocorrendo produção excessiva com inibição da apoptose destas células.

Jacobs et al., (1984), compararam a cicatrização de feridas no tronco e feridas na região distal dos membros, em ponies, observando diferente comportamento da cicatrização. As feridas localizadas no tronco, cicatrizaram mais rapidamente. O tecido de granulação exuberante é uma complicação frequente associada a cicatrização de feridas localizadas nos membros distais de equinos. A granulação consiste primariamente do desenvolvimento de vasos sanguíneos, fibroblastos e matrix extracelular (MILLER et al., 2000). Quando há produção excessiva do tecido de granulação, ele se projeta acima das margens da ferida dificultando a contração das bordas da ferida, tornando a re-epitelização lenta (WILMINK & WEEREN, 2005).



Figura 2- Tecido de granulação exuberante no membro posterior direito de um equino (Cortesia Dr. Flávio De La Corte- UFSM).

2.1.3 Tratamentos convencionais para cicatrização cutânea

A utilização de bandagens de algodão, pomadas tópicas a base de corticóides, substâncias químicas causticas e a excisão cirúrgica, são os tratamentos convencionais utilizados para controlar ou remover o tecido de granulação exuberante (LINDSAY, 1988). OLIVEIRA & ALVARENGA (1998) na busca de alternativas para o tratamento de lesões de pele em equinos, testaram a utilização de membrana amniótica preservada em glicerina. Esses autores observaram que houve supressão do tecido de granulação, associado a menor exsudação das feridas tratadas por esta membrana.

2.2 Tendinites e desmites em equinos

2.2.1 Morfologia do tecido tendíneo e ligamentar

Durante milhares de anos a espécie *Equus caballus* sofreu uma série de adaptações ao ambiente, havendo uma modificação no apoio dos membros, passando de cinco para apenas um dedo. Conseqüentemente, as estruturas dos tecidos moles da porção distal dos membros também sofreu grandes modificações. Acredita-se que com a evolução, o antigo músculo interósseo médio dos equinos tenha perdido tecido muscular e adquirido características de ligamento, passando a ser denominado de ligamento interósseo, ligamento suspensório ou ligamento sesamoideano superior (SCHWARZBACH et al, 2008).

O tendão é uma faixa espessa de tecido conjuntivo fibroso que age como um intermediário na ligação do músculo ao osso. Ele é composto por um tecido conjuntivo denso, regular e possui um arranjo específico que reflete as demandas mecânicas deste tecido (McILWRAITH, 2006).

O tendão é constituído de unidades estruturais organizadas sucessivamente em moléculas de colágeno, microfibrilas, subfibrilas, fibras e fascículos (KASTELIC et al., 1978). O arranjo organizado do tendão, bem como as ligações entre as moléculas de colágeno, fibrilas e fibras, é que lhe confere a capacidade de suportar elevadas cargas e transmiti-las dos músculos aos ossos. É importante ressaltar que a maior quantidade de matriz aumenta a resistência do tendão, mas não necessariamente melhora a sua função e o torna mais elástico (SMITH, 1998). Segundo RILEY (2004), forças de tensão sobre o tendão que causam aumento acima de 4% no seu comprimento (limite fisiológico) resultarão em lesão em um ou mais feixes de fibras. Ruptura completa pode ocorrer quando a tensão resulta em 8 a 12 % de extensão.

Para que as fibrilas de colágeno realizem suas funções, essas devem estar alinhadas em feixes paralelos ao longo do eixo principal de tensão. As células do tecido conjuntivo controlam essa orientação em parte pelo depósito de colágeno de forma orientada (ALBERTS et al., 2007).

O aporte de sangue para o tecido tendíneo pode ser proveniente do músculo ou do osso ao qual o tendão está unido, do mesotendão, da faixa da bainha sinovial ou do paratendão. Músculos e ossos fornecem 25% do aporte sanguíneo e apenas nas porções proximais e distais, sendo o paratendão o maior responsável pela irrigação das estruturas tendíneas (McILWRAITH, 2002).

Os fibroblastos são as células que constituem a maior porcentagem da matriz tendínea, são as células mais comuns do tecido conjuntivo. As células com intensa atividade de síntese são denominadas fibroblastos, enquanto as metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos. As células que formam o tendão são denominadas de tendinócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Os ligamentos são estruturas especializadas que ligam os ossos entre si, promovendo estabilidade das articulações, e servem de guia para o movimento articular. São formados por tecido conjuntivo denso compostos por fibras colágenas que fornecem alta resistência à tração (BENJAMIN & RALPHS, 1997). O ligamento suspensório (LS) dos equinos é composto de tecido conjuntivo e 2 a 11% de fibras musculares residuais (DYSON, 1997), o que pode explicar a variação na ecogenicidade das imagens do LS entre indivíduos durante exames ultrassonográficos. A presença de tecido conjuntivo frouxo situado ao longo do LS acomoda vasos e nervos (DYSON et al., 1997). O LS é composto por um sistema bilateral de fibras longas de colágeno, entrelaçadas em espiral e presas entre si por fibras cruzadas, que se separam distalmente nos ramos do LS. As fibras musculares vestigiais estão inseridas entre as fibras longas de forma semicircular. Esse arranjo estrutural proporciona amortecimento de forças resultantes de vibrações durante a dinâmica da locomoção, evitando efeitos nocivos (ROONEY, 1973). A distribuição de fibras musculares vestigiais no LS é simétrica entre membros torácicos e pélvicos de um mesmo indivíduo, mas variável entre equinos da mesma raça (GIBSON & STEEL, 2002). A proporção de fibras musculares não varia com a idade, mas existem opiniões divergentes quanto às mudanças em sua proporção em resposta à sequência de treinamento (DENOIX, 1994; DYSON et al., 1995; REEF, 1998).

A principal função dos ligamentos é prevenir movimentos excessivos ou anormais, além de manter a estabilidade das articulações pela sua função proprioceptiva (BENJAMIN & RALPHS, 1997). Segundo sua localização os ligamentos podem ser intracapsulares ou extracapsulares. Os ligamentos intracapsulares (intra-articulares) são encontrados dentro das articulações e são rodeados pela membrana sinovial. Os ligamentos extracapsulares (periarticulares) são externos à cápsula articular (DYCE et al., 1997; FRANDSON et al., 2005).

2.2.2 Etiologia das tendinites e desmites

As lesões de tendões flexores de equinos representam um dos maiores desafios para o monitoramento clínico e emissão de prognóstico, pois ocorrem em diversas estruturas flexoras colágenas, tanto nos membros torácicos como nos pélvicos, com predileção para o tendão do músculo flexor digital superficial em cavalos Puro Sangue de Corrida. Os diferentes locais lesados e a análise da distribuição de cargas entre as estruturas flexoras nos diferentes tipos de exigência, em associação à demanda locomotora específica, explicam essa diferença. Fatores extrínsecos como a conformação, idade do animal, nível de treinamento e tipo de ferradura, também estão implicados na etiopatogenia destas lesões (FACKELMAN, 1973).

A atividade atlética de alta exigência e repetitiva pode levar, em alguns casos, a lesões severas no tecido tendíneo. Tais lesões podem ser resultantes de uma sobrecarga única, onde a magnitude da força exigida excede à resistência máxima das fibras, ou ainda de um acúmulo de microlesões, que aumentam a cada ciclo de carga, levando à ruptura da estrutura tendínea. Estas lesões nas estruturas colágenas flexoras dos equinos resulta em alta morbidade, e sua resolução frequentemente se depara com a impossibilidade de restauração completa da estrutura e função.

A arquitetura tecidual alterada e, conseqüentemente a função biomecânica anômala, leva ao comprometimento da futura performance do animal e predispõe a elevado risco de recidivas, gerando perdas econômicas, principalmente em se tratando de animais atletas. A ocorrência de enfermidade nos tendões flexores digitais de cavalos de corrida em treinamento é estimada em 30% e, embora tenham ocorrido avanços na prática ortopédica nos últimos anos, a ocorrência destas patologias tendíneas, bem como a eficácia do tratamento pouco se alteraram (ALVES, 1998).

2.2.3 Diagnóstico das tendinites e desmites

O exame clínico é fundamental no diagnóstico de patologias de tecidos moles em equinos. Os sinais clínicos frequentemente apresentados por animais acometidos por tendinites e desmites são: claudicação, edema e aumento de volume do tendão ou ligamento acometido. O exame de palpação deverá ser realizado com o membro do animal em posição flexionada. Durante a palpação se observa aumento de volume da estrutura lesionada, aumento da temperatura local (em lesões agudas), sensibilidade a palpação e em caso de lesões crônicas e extensas, localiza-se fibrose tendínea (McILWRAITH, 2002).

A ultrassonografia é uma técnica de diagnóstico por imagem que auxilia a detecção e o acompanhamento de lesões que afetam o aparelho locomotor de equinos. Esta técnica permite determinar o local exato da lesão, e quantificar a extensão e a intensidade da mesma, além de possibilitar o monitoramento do processo de reparação tecidual durante o período de tratamento (MARR et al., 1993). Segundo WRIGLEY (2006) são necessárias imagens de alta resolução, particularmente para a identificação de lesões discretas, visto que tendões e ligamentos são estruturas relativamente pequenas. DE BASTIANI et al. (2014), mostraram a correlação positiva existente entre os achados ultrassonográficos e histopatológicos no diagnóstico de patologias de tecidos moles e ósseos na região articular e periarticular da articulação metacarpofalangeana.

2.2.4 Cicatrização de tendões e ligamentos

As tendinites e a desmites resultam na diminuição de desempenho, reabilitação prolongada e aposentadoria precoce dos equinos. O longo período de reabilitação dos animais acometidos, tem sido atribuído a baixa vascularização dos tendões (BOSCH, et al 2011). Atualmente, se busca métodos de tratamento que induzam a regeneração tecidual, ou seja, a restauração da arquitetura estrutural normal e função biomecânica dos tendões e ligamentos, na tentativa de aumentar o potencial da cicatrização (RIDERMANN et al., 2010). Vários tratamentos descritos tem como objetivo diminuir a inflamação, restaurar a estrutura e a função normal do tendão minimizando a formação de aderências e evitando possíveis recidivas. Mesmo quando a cicatrização ocorre de forma adequada, existe a possibilidade de reincidência da lesão (McILWRAITH, 2002; BOSCH et al., 2011).

2.3 Plasma rico em plaquetas (PRP)

2.3.1 O que é o PRP?

O PRP é um concentrado de plaquetas obtido por meio de uma metodologia simples, com boa relação custo/benefício para se obter altas concentrações de fatores de crescimento com propriedades regenerativas (ANITUA, 1999).

