

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**USO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITES
EM EQUINOS**

MARCELO BARCELOS ROCHA

PORTO ALEGRE

2014/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**USO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE TENDINITES
EM EQUINOS**

MARCELO BARCELOS ROCHA

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da Graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: André Luiz de Araújo Rocha

Co-orientador: Néelson Alexandre Kretzmann Filho

PORTO ALEGRE

2014/1

“A felicidade não está na chegada e sim no caminho”.

Autor desconhecido

RESUMO

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um derivado do sangue total onde obtemos altas concentrações de plaquetas, como também altas concentrações de fatores de crescimento (TGF, PDGF, FGF, VEGF, EGF, IGF e HGF) importantes na regeneração dos tecidos. O PRP pode conter entre três a cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos no sangue. Sendo que concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L são necessárias para o efeito terapêutico desejado. Atualmente, o PRP tem sido estudado quanto sua utilização clínica em patologias do aparelho locomotor de equinos: tendinites, desmites, doenças articulares, sendo empregado principalmente em tendinites do tendão flexor digital superficial (TFDS). A aplicação de PRP intralesional estimula o restabelecimento das propriedades biomecânicas normais dos tecidos, estimulando sua capacidade regenerativa e acelerando todos os processos relacionados à sua completa restauração. O PRP pode ser obtido basicamente por três técnicas: do tubo (manual), centrifugação (semiautomática) e por aférese (automática). Apesar de existirem inúmeros protocolos de preparação, ainda não foi desenvolvido um método ideal e padronizado para obtenção do PRP. Esse trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre o PRP associando sua importância ao tratamento da tendinite em equinos. Será abordada uma revisão anatômica do tendão equino enfatizando a importância das plaquetas na cicatrização e regeneração dos tecidos, os métodos de obtenção do PRP e as variáveis que influenciam a obtenção do PRP. De encontro a isso, será abordado um levantamento de investigações clínicas que sustentam o uso do PRP em equinos.

Palavras-chave: PRP. Equinos. Tendinite. Plaquetas. Fatores de crescimento. Terapia regenerativa.

ABSTRACT

The Platelet-Rich Plasma (PRP) is a derivative of the total blood where high concentrations of platelets can be obtained, as well as high concentrations of growth factors released by them (TGF, PDGF, FGF, VEGF, EGF, HGF and IGF), important in tissue regeneration. The PRP should contain between three to seven times more platelets than physiological levels, since the required concentration for the desired therapeutic effect is greater than 300,000 platelets/uL. Currently, PRP has been widely studied for its clinical use in horses' locomotor system pathologies such as tendinitis, desmits and joint disease, being mainly used for tendinitis in the superficial digital flexor tendon (SDFT). The intralesional application of PRP stimulates the reestablishment of tissues' biomechanical normal properties, promoting its regenerative capacity and accelerating all processes related to its complete restoration. The PRP can be obtained by three basic techniques: by tube (manual), spinning (semiautomatic) and apheresis (automatic). Although there are numerous preparation protocols, an ideal and standardized method for obtaining PRP has not yet been developed. This study aimed to conduct a literature review about PRP, associated to its importance at horses' tendinitis treatment. An anatomic review of equine tendon has been approached, stressing the platelets' importance for wound healing and tissue regeneration, the PRP's obtainment methods and all the variables that can influence its achievement. Towards that, a survey gathering clinical investigations supporting PRP use in horses was addressed.

Keywords: PRP. Horses. Tendinitis. Platelets. Growth factors. Therapy regenerative.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
cm	Centímetro
EGF	Fator de crescimento epidérmico
g	Força da gravidade
FCR	Força centrífuga relativa
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GF's	Fatores de crescimento
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
LS	Ligamento suspensório
IGF	Fator de crescimento insulínico
MA	Membro anterior
MEC	Matriz extracelular
mEq	Miliequivalente
min	Minutos
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
mL	Mililitros
MMP's	Metaloproteinases de matriz
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
mol/L	Mol por litro
nm	Nanômetros
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
rpm	Rotações por minuto
TFDS	Tendão flexor digital superficial
TFDP	Tendão flexor digital profundo
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Curva tensão-deformação	14
FIGURA 2	Imagem de ultrassom. Lesão central no TFDS	15
FIGURA 3	Equino ao galope. Hiperextensão do boleto, ligamento suspensório e dos tendões dos músculos flexores do membro anterior esquerdo.....	16
FIGURA 4	Esfregação de sangue. Evidenciando (seta) plaqueta equina.....	19
FIGURA 5	Micrografias através de microscopia eletrônica de transmissão. (A) Plaqueta equina inativa. (B) Plaqueta equina ativada. MP: membrana plasmática. α : grânulos alfa. P: pseudópodo. G: glicogênio	22
FIGURA 6	Fotomicroscopia de luz. (A) Fibras colágenas e fibroblastos com diferentes tamanhos e formas dispostas aleatoriamente (grupo controle). (B) Fibras colágenas e fibroblastos predominantemente alongados, dispostos de forma mais regular (grupo tratado com PRP)	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Fatores de crescimento armazenados nos grânulos α das plaquetas	21
TABELA 2	Diferentes protocolos de centrifugação com variação da força centrífuga relativa e variação do tempo para obtenção do PRP	26
TABELA 3	Força centrífuga relativa e tempo de centrifugação dos protocolos usados para obtenção de PRP	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Tendão equino	12
3.1.1	Anatomia do tendão	12
3.1.2	Propriedades biomecânicas dos tendões	13
3.1.3	Fisiopatologia da lesão tendínea	14
3.1.4	Terapia regenerativa	17
3.2	Plaquetas.....	19
3.2.1	Membrana plasmática plaquetária	19
3.2.2	Citoplasma plaquetário	20
3.2.3	Ativação plaquetária	22
3.2.4	Função plaquetária	22
3.3	Plasma Rico em Plaquetas	24
3.3.1	Métodos de centrifugação para obtenção do PRP	24
3.3.2	Variáveis que influenciam a obtenção do PRP	27
3.3.3	Investigações que sustentam o uso clínico do PRP em equinos	28
3.3.4	Uso do PRP no tratamento de tendinites em equinos	29
4	EXPERIÊNCIA CLÍNICA ACOMPANHADA	32
5	CONCLUSÕES.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