O PRP apresenta em sua composição plasma, leucócitos e plaquetas. No plasma estão contidos diversos fatores de coagulação (GOLDBERG, 1997), os leucócitos que conferem resistência natural aos agentes infecciosos e imunológicos, e as plaquetas ao sofrerem degranulação nos locais de lesão liberam FC (MARX & GARG, 1999). Pelo menos sete FC são derivados dos grânulos plaquetários: PDGF, TGF- β_1 , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento hepatócito (HGF) (GIANNOBILE, 1999).

Os fatores de crescimento (FCs) são polipeptídeos específicos, presentes no plasma e em alguns tecidos, que regulam a diferenciação e a proliferação celulares e, portanto, a regeneração dos tecidos. Os FC podem ter ação parácrina, endócrina ou autócrina, e seu estímulo é transmitido via receptores de superfície de membrana, que ativam proteínas reguladoras no citoplasma, gerando respostas através da indução da expressão de genes (MARX, 2004). Eles promovem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular,

neovascularização e deposição de matriz extracelular (EVERTS et al., 2006; FOSTER et al., 2009; PORCELINI, 2009).

Segundo BARBOSA et al. (2008) o número final de plaquetas no PRP depende da contagem inicial no sangue total do animal, de forma que quanto maior o número inicial, mais rico em plaquetas será o PRP. Dessa forma, a presença de trombocitopenia é um fator limitante para a obtenção da concentração adequada de plaquetas. Animais que apresentam esta condição no hemograma não são indicados para terapia com o PRP de forma satisfatória, logo outras fontes de plasma e plaquetas devem ser investigadas. LEMOS et al. (2002) consideram adequado um número superior a 1.000.000 de plaquetas/ μL . Já outros autores sugerem que o PRP deve conter concentrações de plaquetas três a cinco vezes maiores que os níveis fisiológicos (GONSHOR, 2002; KEVY & JACOBSON, 2004). Pouca atenção tem sido dada à uma possível influência da contagem de plaquetas no PRP ou a concentração de fatores de crescimento em relação a uma eficácia maior nas concentrações mais altas.

2.3.2 O gel de PRP

Inicialmente o gel de PRP era produzido pela adição da trombina bovina ao concentrado de plaquetas. Entretanto, com o objetivo de facilitar sua obtenção e reduzir os custos, a trombina bovina foi substituída pela trombina autógena (KEVY & JACOBSON, 2004). A trombina autógena é uma variação na formulação do concentrado plaquetário obtido através da adição do gluconato de cálcio. Esta mistura quando exposta a temperatura de 37°C , ativa o sistema de coagulação, resultando na degranulação dos fatores de crescimento plaquetários e gelificação do PRP, formando um gel que facilita sua aplicação em diversas cirurgias (LIEBERMAN et al., 2002; EFEOGLU et al., 2004; VENDRAMIN et al., 2006; DE ROSSI et al., 2009).

O gel de PRP tem sido utilizado pela facilidade de aplicação, elevada aderência no local da lesão servindo como tampão hemostático. Além disso, o gel reúne uma variedade de fatores de crescimento, que favoreceram a diferenciação condrogênica (WILKE et al., 2007).

2.3.3 Utilização do PPR na espécie equina

Na medicina veterinária equina o uso do PRP é descrito para o tratamento de feridas (CARTER et al., 2003; DE ROSSI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009), queimaduras (MACIEL et al., 2012), tendinites e desmites (MAIA et al., 2009; SCHNABEL et al., 2007; TORRICELLI et al., 2011; ROMAGNOLI et al., 2015), osteoartrites (CARMONA et al., 2007)

e na cicatrização de fraturas (CARMONA & LOPEZ, 2011). Muitos destes relatos se limitam a casos clínicos isolados com reduzido número de animais tratados, sem o devido uso do método científico para analisar a escolha da terapia frente à lesão, a considerar efeitos sinérgicos de outras terapias usadas em conjunto, da ausência de um grupo controle para comparar os eventos na ausência do PRP.

3. CAPÍTULO 1

Trabalho submetido para publicação:

Effect of platelet-rich plasma in the treatment of tendonitis and desmitis in horses: Prospective study of eight clinical cases

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, Flávio Desessards De La Corte

CIÊNCIA RURAL, 2016

1 **Effect of platelet-rich plasma in the treatment of tendonitis and desmitis in horses:**

2 **Prospective study of eight clinical cases**

3 **Efeito do plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinites e desmites em cavalos:**

4 **Estudo prospectivo de oito casos clínicos**

5
6 **Roberta Carneiro da Fontoura Pereira^{I*} Camila Cantarelli^I Grasiela De Bastiani^I**

7 **Marcos da Silva Azevedo^{II} Diego Rafael Palma da Silva^{II} Karin Erica^{III} Flávio**

8 **Desessards De La Côte^{III} José Antonio Gonzalez da Silva^{IV}**

9
10 **ABSTRACT**

11 This study aimed to evaluate the clinical effect of autologous PRP, obtained by manual
12 method with double centrifugation, and applied by intralesional ultrasound-guided injection in
13 horses's tendons and ligaments. Eight horses were included in this study: four horses with
14 tendonitis (two superficial digital flexor tendons and two deep digital flexor tendons) and four
15 horses with suspensory ligament desmitis. Horses were diagnosed following clinical and
16 ultrasonographic evaluation. Three applications of PRP were performed every 15 days. Horses
17 diagnosed with tendonitis had an average injury score of 2.3 (± 0.57) and average healing time
18 of 262 days (± 82). Horses diagnosed with suspensory ligament desmitis had a mean injury score
19 of 2.6 (± 0.57) and average healing time of 120 days (± 42). Platelet concentration of the blood
20 used for preparation of PRP from the horses with tendonitis ranged from 120.000 to 180.000/ μ l
21 ($144.250 \pm 25.539/\mu$ l) and platelet concentration of the PRP ranged from 406.000 to 720.000/ μ l
22 ($512.250 \pm 144.965/\mu$ l). In horses with desmitis, the concentration of platelets in the whole

^I Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: betacfp@hotmail.com.br *Corresponding author

^{II} Médico Veterinário Autônomo, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III} Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV} Departamento de Estudos Agrários, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Ijuí, RS, Brasil.

1 blood used for autologous PRP preparation ranged from 127.000 to 158.000/ μ l (140.250 \pm
2 13.149/ μ l) and platelet concentration in the PRP ranged from 513.000 to 713.000/ μ l (566.500
3 \pm 97.722/ μ l). No correlation was found between the number of platelets in the PRP and the
4 healing time of injuries. Clinical evaluation and ultrasonographic images used to monitor
5 healing showed that intralesional PRP injections followed by a program of gradually increasing
6 exercise resulted in horses returning to their previous athletic activities without recurrence of
7 lesions.

8 **Keywords: PRP, equine, suspensory ligament, tendon.**

9

10 **RESUMO**

11 Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito clínico do PRP autólogo, obtido pelo
12 método manual com centrifugação dupla e aplicado por injeção intralesional, guiada por
13 ultrassonografia, em tendões e ligamentos de cavalos. Oito cavalos foram incluídos neste
14 estudo: quatro cavalos com tendinite (dois tendões flexores digitais superficiais e dois tendões
15 flexores digitais profundos) e quatro cavalos com desmite do ligamento suspensório. Os
16 animais foram diagnosticados através de avaliação clínica e ultrassonográfica. Três aplicações
17 de PRP foram realizadas a cada 15 dias. Cavalos diagnosticados com tendinite tiveram um
18 escore médio de lesão de 2.3 (\pm 0.57) e média de tempo de cicatrização de 262 dias (\pm 82).
19 Cavalos diagnosticados com desmite do ligamento suspensório tiveram um escore médio de
20 lesão de 2.6 (\pm 0.57) e tempo médio de cicatrização de 120 dias (\pm 42). A concentração de
21 plaquetas no sangue usado para preparação do PRP dos animais com tendinite variou de
22 120.000 à 180.000/ μ l (144.250 \pm 25.539/ μ l) e concentração de plaquetas no PRP variou de
23 406.000 à 720.000/ μ l (512.250 \pm 144.965/ μ l). Em cavalos com desmite, a concentração de
24 plaquetas no sangue usado para preparação do PRP variou de 127.000 à 158.000/ μ l (140.250 \pm
25 13.149/ μ l) e concentração de plaquetas no PRP variou de 513.000 à 713.000/ μ l (566.500 \pm

1 97.722/ μ l). Neste estudo não foi observada correlação entre o número de plaquetas do PRP e o
2 tempo de cicatrização das lesões. A monitoração clínica e ultrassonográfica das injeções
3 intralesionais de PRP, seguidas de programa de incremento gradual de exercício, permitiu que
4 os cavalos retornassem a sua atividade atlética prévia sem recidiva das lesões.

5 **Palavras-chave:** PRP, equino, ligamento suspensório, tendão.

6

7 INTRODUCTION

8 The tendon is a thick band of fibrous connective tissue that acts as a link connecting
9 muscle to bone. They are composed of a dense, regular connective tissue and have a specific
10 fiber arrangement that reflect the mechanical demands of this tissue (McILWRAITH, 2002).

11 The suspensory ligament (SL) consist of striated muscle, loose areolar connective tissue,
12 connective tissue fibers, blood vessels, and nerves (HAUSER et al., 1984). The SL is typically
13 described as consisting of three sections, the proximal region, body and branches. All three
14 regions can be injured in any horse breed resulting in decreased performance and early
15 retirement (KASASHIMA et al., 2004; DABAREINER et al., 2005). Suspensory ligament
16 desmitis is a common injury in athletic horses. When affecting the proximal region, at the
17 ligament insertion on the palmar/plantar aspect of the cannon bone, the inflammation of the SL
18 predisposes to avulsion fractures in the proximal-palmar region of the third metacarpal bone
19 (HILL et al., 2001). Desmitis normal healing requires a large convalescent period, ranging from
20 three to nine months (DYSON & GENOVESE, 2003), many times with a less to guarded
21 prognosis.

22 The conservative treatment of tendonitis and desmitis included an initial period of rest
23 followed by a gradually increasing controlled exercise routine. Other therapies such as
24 nonsteroidal anti-inflammatory drugs, bandaging, counter-irritants, intralesional injections of
25 polysulphated glycosaminoglycans, hyaluronan, tendon/ligament splitting, and extracorporeal

1 shock wave therapy may also be used (SMITH et al., 2006). However, the poor healing capacity
2 of tendons and ligaments is a problem to be solved in athletic horses. The impaired healing of
3 tendon tissue has been attributed to a low number of residing cells in relation to the extensive
4 volume of extracellular matrix and to a relatively poor vascularization (SCHNABEL et al.,
5 2007; MAIA et al., 2009; BOSCH et al., 2010). Recently, regenerative medicine based on
6 growth factors and cell therapy has been used to improve the quality and speed of tendon and
7 ligament healing (TORRICELLI et al., 2011).

8 Platelet-rich plasma (PRP) is a promising therapy that has been used for tendonitis
9 (MAIA et al., 2009) and desmitis (SCHNABEL et al., 2007; WASELAU et al., 2008;
10 ROMAGNOLI et al., 2015) treatment in horses. The increasing interest in PRP treatment
11 resides on the fact that PRP contains various growth factors that are important for restoration
12 of tissue architecture, because of its mitogenic, chemotactic and neovascular action and its
13 higher deposition of extracellular matrix. Therefore, PRP, derived from whole blood, must
14 contain three to five times more platelets than physiologic levels, which in horses may vary
15 from 100.000 to 350.000 platelets/ μ L (MARX et al., 1998).

16 The objectives of this report were to describe the possible beneficial effect and clinical
17 safety of autologous PRP, obtained using a manual method with double centrifugation, and
18 applied by intralesional ultrasound-guided injection in horses with musculoskeletal soft tissue
19 lesions. Horses were followed up and monitored for recurrence of lesions.

20

21 **MATERIAL AND METHODS**

22 **Case selection criteria**

23 Eight horses were included in this study: two horses with forelimb tendonitis of the
24 superficial digital flexor tendon (SDFT), two with forelimb tendonitis in the deep digital flexor
25 tendon (DDFT), one with forelimb desmitis in the proximal SL, one with hindlimb desmitis in

1 the medial and lateral branches of the SL, and two horses with forelimb desmitis of the medial
2 branches of the SL (table 1). Horses were diagnosed after clinical and ultrasonographic
3 evaluation when referred to the Veterinary Teaching Hospital of the Federal University of Santa
4 Maria (UFMS), Brazil. The inclusion criteria in this study were: lameness grade 1 to 4/5
5 (AAEP, 1991) in the forelimbs or hindlimbs; ultrasound identification of echogenicity,
6 architecture, size and shape alterations in the flexor tendons or SL; and successful diagnostic
7 anaesthesia of the palmar/plantar region of the third metacarpal/metatarsal bone, if necessary
8 to diagnostic these injuries.

9

10 **Clinical and ultrasound evaluations**

11 The clinical evaluation was performed before each PRP application. The presence of
12 swelling, increased local temperature and pain were assessed by palpation.

13 Ultrasound scans (US) were made with a portable Pie Medical machine, equipped with
14 a 7.5-MHz linear probe to confirm tendonitis or desmitis. The hypoechogenicity and loss of
15 collagen fiber parallelism are considered abnormalities of these structures (GENOVESE et al.,
16 1986).

17 As described by ROMAGNOLI et al. (2015), a complete examination was performed
18 doing transverse and longitudinal scans after routine clipping, and careful comparison with the
19 healthy contralateral limb was carried out. Lesions were measured by tracing the circumference
20 of each core lesion on transverse scans. Core lesion cross-sectional area was calculated as a
21 percentage of the total cross-sectional area of the flexors tendon (FT) or SL.

22 Measurement of the damaged percentage was calculated by measurement of the total
23 lesion area divided by the total area of the tendon/ligament multiplied by 100 (expressed in %).

24 Lesions also were graded from 1 to 3 using the modified score proposed by GENOVESE &

1 RANTANEN (1990), where **1** = core lesion of $\leq 25\%$, **2** = core lesion between 50 to 75%, and
2 **3** = core lesion of $\geq 75\%$.

3

4 **Obtaining platelet-rich plasma**

5 The manual method utilized to obtain PRP was previously described by PEREIRA et al.
6 (2013). For this purpose, 450ml of blood were collected from each animal by puncturing the
7 external jugular vein using a commercial blood-transfusion bag containing citrate-phosphate-
8 dextrose solution with adenine as an anticoagulant (CPDA-1; 63mL for 450ml of blood).

9 From each collection, PRP was obtained from 100ml of whole blood aspirated from
10 the blood bag and distributed in three falcon type polypropylene 50ml-tubes (30ml of blood in
11 one tube and 35ml in the two other ones). Tubes were centrifuged the first time at 224g during
12 10 minutes to separate the plasma from the mist zone (phlogistic layer containing leukocytes)
13 and red blood cells. The supernatant containing the platelet-rich plasma was transferred to a
14 second falcon tube and again centrifuged at 440g for 10 minutes. After the second
15 centrifugation, the plasma supernatant was discarded, and only 10 ml of PRP were preserved,
16 representing 10% of the initial total blood volume. The whole protocol of manually processing
17 PRP was done in a laminar flow cabinet to prevent contamination.

18

19 **Protocol for PRP treatments**

20 The animals diagnosed with tendonitis/desmitis were treated with three PRP
21 applications every 15 days as recommended by CARMONA (2006), except horse 1 and 2 that
22 received only one application (Table 2).

23 Before each treatment, the area to be injected was clipped and aseptic prepared using
24 iodine povidone and 70% alcohol. All horses were sedated with an association of 10% xylazine
25 (1mgkg^{-1}) and butorfanol tartarate (0.02mgkg^{-1}) intravenously. A 7.5 MHz linear ultrasound

1 probe was covered with a sterile glove to perform the ultrasound-guided intralesional PRP
2 injections using 24G x 3/4" needles (ROMAGNOLI et al., 2015). The PRP volume used was
3 calculated in accordance with the extent of the lesions ranging from 1 to 2.5ml (MAIA et al.,
4 2009).

5

6 **Exercise protocol**

7 The animals were submitted to a gradually increasing exercise program that began five
8 days after the first PRP application (MAIA et al., 2009). Exercise intensity or duration was
9 increased based on the healing progress assessed through ultrasound. The exercise protocol
10 exercise was performed according McILWRAITH (2002) at the farms where the horses came
11 from.

12

13 **Statistical analysis**

14 Descriptive statistical analysis of the behavior of the variables was performed for: the
15 lesion scores, platelet number of blood, platelet number of PRP and healing time. Platelet
16 number of PRP and healing time were transformed in a log normal distribution ($x + 1$) and
17 tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test ($p = 0.15$). Pearson correlation was
18 used to evaluate platelet number of PRP and healing time ($P < 0.05$).

19

20 **RESULTS**

21 Ultrasound evaluations were performed to determine the score and progression of
22 tendon and ligament injuries, establishing the time for healing to occur, which was
23 characterized by complete alignment and parallelism of collagen fibers. Horses diagnosed with
24 tendonitis in the first assessment at the clinic had an average injury score of 2.3 (± 0.57) and
25 average healing time of 262 days (± 82). Horses diagnosed with desmitis had a mean 2.6 injury

1 score (± 0.57) and average healing time of 120 days (± 42). We observed no correlation between
2 healing time and injury scores.

3 The platelet concentration in the whole blood used for preparation of PRP of the animals
4 with tendonitis ranged from 120.000 to 180.000/ μl ($144.250 \pm 25.539/\mu\text{l}$) and platelet
5 concentration in the processed PRP ranged from 406.000 to 720.000/ μl ($512.250 \pm 144.965/\mu\text{l}$)
6 (Table 2). In horses with desmitis, the concentration of platelets in the whole blood used for
7 animal PRP preparation ranged from 127.000 to 158.000/ μl ($140.250 \pm 13.149/\mu\text{l}$) and platelet
8 concentration in the processed PRP ranged from 513.000 to 713.000/ μl ($566.500 \pm 97.722/\mu\text{l}$)
9 (Table 3). There was no correlation between the number of platelets in the PRP and the healing
10 time in animals with tendon and ligament injuries, with a 95% confidence interval ($P>0.05$).
11 After PRP applications, animals were monitored for three days in order to detect an eventual
12 increase in lameness, local reactions and infections at the application sites. None of the eight
13 treated horses showed any evidence of such changes and no horse had recurrence of the injury.
14 Healing time of tendonitis or suspensory ligament desmitis was not influenced by the platelet
15 count in the manually processed PRP.

16

17 **DISCUSSION**

18 This paper described the diagnostic and clinical outcome of tendon and ligament
19 disorders in eight clinical cases treated with local PRP injection. There is a wide range of
20 possibilities to treat tendonitis and desmitis in horses, varying from conservative approaches to
21 modern cellular therapy. Conservative treatment is usually based on the use of systemic or local
22 non-steroidal anti-inflammatories drugs associated with stall rest, followed or not by some
23 degree of exercise activity (SMITH et al., 2006). The slow healing of tendons and, in most
24 cases, the resulting formation of mechanically inferior extracellular matrix are probably due to
25 the fact that the tendon is a minimally vascularized tissue, presents cells that exhibit reduced

1 mitotic activity, and fewer progenitor cells in the tissue (SCHNABEL et al., 2007). It is
2 reasonable to believe that there is an important difference when comparing clinical with
3 experimentally induced tendonitis/desmitis. More recently, GUERCIO et al. (2015) in an
4 experimental study, used PRP associated with stem cells to repair lesions in the SDFT of nine
5 horses. These authors observed that horses returned to exercise 6 months after treatment.

6 The Criollo horses of our study, with SL desmitis showed similar results as far as
7 average time (120 ± 48 days) of complete lesion healing compared to Thoroughbreds according
8 to the cases published by WASELAU et al. (2008), and Standardbred racehorses presented by
9 TORRICELLI et al. (2011). ROMAGNOLI et al. (2015) have studied the respost of
10 intralesional injection PRP in twenty sport horses with proximal SL desmitis and supports the
11 treatment, observing a good to excellent prognosis for returning to sport activity (12-24 weeks).

12 PRP is a novel and promising therapy modality that has been widely used in veterinary
13 medicine for the treatment of bone and soft tissue injuries (CARMONA, 2006). It is considered
14 the low cost and easiness to obtain the product through different centrifugation protocols
15 (VENDRUSCULO et al., 2012). The manual protocol to prepare PRP used in the present study
16 was evaluated by PEREIRA et al. (2013) and allowed the gaining of high platelet concentrations
17 ($539.375 \pm 118067/\mu\text{l}$). According to ANITUA et al. (2004), concentrations above 300.000
18 platelets/mL are enough for a true PRP preparation. An in vitro study on segments of the SDFT
19 of horses was conducted by SCHNABEL et al. (2007). Those authors showed an anabolic PRP
20 effect on the synthesis of the tendinous matrix using an average concentration of 395.000
21 platelets/ μl .

22 PRP treatment is considered one of the cell therapy modalities because it promotes a
23 decrease in tendonitis recurrence rates due to a stimulus mediated by growth factors that
24 enhances collagen fiber extracellular matrix deposition (MAIA et al., 2009; MISHRA et al.,

1 2009). This is the possible explanation for the absence of recurrence in our PRP-treated horses
2 (ROMAGNOLI et al., 2015).

3 Controlled exercise is paramount for tendon and ligament healing because it favors type-
4 I collagen formation in a more organized and homogenous way, avoiding adhesion formation
5 in the peritendineous or ligament tissues and recurrence of lesions. Recurrence of lesions is the
6 most likely complication once tendon and ligament injuries have healed and they probably
7 occur due to inadequate deposition of extracellular matrix or inadequate management of the
8 exercise program (SHARMA, 2005; SMITH, 2011).

9 A limitation of the present study was that the clinical cases presented were not matched
10 by control horses and all physical activity was monitored by owners and trainers; however, to
11 the authors knowledge, this is the first study evaluating clinical results of PRP obtained by a
12 double manual centrifugation protocol, in the treatment of tendinopathies and SL injuries. There
13 is a need for a larger clinical trial, with both controls and treated horses undergoing clinical
14 evaluation, ultrasound and histopathologic analysis, after treatment with PRP injection in
15 flexors tendons and SL.

16

17 **CONCLUSIONS**

18 Intralesional PRP injections followed by a program of gradually increasing exercise
19 allowed horses to return to their previous athletic activities without recurrence of lesions,
20 independent of injury score, in the flexors tendons and suspensory ligaments.

21

22 **BIOETHICS AND BIOSSECURITY COMMITTEE APPROVAL**

23 Ethics Committee for the Use of Animals of Universidade Federal de Santa Maria has
24 approved the methods employed in this study (protocol 110/2013).

25

1 REFERENCES

- 2 AAEP. Guide for veterinary service and judging of equestrian events. American Association of
3 Equine Practitioners, Lexington, KY. 1991. 149p.
- 4 ANITUA, E. et al. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration.
5 **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, n.1, p.4–15, 2004. Available from:
6 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691563>>. Accessed: Jan. 18, 2016. doi:
7 10.1160/th03-07-0440.
- 8 BOSCH, G. et al. The propagation of induced tendon lesions in the equine superficial digital
9 flexor tendon: an ex vivo study. **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.5, p.407-411, 2010.
10 Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20636776>>. Accessed: Nov. 23, 2015.
11 doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00099.x.
- 12 CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of**
13 **musculoskeletal injuries in the horse**. 2006. 91f. Tesis (Doctorado en Medicina y Sanidad
14 Animales) - Universita Autònoma de Barcelona.
- 15 DABAREINER, R.M. et al. Musculoskeletal problems associated with lameness and poor
16 performance among horses used for barrel racing: 118 cases (2000-2003). **Journal American**
17 **Veterinary Medical Association**, v.227, n.10, p.1646-1650, 2005. Available from:
18 <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2005.227.1646?journalCode=javma>>.
19 Accessed: Jan. 18, 2016. doi: 10.2460/javma.2005.227.1646.
- 20 DYSON, S.J.; GENOVESE, R.L. The suspensory apparatus. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J.
21 **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 1st.ed. St. Louis, Missouri: Saunders,
22 2003. p.654–666.
- 23 GENOVESE, R.L. et al. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. **Veterinary Clinics of**
24 **North America: Equine Practice**, v. 2, n.1, p.145–226, 1986.

- 1 GENOVESE, R.L.; RANTANEN, N. Clinical experience with quantitative analysis of
2 superficial digital flexor tendon injuries in thoroughbred and standardbred racehorses.
3 **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 6, n.1, p.129-145, 1990.
- 4 GUERCIO, A. et al. Mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat and platelet-rich
5 plasma used in athletic horses with lameness of the superficial digital flexor tendon. **Journal**
6 **of Equine Veterinary Science**, v.35, n.1, p.19-26, 2015. Available from:
7 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080614004171>>. Accessed: Jan. 18,
8 2016. doi: 10.1016/j.jevs.2014.10.006.
- 9 HAUSER, M.L. et al. Suspensory desmitis: diagnostic using real-time ultrasound imaging.
10 **Journal Equine Veterinary Science**, v.4, n.6, p.258-262, 1984. Available from:
11 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080684800635>>. Accessed: Jun. 14,
12 2015. doi: 10.1016/S0737-0806(84)80063-5.
- 13 HILL, A.E. et al. Risk factors for and outcomes of noncatastrophic suspensory apparatus injury
14 in Thoroughbred racehorses. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.218, n.7,
15 p.1136-1144, 2001. Available from:
16 <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2001.218.1136?journalCode=javma>>.
17 Accessed: Dec. 14, 2015. doi: 10.2460/javma.2001.218.1136.
- 18 KASASHIMA, Y. et al. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory
19 desmitis in japanese thoroughbred flat racehorses in 1999. **Equine Veterinary Journal**, v.36,
20 n.4, p.346-350, 2004. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163043>>.
21 Accessed: Apr. 06, 2015. doi: 10.2746/0425164044890580.
- 22 MAIA, L. et al. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses:
23 histologic evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, n.8, p.618-625, 2009.
24 Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080609005437>>.
25 Accessed: Dec. 14, 2015. doi: 10.1016/j.jevs.2009.07.001.

- 1 MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasm: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral**
2 **Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v.85, n.6, p.638-646, 1998. Available from:
3 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9638695>>. Accessed: Apr. 06, 2015. doi:
4 10.1016/S1079-2104(98)90029-4.
- 5 McILWRAITH, C.W. Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures. In:
6 STASHAK, T.S. **Adams' lameness in horses**. 5th.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and
7 Wilkins, 2002. p.459-644.
- 8 MISHRA, A. et al. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. **Clinical Sports**
9 **Medicine**, v.28, n.1, p.113-125, 2009. Available from:
10 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064169>>. Accessed: Jan. 18, 2016. doi:
11 10.1016/j.csm.2008.08.007.
- 12 PEREIRA, R.C.F. et al. Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas
13 (PRP). **Ciência Rural**, v.43, n.6, p.1122-1127, 2013. Available from:
14 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000600028&lng=en&nrm=iso)
15 [84782013000600028&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000600028&lng=en&nrm=iso)>. Accessed: Sept. 18, 2015. doi: 10.1590/S0103-
16 84782013005000052.
- 17 ROMAGNOLI, N. et al. Clinical evaluation of intralesional injection of platelet-1 rich plasma
18 for the treatment of proximal suspensory ligament desmitis in horses. **Journal of Equine**
19 **Veterinary Science**, v.35, n.2, p.141-146, 2015. Available from:
20 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080614004729>>. Accessed: Oct. 05,
21 2015. doi: 10.1016/j.jevs.2014.12.011.
- 22 SCHNABEL, L.V. et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns
23 in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, n.2, p.230-
24 240, 2007. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17106885>>. Accessed: Oct.
25 05, 2015. doi: 10.1002/jor.20278.

- 1 SHARMA, P.M.N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **Journal of Bone &**
2 **Joint Surgery**, v.87, n.1, p.187–202, 2005. Available from:
3 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634833>>. Accessed: Sept. 18, 2015. doi:
4 10.2106/JBJS.D.01850.
- 5 SMITH, J.J. et al. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum
6 on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. **Veterinary and Comparative**
7 **Orthopaedics and Traumatology**, v.19, n.1, p.43-47, 2006. Available from:
8 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16594543>>. Accessed: Dec. 07, 2015.
- 9 SMITH, R.K.W. Pathophysiology of tendon injury. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J. **Diagnosis**
10 **and management of lameness in the horse**. 2st.ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders,
11 2011. p.706–726.
- 12 TORRICELLI, P. et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse
13 injuries in competition horses. **International Orthopaedics**, v.35, n.10, p.1569-1576, 2011.
14 Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394594>>. Accessed: Nov. 09, 2015.
15 doi: 10.1007/s00264-011-1237-3.
- 16 VENDRUSCOLO, C.P. et al. Evaluating the effectiveness of different protocols for preparation
17 of platelet rich plasma for use in equine medicine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.2,
18 p.106-110, 2012. Available from:
19 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000200002>.
20 Accessed: Jan. 18, 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2012000200002.
- 21 WASELAU, M, et al. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled
22 exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses.
23 **Journal American Veterinary Medical Association**, v.232, n.10, p.1515-1519, 2008.
24 Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479242>>. Accessed: Feb. 08, 2016.
25 doi: 10.2460/javma.232.10.1515.

1 Table 1 - Description of the animals included in the work.

2

Animals	Breed	Age	Modality	Injuries	Affected limb
01	Criollo	9 years	Reining	SDFT	LF
02	Brazilian Warmblood	9 years	Jumping	DDFT	RF
03	Thoroughbred	9 years	Jumping	SDFT	RF
04	Criollo	5 years	Reining	DDFT	RF
05	Criollo	5 years	Reining	PSLD	LF
06	Criollo	3 years	Reining	BSLD	RH
07	Thoroughbred	3 years	Racing	BSLD	LF
08	Thoroughbred	3 years	Racing	BSLD	LF

3

4 SDFT: superficial digital flexor tendonitis; DDFT: deep digital flexor tendonitis; PSLD:
 5 proximal suspensory ligament desmitis; BSLD: branch suspensory ligament desmitis; LF: left
 6 forelimb; RF: right forelimb; RH: right hindlimb.

7

1 Table 2 - Descriptive statistics in clinical cases of tendonitis and desmitis treated with PRP.

2

Horse	Lesion score	# PRP applications	Platelets/ μ l whole blood	Platelets/ μ l PRP	TRT (days)
Tendonitis					
01	1	1	180.000	720.000	360
02	3	1	120.000	420.000	210
03	2	3	142.000	503.000	300
04	2	3	135.000	406.000	180
Minimum value	2	-	120.000	406.000	180
Maximum value	3	-	180.000	720.000	360
Medium value	2.3	-	144.250	512.250	262
SD	0.57	-	25.539	144.965	82
Average + 1 SD	2.87	-	169.789	657.215	344
Average - 1 SD	1.73	-	118.711	367.285	180
Desmitis					
05	3	3	141.000	713.000	180
06	2	3	158.000	513.000	120
07	1	3	135.000	520.000	120
08	3	3	127.000	520.000	60
Minimum value	1	-	127.000	513.000	60
Maximum value	3	-	158.000	713.000	180
Medium value	2.6	-	140.250	566.500	120
SD	0.57	-	13.149	97.722	48
Average + 1 SD	3.17	-	153.399	664.222	168
Average - 1 SD	2	-	127.101	468.778	72

3

4 PRP: platelet-rich plasma; SD:

5

4. CAPÍTULO 2

Trabalho submetido para publicação:

Three different methods to use Platelet-rich plasma in the treatment of skin wounds in equine distal limb

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, Flávio Desessards De La Côte

EQUINE VETERINARY JOURNAL, 2016

1 **Title Page**

2

3 **Three different methods to use Platelet-rich plasma in the treatment of wound in equine**
4 **distal limb**

5

6 Roberta Carneiro da Fontoura Pereira *, Flávio D De La Côte*, Karin E Brass, Marcos da
7 Silva Azevedo* Camila Cantarelli *, Miguel Gallio*, Alfredo Skrebsky Cezar§, Maria Andréia
8 Inkelmann†

9

10 * Department of Large Animal Clinics, School of Veterinary Medicine, Federal University of
11 Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

12 § Department of Preventive Medicine, School of Veterinary Medicine, Federal University of
13 Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

14 ‡ Department of Agrarian Studies in Regional State University of Northwestern Rio Grande do
15 Sul (UNIJUÍ), Brazil

16

17

18

19 Correspondence: Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, Department of Large Animal Clinics,
20 School of Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande
21 do Sul, Brazil, 97.105-900

22 E-mail: betacfp@hotmail.com.br

23 Tel.: +55 55 9935 3511.

24 SUMMARY

25 **Reasons for performing the study:** Distal limb wounds are frequent in horses after traumatic
26 events. The use of platelet-rich plasma (PRP) represents a simple method of treating wounds in
27 equines because the platelets contain several growth factors.

28 **Objectives:** To evaluate the clinical effect of autologous PRP on wound healing and to establish
29 a correlation between the number of platelets in PRP and healing time of wounds and individual
30 variations in healing time of wounds, regardless of treatment group. In addition, to determine
31 what the best form of application of PRP equine skin wounds and the test of using the
32 homologous PRP whit alternative as a treatment alternative in cutaneous wounds of horses.

33 **Study design:** This study evaluates the potential of platelet derived factors to enhance wound
34 healing in the lower equine limb.

35 **Methods:** To test this hypothesis, eight healthy adult horses, 8 ± 3.76 years old were used. Four
36 skin wounds of 4cm^2 area were surgically created in the dorsolateral aspect of the third cannon
37 bone, two on the left forelimb (A1 and A2) and two on the right forelimb (A3 and A4). The
38 cutaneous lesions were treated according to the randomly established treatment group. In the
39 same animal, each of the four wounds was assigned to one of four treatment groups at random,
40 for each treatment group obtained eight replicates in different regions in the forelimbs. In the
41 group (G) I, the skin lesions were treated with PRP infiltration of the wound edges; GII were
42 treated with PRP was used in gel form; GIII was used homologous PRP infiltration and GIV
43 control group (without PRP application).

44 **Results:** PRP gel treatment (GII) reduced in 15 days the healing time compared to the wounds
45 of the control group (GIV). The GII presented higher frequency of low inflammation and
46 neovascularization low to moderate in biopsies 1 and 2 on the histopathology exam. The GIV
47 had the highest intensity of granulating wounds between the groups.

48 **Conclusions:** PRP in gel form, showed the best result on wound healing in the distal limb of
49 horses in both clinical and histopathology evaluations. Furthermore, homologous PRP can be
50 considered beneficial in the management of wound healing in horses and it can be safely used
51 as an alternative source of PRP.

52 **INTRODUCTION**

53 Wounds resulting from environmental disorders are common causes of substantial
54 economic losses in equine veterinary medicine [1], because the wounds require intensive care
55 and expensive treatments [2]. Factors with size of the wound, tension, mobility, poor blood
56 supply, susceptibility to infection, and type and condition of underlying tissues of the wound
57 are directly interfere with healing [3]. The cellular mechanisms as described in repair distal
58 limb soft tissue, such as, inefficient inflammatory response to trauma, persistent local up-
59 regulation of pro-fibrotic growth factors, a disparity between collagen synthesis and lysis as
60 well as microvascular occlusion and deficient apoptosis of the cellular components of
61 granulation tissue and a site very favorable to contamination [4, 5].

62 Horses often suffer from chronic slow healing wounds and, conversely, from the
63 development of exuberant granulation tissue, when soft-tissue wounds are located on the distal
64 limb. Therefore, wounds occurring in this location are of important concern to horse owners
65 and veterinarians [6].

66 Several clinical studies, in both human and veterinary medicine, on the restoration of
67 tissue integrity have shown the positive role of platelets in natural wound healing [7, 8, 4, 9,
68 10]. When locally applied, platelets accelerate healing of normal tissue because of growth
69 factors release, as already widely demonstrated [11]. Platelet-rich plasma (PRP) has been
70 utilized as a source of cytokines and growth factors (GF) released from activated platelet alpha-
71 granules at the site of tissue injury. GF's released after platelet degranulation include

72 transforming growth factor β (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like
73 growth factor-I, vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF)
74 [12].

75 The aim of this study was to evaluate the clinical effect of autologous PRP on wound
76 healing and to establish a correlation between the number of platelets in PRP and healing time
77 of wounds and individual variations in healing time of wounds, regardless of treatment group.
78 In addition, to determine the best form of application of PRP on equine skin wounds and the
79 possibility of using homologous PRP as a alternative treatment in cutaneous wounds of horses.

80 MATERIAL AND METHODS

81 **Selection of Animals:** This study was approved by the Committee of Ethics on Animal Care
82 and Research Use of the Federal University of Santa Maria (UFSM) registration number
83 110/2013. This study used eight healthy adult horses, geldings and females, with an average
84 age of eight years (± 2.6), average weight of 500 kg (± 70), with normal CBC and biochemical
85 parameters within the reference values, including platelet counts above 100.000/dL. The
86 animals were kept in individual stalls fed daily with commercial diet, alfalfa hay and water *ad*
87 *libitum*. The animals received preoperatively flunixin meglumine (1.1 mg/kg intravenous (IV),
88 once a day) for 3 days, penicillin-based antibiotics 22.000 IU/kg (procaine penicillin,
89 benzathine, and dihydrostreptomycin) single intramuscular application (IM) and tetanus
90 antitoxin 5.000 UI via IM. After induction of cutaneous defects, the site was protected with
91 bandages, changed daily until end of the study (complete healing of wound).

92 **Preparation of Platelet-Rich Plasma (PRP):** Preparation of Platelet-Rich Plasma was
93 performed using 450 ml of blood were collected from each animal by puncturing the external
94 jugular vein using a commercial blood-transfusion bag containing citrate-phosphate-dextrose
95 solution with adenine as an anticoagulant (CPDA-1; 63 mL for 450 ml of blood). Then, the PRP

96 is obtained from 100 ml of whole blood aspirated from the blood bag and distributed in three
97 polypropylene tubes falcon type (50ml) where in each tube were deposited 30ml and other two
98 35 ml. This tubes were centrifuged a first time at 224 g for 10 minutes to separate the plasma
99 from the mist zone (phlogistic layer containing leukocytes) and red blood cells. The supernatant
100 containing the platelet-rich plasma was transferred to a second falcon tube and centrifuged at
101 440g will again for 10 minutes. After the second centrifugation, the plasma supernatant was
102 discarded, and preserved only 10 ml of PRP, representing 10% of the initial total blood volume.
103 This technique to obtain PRP was previously determined by Pereira et al. [13].

104 **Preparation of homologous PRP:** PRP homologous was obtained through the blood collection
105 from the two donor horses and processed according to the protocol proposed by Pereira et al.
106 [13]. The wounds of animal 1, 2, 3 and 4 was used homologous PRP of blood donor 1. The
107 wounds of animal 5, 6, 7 and 8 has used homologous PRP of blood donor 2. Laboratory tests
108 were realized in the previous period to the beginning of the experiment to rule out equine
109 infectious anemia and glanders.

110 **PRP activation for preparation the PRP in gel form:** For activation of platelets, calcium
111 gluconate was used to make PRP in the gel form. For each ml of PRP to be transformed into
112 gel, 0.5 ml of the supernatant plasma it was removed and it is considered as the platelet poor
113 plasma (PPP). Then, 0.3 ml of calcium gluconate was added to this PPP and incubated at 37 °
114 C for 15 minutes. After the incubation period, resuspension was performed thrombin and
115 subsequent centrifugation at 640 g for 10 minutes at room temperature [14]. The mixture of
116 autologous thrombin with PRP condense further with formation of PRP in gel form that was
117 applied in the injuries destined to group treated to PRP gel.

118 **Creating the skin defects:** All horses received a dose of 10% xylazine (1mgkg^{-1}) and
119 butorfanol tartarate (0.02mg/kg) prior to the surgical procedure. The high palmar nerve block
120 was performed with the technique described by Stashak & Baxter [15]. With the horses

121 standing, two cutaneous defects were created on the dorsolateral aspect of each McIII, the first
122 defect located 3cm below the carpometacarpal joint and the second defect 3cm above the fetlock
123 level. Distance between the two wounds in each forelimb created was 5 cm. To create the skin
124 defects, the skin was clipped and prepared for aseptic preparation with iodine povidine and 70%
125 alcohol. Sterile gloves were used to decrease the likelihood of contamination. A plastic frame
126 of 4cm² was place over the site to be incised and with the aid of a 24 scalpel blade, the skin was
127 removed leaving a 4 cm² defect on the skin, one defect proximal and the second defect distal,
128 over the dorsolateral region of McIII. Once the cutaneous defects were created, one treatment
129 was randomly assigned to each wound. A sterile bandage was placed over the wounds, for
130 protection, which was changed daily.

131 **Treatment Groups:** Each skin defect was considered a treatment group and each group
132 received three applications of PRP, repeated applications every 2 weeks, as follows:

- 133 1. **GI:** PRP infiltration subcutaneously around the wound edges.
- 134 2. **GII:** Skin defects were treated with PRP gel form over the skin defect.
- 135 3. **GIII:** PRP Infiltration homologous subcutaneously around the wound edges.
- 136 4. **GIV:** Infiltration of saline around the wound edges was used as a control group.

137 A total of 32 skin wounds were randomly treated and distributed in the four wounds of
138 the eight animals evaluated (Figure 1).

139 **Clinical evaluation:** The clinical evaluation was blinded and performed by three veterinarians,
140 every 15 days, using the following parameters: presence of granulation (low, moderate,
141 excessive), color (pale, pink and hyperemic) and sensibility (absent or present). The size of the
142 wound was measured using a tape measure.

143 **Histopathological analysis:** The skin biopsies were performed on the 15th and 30th day after
144 the first application of PRP. The animals were sedated with 10% xylazine at a dose of 1 mg /
145 kg and received local anesthesia with 2% lidocaine without vasoconstrictor. Biopsy samples

146 were collected with a 8mm-dermatological punch under aseptic preparation. In the first sample
147 each treatment group was collected from the upper right and lower left corner of the wounds
148 and the second biopsy was taken in the upper left and lower right corner of the wounds. Samples
149 were immediately fixed in 10% formalin. In laboratory the samples were then routinely
150 processed for histopathology, prepared and stained by hematoxylin and eosin (HE). The
151 variables analyzed were: intensity of inflammation, granulation tissue, fibroplasia, fibroblasts
152 cells, neovascularization and collagen maturity, on a scale of low, moderate and intense (Table
153 1).

154 **Statistical analysis:** The number of platelets in whole blood and number of platelets in PRP
155 were submitted to the distribution normality test by Kolmogorov-Smirnov test, with 95%
156 confidence. After verified the normal distribution ($p = 0.1208$), Pearson's correlation was tested
157 between these variables at a 95% confidence interval. The average of three evaluations of the
158 variables number of platelets in whole blood and number of platelet in PRP and the variable
159 healing time wounds control and treated PRP infiltrated, PRP gel and homologous PRP were
160 submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test with 95% confidence intervals ($p > 0.05$).
161 Pearson's correlation was analyzed between the average of the number of platelets in whole
162 blood of animals and the healing time of each type of wound, as well as between the average
163 number the platelets in PRP animals and time healing for each type of wound. The data were
164 statistically analyzed using the chi-square test and Fisher's exact test, with a 95% confidence
165 interval, considering as categorical variables and whether or not treatment with PRP and
166 evaluating the healing time of frequencies lower, equal or higher than expected. The healing
167 time was evaluated by comparing (ANOVA) and comparing the groups by Tukey test with 95
168 % confidence interval ($p \leq 0.05$). The proportion of animals with healing time than the median
169 of the control group was evaluated for each group treated by Fisher's exact test with 95 %
170 confidence interval ($p \leq 0.05$). The variables intensity of inflammation, granulation tissue,

171 fibroplasia, fibroblast cells, neovascularization and collagen maturity were compared using
172 Fisher's exact test with 90% confidence interval (significance level of $p \leq 0.1$).

173 **RESULTS**

174 **Platelet-Rich Plasma**

175 Positive correlation was found between the number of platelets in whole blood and
176 platelet number in PRP, with ($p < 0.0001$) (Figure 1).

177 There was no correlation between the number of platelets in the whole blood of horses
178 and the healing time. In addition, no correlation between the average number of platelets in
179 PRP of animals used and the healing time of groups I, II, III and IV.

180 **Clinical evaluation**

181 Considering treatment with PRP gel, the healing time was reduced fifteen days when
182 compared to the control group in 62.5% of horses (animals 1, 2, 4, 5 and 6) ($p = 0.007$). Only
183 the animal 8 there was an increase of healing time. Thus, it is clear that PRP treatment allowed
184 a faster healing in most cases. The homologous PRP treatment reduced the time to healing of
185 the injured animal 3, 7 and 8 (37.5%) compared to control group, and in another animals the
186 healing time of the wound was the same as control group. Wounds treated with PRP infiltration
187 was reduced fifteen days the healing time compared to control wounds only in the animal 2 and
188 5 (25.0%) and increased in fifteen days the healing time in the animal 8. Regardless of treatment
189 used, different found in healing time between the evaluated animals.

190 **Histopathological evaluation**

191 In the analysis of variables intensity of inflammation, granulation, fibroplasia, fibroblast
192 cells, neovascularization and collagen maturity it was observed that the group GIV (control)
193 had higher frequency of the intensity the formation of granulation the GII (PRP gel), followed

194 GIII (homologous PRP) and GI (PRP infiltration), however, the GII showed a higher frequency
195 of low inflammation on biopsy 2 compared to GIV. When comparing all groups and between
196 first and second biopsies, GII showed most low to moderate frequency of neovascularization.
197 In did No observe differences were observed regarding fibroplasia, fibroblast cells and collagen
198 maturity and between the first and second biopsies (Table 1).

199 **DISCUSSION**

200 Wounds located on the distal limb in horses have a very important characteristic, a
201 chronic nonhealing wounds and exuberant granulation tissue often develop [16].

202 Distal limb lacerations, with or without tissue loss, represent a challenging situation to
203 veterinarians to repair them by first intention, leaving the tendons/tendon sheaths and joints
204 unprotected. Associated to this lack of tissue coverage, the wound located on the distal limb.

205 This study served to fulfill a gap in the literature, due to the fact that evaluated three
206 different methods of PRP treatment to shorten the healing time and to obtain a better healing.
207 The surgically created wounds on the dorsolateral aspect of the cannon bone and treated with
208 three applications of the PRP demonstrated that PRP in gel form was able to reduce in fifteen
209 days the healing time when compared to control group.

210 It was observed that difference healing in horses evaluated, regardless of treatment
211 group, no correlation was found between the number of platelets in the PRP and the healing
212 time of wounds.

213 Maciel et al. [9] compared one or two applications of platelet-rich plasma gel in burn
214 wounds of horses and observed an increased speed of repair of the extracellular matrix and its
215 components in deep second degree burn, but had a potential of fibroses formation. They
216 concluded that two topical applications of the PRP gel accelerated the extracellular matrix
217 formation during the first half of wound healing. One experimental study conducted by

218 Monteiro et al. [17], with topical application of autologous platelet-rich plasma gel, did not see
219 acceleration or improvement in the quality of repair of small granulating wounds on limbs of
220 horses when compared to the control group.

221 Reviewing published data, one will discover that there is a lack of information about the
222 use of the homologous PRP for the treatment of cutaneous lesions in horses. Barbosa et al. [18]
223 consider hypovolemia and thrombocytopenia as limiting factors for the obtaining of PRP. One
224 of the hypotheses of this study was to evaluate the possibility of homologous whole blood for
225 obtaining PRP, alternative source for growth factors when faced with extensive skin lacerations
226 where animals, due to injury, lose considerable amounts of blood. Another situation would be
227 when dealing with neonatal foals, where we can't remove large volumes of whole blood for
228 obtaining autologous PRP.

229 Carmona et al. [19] described a clinical case of a chronic severely contaminated distal
230 limb wound in an 8-month-old foal, treated with debridement, bandages and PRP (gel form and
231 infiltration), this authors encouraged to use of PRP, especially in large wounds. According to
232 the results presented in their study, the homologous PRP is a viable form of use of PRP in
233 equine skin wounds.

234 In the present study, there were no differences in fibroplasia variables, fibroblast cells
235 and collagen maturity, between the groups GI, GII and GIII). The treated group with PRP gel
236 (GII) showed a low to moderate frequency the neovascularization and inflammation in the first
237 and second biopsies, and low frequency of the granulation tissue when compare with group
238 control. Carter et al. [4] evaluated platelet derived factors to enhance wound healing in the
239 lower equine limb; the cutaneous lesions treated with PRP gel accelerated epithelial
240 differentiation and tissue organized collagen bundles. Vendramin et al. [20] compared the use
241 of PRP infiltration and PRP gel form for treatment of experimental skin wounds in rabbits;

242 these authors observed an increase in the inflammatory response and the intensity of collagen
243 production, an increase in the number macrophages and fibroblasts in the graft site.

244 **CONCLUSIONS**

245 The number of platelets in the PRP did not influence the cutaneous healing horses.
246 Based on clinical and histopathological evaluation, the PRP gel was the best form to use it for
247 treatment of skin wounds in horses. The homologous PRP can be used as an option for the
248 treatment of wounds healing in horses.

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263 **TABLE LIST**

264 Table 1 - Descriptive results of biopsy in the different groups.

265

Biopsy	Intensity	Group I	Group II	Group III	Group IV
Inflammation intensity					
First	Low	1	1	1	0
	Moderate	3	3	4	2
	Intense	4	4	3	6
Second	Low	1	4	1	0
	Moderate	3	3	3	6
	Intense	4	1	4	2
Granulation tissue					
First	Low	0	0	0	0
	Moderate	5	3	5	4
	Intense	3	5	3	4
Second	Low	0	2	0	0
	Moderate	4	4	4	4
	Intense	4	2	4	4
Fibroplasia					
First	Low	0	1	0	0
	Moderate	4	3	5	3
	Intense	4	4	3	5
Second	Low	0	2	0	0
	Moderate	4	4	4	4
	Intense	4	2	4	4
Fibroblast cells					
First	Low	0	1	0	0
	Moderate	4	3	5	4
	Intense	4	4	3	4
Second	Low	0	2	0	0
	Moderate	4	4	4	4
	Intense	4	2	4	4

		Neovascularization			
First	Low	0	2	1	1
	Moderate	4	6	5	3
	Intense	4	0	2	4
Second	Low	1	4	0	0
	Moderate	4	0	4	3
	Intense	3	4	4	5
		Collagen maturity			
First	Low	6	2	3	5
	Moderate	2	4	5	2
	Intense	0	2	0	1
Second	Low	5	3	4	6
	Moderate	2	3	4	2
	Intense	1	2	0	0

266

267

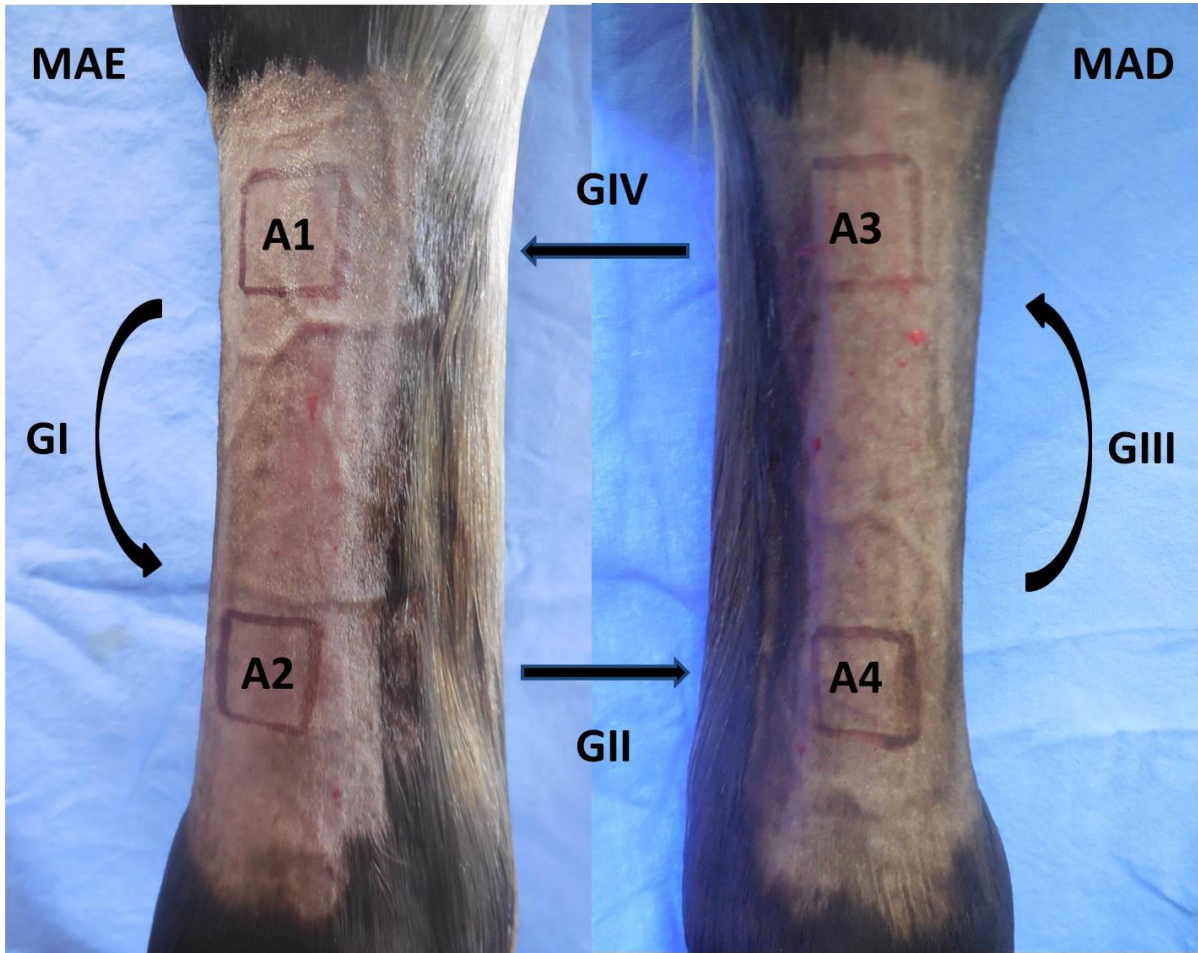
268 **LIST OF FIGURE LEGENDS**

269 **Figure 1** - Schematic design of the random distribution of treatments in skin wounds. MAE:
270 left forelimb (A1 and A2); MAD: right forelimb (A3 and A4) the treatment of wounds in
271 animals.

272 **Figure 2** - Simple linear regression and Pearson's correlation between number of platelets in
273 whole blood and number of platelets in PRP obtained from horses.

274 **Figure 3.** Comparison between platelet's concentration in whole blood and PRP.

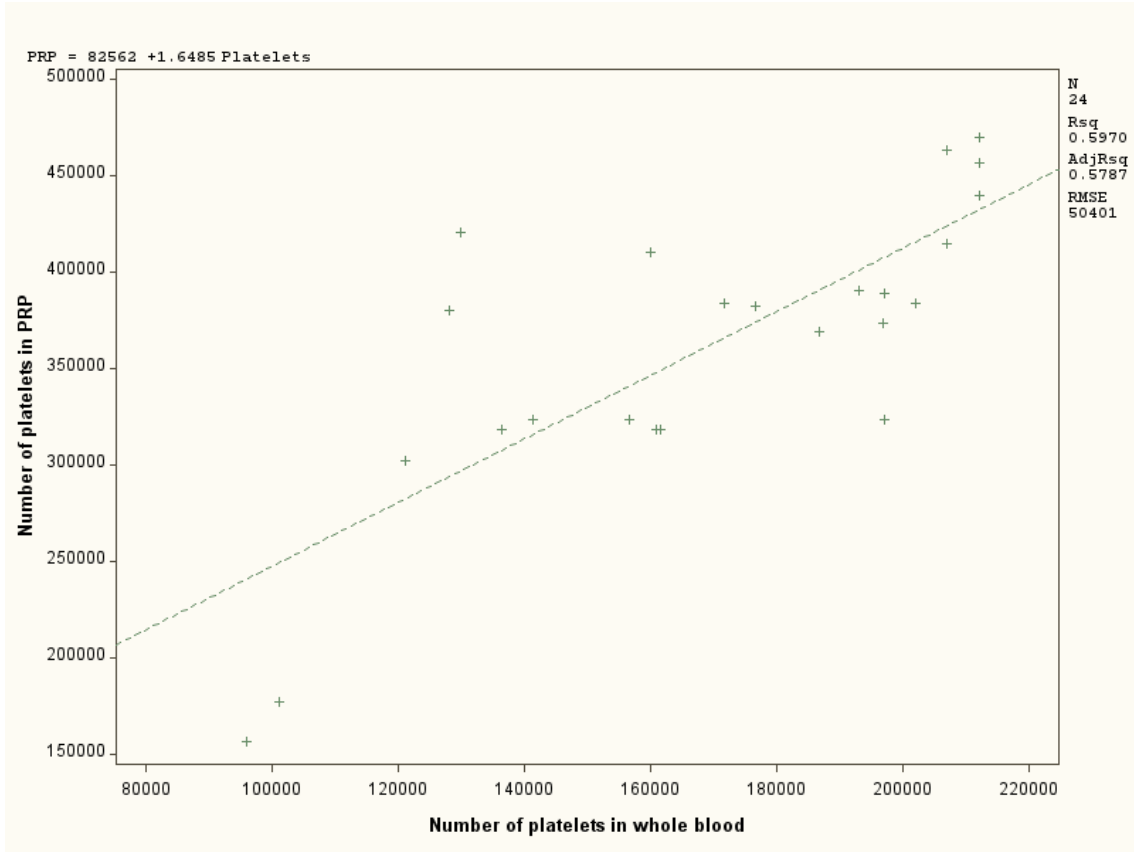
275 **Figure 1.**



276

277

278 **Figure 2.**

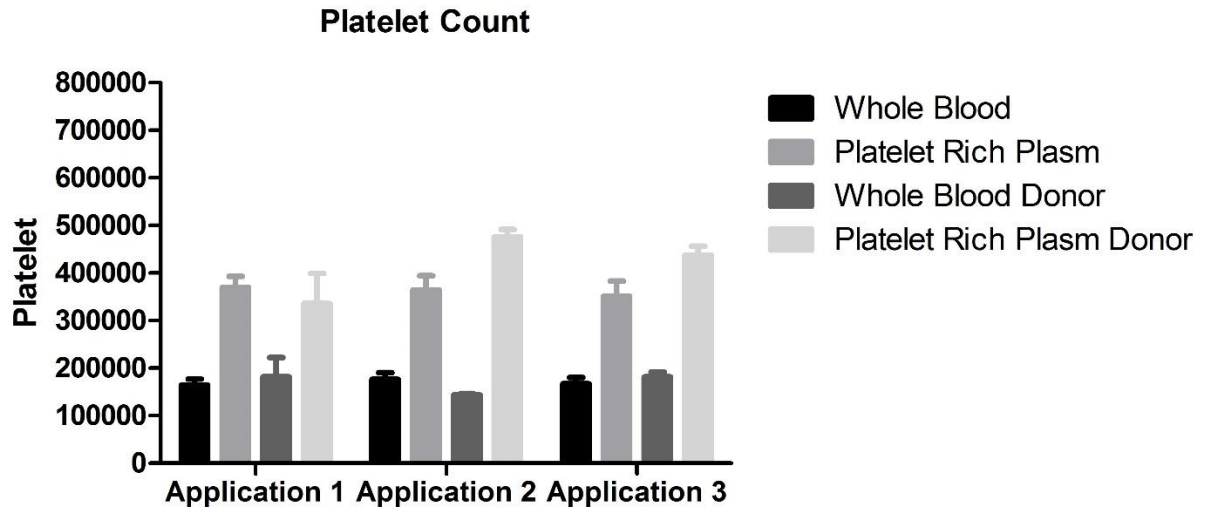


279

280

281 **Figure 3.**

282



283

284 **REFERENCES**

- 285 [1] Scott DW, Miller WH. Environmental skin diseases. In: Scott DW, Miller WH, editors.
286 Equine dermatology. 2nd ed., St Louis: Saunders; 2011. p. 600–27.
- 287 [2] Theoret CL. Wound repair. In: Auer JA, Stick JA, editors. Equine surgery. 3rd ed.,
288 Philadelphia: Saunders; 2006. p. 44–62.
- 289 [3] Kim JH, Park C, Park HM. Curative effects of autologous platelet-rich plasma on a large
290 cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol* 2009;20(2):123–6.
- 291 [4] Everts PA. Autologous platelet-leukocyte enriched gel basics and efficacy: a novel method
292 to support soft tissue and bone healing PhD thesis. Eindhoven, Netherlands: Catharina Hospital
293 Eindhoven; 2007.
- 294 [5] Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound
295 colonization in burned patients. *Burns* 2004;30(4):357–61.
- 296 [6] Carter CA, Jolly DG, Worden CE, Dennis GH, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes
297 differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003;74:244-
298 55.
- 299 [7] Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of
300 proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4-15.
- 301 [8] Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically
302 repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*
303 2007;35:245-51.
- 304 [9] Maciel, FB, DeRossi, R, Módolo, TJ, Pagliosa, RC, Leal, CR. Scanning electron microscopy
305 and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel
306 treatment. *Burns* 2012;38(7); 1058-65.

- 307 [10] Iacopetti I, Perazzi A, Ferrari V, Busetto R. Application of platelet-rich gel to enhance
308 wound healing in the horse: a case report. *J Equine Vet Sci* 2012;32:123–8.
- 309 [11] Theoret CL. Wound repair in the horse: problems and proposed innovative solutions. *Clin*
310 *Tech Equine Pract* 2004;3:134–40.
- 311 [12] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*
312 2004;62:489-96.
- 313 [13] Pereira, RCF, Zacarias, GVF, Cantarelli, C, Corrêa, MMB, Silva, GB, et al. Avaliação de
314 sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. *Ciência Rural*
315 2013; 43(6), 1122-27.
- 316 [14] De Rossi R, Coelho AC, Mello GS, Frazílio FO, Leal CR, Facco GG, et al. Effect of
317 platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir Bras* 2009;24:276-
318 81.
- 319 [15] Stashak, TS, Baxter, M. Perineural and intrasynovial anesthesia. In: Adams & Stashak's
320 lameness in horses, ed. Blackwell, 2011, p. 177.
- 321 [16] Saldamacchia G, Lapice E, Cuomo V, De Feo ME, D'Agostino E, Rivellese AA, et al.
322 Uso del gel di piastrine autologo per la cura delle ulcere del piede diabetico. *Giornale Italiano*
323 *di Diabetologia e Metabolismo* 2004;24:103-5.
- 324 [17] Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of
325 wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res* 2009;70:277–82.
- 326 [18] Barbosa, ALT, Del Carlo, RJ, Gomes, HC, Oliveira, AC, Monteiro, BS. Plasma rico em
327 plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural* 2008; 38(5), 1335-40.

328 [19] López, C, & Carmona, JU. Platelet-rich plasma as an adjunctive therapy for the
329 management of a severe chronic distal limb wound in a foal. *Journal of Equine Veterinary*
330 *Science* 2014; 34(9), 1128-33.

331 [20] Vendramin, FS, Franco, D, Schamall, RF, Franco, TR. Utilização do plasma rico em
332 plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. *Rev Bras Cir Plast* 2010, 25(1), 4-
333 10.

334

335

336

337

338

339

340

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados, constatou-se que a aplicação intralesional de PRP associada ao programa de aumento gradual e controlado de exercício, foi eficaz para o tratamento de lesões nos tendões flexores e no ligamento suspensório. Não foi observada recorrência das lesões nos animais avaliados, nem correlação entre o número de plaquetas e o tempo de cicatrização das injúrias.

De acordo com a avaliação clínica e histopatológica, o PRP gel foi a melhor forma de aplicação do PRP como tratamento adjuvante de feridas cutâneas localizadas em regiões distais dos membros locomotores. Pode-se inferir que o PRP homólogo é uma alternativa a ser utilizada na cicatrização cutânea em cavalos. Assim como no tratamento das tendinites e desmites, o número de plaquetas no PRP não teve correlação com o tempo de cicatrização.

6. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, 740p.
- ALVES, A. L. G. **Influência da betaaminopropionitrila associada à atividade física na reparação tendínea de equinos após agressão pela colagenase. Análise ultra-sonográfica e morfológica**. 1998. 91 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.
- ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparations of future sites for implants. **International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.14, p.529-535, 1999.
- ARGUELLES, D. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, v. 162, 208–221, 2008.
- BARBOSA, A.L.T. et al. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.
- BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. Tendons and ligaments – an overview. **Histology and Histopathology**, v.12, p.1135- 1144, 1997. DYCE, K.M. et al. O membro anterior do equino. In: _____. **Tratado de anatomia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.446-475.
- BERRY, D.B; SULLINS, K.E. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. **American Journal of Veterinary Research**, 64, 88–92, 2003.
- BOSCH, G. et al. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scand J Med Sci Sports**, 4, 554-561, 2011.
- CARMONA, J.U. et al.. Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse. 2006. 91f. Doctorado en Medicina y Sanidad Animales, Universitat Autònoma de Barcelona.Barcelona, SPA: UAB.
- CARMONA, J.U. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, p.167-170, 2007.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 9, p. 1-5, 2011.
- CARTER, C.A. et al. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 244-255, 2003.
- DE BASTIANI, G. et al. Association of Ultrasound and Anatomopathologic Findings of Equine Metacarpophalangeal Lesions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1218–1225, 2014.

- DENOIX, J. M. Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes). **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 10, n. 2, p. 273-322, 1994.
- DE ROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n.4, p. 276–281, 2009.
- DYCE, K.M. et al. O membro anterior do equino. In: _____. **Tratado de anatomia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.446-475.
- DYSON, M. Advances in wound healing physiology: the comparative perspective. **Veterinary Dermatology**, v. 8, p.227-233, 1997.
- DOWLING, B.A., et al., Superficial digital flexor tendonitis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, n.32, p.369–378, 2000.
- EFEOGLU, C. et al. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.64, n.11, p.1403-1407, 2004.
- EVERTS, P.A. et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. **Growth Factors**, v.24, n.3, p.165-171, 2006.
- FACKELMAN, G. E. The Nature of Tendon Damage and its Repair. **Equine Veterinary Journal**, v. 5, p. 141-149, 1973.
- FOSTER, T.E. et al. Platelet rich plasma: from basic science to clinical applications. **American Journal of Sports Medicine**, v.37, n.11, p.2259-2272, 2009.
- FRANDSON, R.D. et al. Articulações. In: _____. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.77-88.
- FRETZ, P. B. et al. Treatment of exuberant granulation tissue in the horse evaluation of four methods. **Veterinary Surgery**, v. 12, n. 3, p. 137-140, 1983.
- GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In: _____. **Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Illinois: Quintessence, 1999. p.231-243.
- GIBSON, K.T. & STEEL, C.M., Conditions of the suspensory ligament causing lameness in horses. **Equine Veterinary Education**, v.14, p.39-50, 2002.
- GOLDBERG, S. Descomplicando a fisiologia. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 8.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.61-65.
- GOH, J.C. et al. Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. **Tissue Engineering**, v.9, p. 31-44, 2003.
- GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: background and process. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v.22, n.6, p.547-557, 2002.

GUERREIRO, J.P.C. et al. Plasma rico em Plaquetas (PRP) aplicado na artroplastia total do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.50, n.2, p. 186-194, 2015.

HACKETT, R.P. Management of traumatic wounds. **American Association of Equine Practitioners**, v. 24, p. 363-368, 1978.

HANSELKA, D.V. Wounds and their management. In: McMullan, W.C. The Skin. In: Mansmann, R.A., McAllister, E.S., Pratt, P.W. **Equine Medicine and Surgery**. 2 ed. Santa Barbara: American Veterinary Publications, 1982. p. 857-880.

JACOBS, K. A. et al. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. **Veterinary Surgery**, v. 13, n.2, p. 83-90, 1984.

JUNIOR, R.R. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 20, n. 3, p. 295-300, 2008.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In: **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.5, p. 92-124.

LE MOS, João José et al. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos-proposta de um protocolo de obtenção simplificado. **Internet Health Company do Brasil S/A. Medcenter Periodontia**, v. 12, n. 01, 2002.

LIEBERMAN, J.R. et al. The role of growth factors in the repair bone. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v.84, n.6, p.1032-1042, 2002.

LINDSAY, W.A. Wound treatment in horses: what to know about second-intention healing. **Veterinary Medicine**, v.83, n.4, p.396-403, 1988.

KASTELIC, J. GALESKI, A. & BAER, E. The multicomposite structure of tendon. **Connective Tissue Research**, v.6, 611-623, 1978.

KEYV, S.V; JACOBSON, M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **Journal of ExtraCorporeal Technology**, v. 36, n. 1, p. 28-35, 2004.

MANDELBAUM, S.H; SANTIS, E.P.D. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n.4, 2003.

MACIEL, F.B. et al. Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. **Burns**, v.38, p. 1058-1065, 2012.

MAIA, L. et al. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, n.8, p.618-625, 2009.

MARR C.M. et al. Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**. n. 25, v.1, p. 23-29, 1993.

MARX, R.E. et al., Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. In: _____. **The sinus bone graft**. Colorado: Quintessence, 1999. p.183-189.

MARX, Robert E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.

McCLURE, S.R. et al., The effects of extracorporeal shock-wave therapy on the ultrasonographic and histologic appearance of collagenase-induced equine forelimb suspensory ligament desmitis. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 30, n. 4, p. 461-467, 2004.

McGAVIN, M.D.; MYERS, R.K. **Cellular and tissue responses to injury. Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 4th ed (McGavin MD, Zachary JF, eds). Mosby, St Louis, MO, p. 3-62, 2007.

McILWRAITH, C.W. **Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures**. In Adams' Lameness in Horses, Stashak TS, ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p.459-644, 2002.

MESSORA, M.R. et al. Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)-estudo experimental em coelhos. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 3, p. 291-296, 2009.

MILLER, C.B. et al. Growth Characteristics of Fibroblasts Isolated From the Trunk and Distal Aspect of the Limb of Horses and Ponies. **Veterinary Surgery**, v.29, n.1, 2000.

MONTEIRO, S.O. et al. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 70, p. 277-282, n. 2, 2009.

NETO, J.C.L. Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos. 2003. **Disponível em:** http://www.merial.com.br/veterinarios/equinos/biblioteca/equinos_documentoList. Acesso em: 08/12/2015.

NIXON, A. J. et al. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 7, p. 928-937, 2008.

OLIVEIRA, V.A; ALVARENGA, J., Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de equinos, v.28, n.4, p.623-628, 1998.

PARKS, A, H. Equine foot wounds: general principles of healing and treatment. In: **Proceedings American Association of Equine Practitioner Convention**, v.45, p. 180-187, 1999.

PEREIRA, R.C.F. et al. Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). **Ciência Rural**, v.43, n.6, p. 1122-1127, 2013.

PORCELLINI, A. Regenerative medicine: A review. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.2, p.63-66, 2009.

- REEF, V.B. Equine diagnostic ultrasound. Philadelphia: Saunders, 1998. 560p.
- RIDERMAN G. et al. Autologous conditioned plasma therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. **Journal of Veterinary Science**. 11, 173-175, 2010.
- RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular. **Rheumatology**, v. 43, n.2, p.131-142, 2004.
- ROBERTS, A.B; SPORN, M.B. Transforming growth factor- β . In: Clark RAF, editor. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2^o ed, New York, Plenum Press, 1996, p. 275–308.
- ROMAGNOLI, N. et al. Clinical evaluation of intralesional injection of platelet-1 rich plasma for the treatment of proximal suspensory ligament desmitis in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, 35, 141-146, 2015.
- ROONEY, J. R. The primary site of damage in bowed tendon of the horse. **Modern Veterinary Practice**, v. 54, n. 5, p. 58, 1973.
- SALDALAMACCHIA, G. et al. Uso del gel di piastrine autologo per la cura delle ulcere del piede diabetico. **Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo**, v. 24, p. 103-105, 2004.
- SANCHEZ M. et al. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 35, p. 245-251, 2007.
- SANCHEZ, M. et al. Ultrasound-guided platelet –rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. **Rheumatology**, v.51, n.1, p.144-150, 2012.
- SCHNABEL, L.V. et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research**. 25, p. 230-240, 2007.
- SCHWARZBACH, S.V. et al., Ligamento suspensório da articulação metacarpo/metatarso falangianas nos equinos: aspectos evolutivos, anatômicos, histofisiológicos e das afecções. **Ciência rural**, v. 38, n. 4, p. 1193-1198, 2008.
- SMITH, R.K.W. Assessment and treatment of tendon injury. **BEVA Regional CPD, London. London: Department of Farm Animal and Equine Medicine and Surgery. North Mymms, UK: The Royal Veterinary College**, p. 10-14, 1998.
- STASHAK, T. D. **Equine wound management**. London: Lea e Febiger, 2004, p.1-18.
- TORRICELLI, P. et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. **International Orthopaedics**, v.35, p. 1569-1576, 2011.
- VENDRAMIN, F.S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: Técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.
- WILKE, M.M. et al. Enhanced early Chondrogenesis in articular defect following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in a equine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, p.914-925, 2007.

WILMINK, J.M; WEEREN, P.R.V. Second-Intention Repair in the Horse and Pony and Management of Exuberant Granulation Tissue. **Veterinary Clinics of North America**, v.25, n.1, p. 15-32, 2005.

WRIGLEY R.H. 2006. Ultrassonografia de tendões, ligamentos e articulações, p.417-601. In: Stashak T.S. (Ed.), **Claudicação em equinos segundo Adams**. 5ª ed. Roca, São Paulo.