As patologias mais comuns nos equinos são aquelas que afetam o aparelho locomotor (CARMONA; LOPEZ, 2011). As causas para o aparecimento das lesões locomotoras são: excesso de exercício, treinamento precoce, estiramento dos tecidos moles, fadiga, má conformação, entre outras (McILWRAITH, 2006). Estudos realizados em cavalos puros sangue de corrida, sugerem que essas lesões produzem importantes perdas econômicas (HALPER et al., 2006) representando cerca de 82% dos problemas de perda de rendimento manifestado clinicamente na corrida. Entre 46% a 53% são lesões de tecidos moles, tendões e ligamentos (THORPE; CLEGG; BIRCH, 2010).

As inflamações nos tendões, tendinites, possuem componentes agudos inflamatórios, todavia possuem características degenerativas crônicas resultantes do acúmulo ou da repetição de microlesões (McILWRAITH, 2006). O tendão lesionado cicatriza lentamente, como também o tecido reparado não possui as mesmas características de elasticidade e força em relação ao tecido original (DAHLGREN, 2007). O equino acometido é afastado das competições permanecendo meses em recuperação. Muitas vezes, seu retorno ao desempenho atlético inicial é incerto e existe grande possibilidade da lesão retornar (HALPER et al., 2006).

O tratamento clínico convencional para tendinite inclui a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais, glicosaminoglicanos polissulfatados, anti-inflamatórios esteroidais e ácido hialurônico. Além de repouso e terapia com gelo (SMITH; SCHRAMME, 2003; McILWRAITH, 2006). Por outro lado, essas terapias de tratamento convencionais têm demonstrado incapacidade de alterar a evolução da formação de uma cicatriz disfuncional após a lesão.

Todos estes fatores conduziram à investigação de tratamentos que promovam a regeneração tecidual. Dentre as terapias regenerativas, destacamos o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) um derivado do sangue total onde obtemos altas concentrações plaquetárias e fatores de crescimento importantes na regeneração tecidual, devido à ação mitogênica, quimiotáxica e neovascular (CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009; CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011). A aplicação de PRP intralesional auxilia o restabelecimento das propriedades biomecânicas normais dos tecidos, estimulando sua capacidade regenerativa e acelerando todos os processos inerentes à sua restauração (CARMONA et al., 2009).

3 OBJETIVOS

Esse trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre o PRP associado ao tratamento da tendinite em equinos.

Será exposta uma revisão anatômica do tendão equino com ênfase na importância das plaquetas na cicatrização e regeneração dos tecidos, os métodos de obtenção do PRP, as variáveis que influenciam a obtenção do PRP e um levantamento de investigações clínicas que sustentam o uso do PRP em equinos.

Será descrito a experiência clínica acompanhada durante o estágio extracurricular na Clínica Hípica, situada na cidade de Porto Alegre/RS – Brasil..

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tendão equino

3.1.1 Anatomia do tendão

O tendão é uma faixa espessa de tecido conjuntivo fibroso que age como um intermediário na ligação do músculo ao osso. A estrutura tendínea dos equinos constitui-se de unidades arranjadas longitudinalmente denominadas fascículos, que, por sua vez, são compostos de fibrilas de colágeno tipo I com uma matriz extracelular de proteoglicanos, glicoproteínas, fibras elásticas, íons e água. Os fibroblastos, denominados tenoblastos, estão dispostos em longas fileiras paralelas nos espaços entre os feixes de colágeno (McILWRAITH, 2006; THORPE; CLEGG; BIRCH, 2010).

As fibrilas de colágeno são unidades fundamentais de resistência à tração em um tendão e são estruturas cilíndricas compostas principalmente por moléculas de colágeno tipo I. As fibras de colágeno são unidades submicroscópicas que se acredita possuírem, pelo menos, vários milímetros de comprimento. Foi estabelecido que a resistência das fibras de colágeno é determinada pelas ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas de colágeno dentro da fibrila (McILWRAITH, 2006).

O endotendão, constituído por um tecido conjuntivo frouxo trabeculado, localiza-se entre os feixes tendíneos e conduz os vasos sanguíneos, os vasos linfáticos e os nervos. O endotendão é uma extensão do epitendão, uma camada delicada que reveste intimamente a superfície do tendão. Externamente ao epitendão, o tendão é envolvido por uma bainha de tecido conjuntivo frouxo vascular do paratendão. O paratendão é elástico, maleável, permitindo a movimentação longitudinal do tendão (McILWRAITH, 2006).

A bainha tendínea possui uma cápsula externa fibrosa e uma membrana sinovial interna. A cápsula sinovial dobra-se ao redor do tendão de modo que as camadas parietal e visceral podem ser distinguidas, essas duas camadas são contínuas ao longo de uma prega denominada “mesotendão” (McILWRAITH, 2006).

Os ligamentos anulares, ou retináculos, são faixas fibrosas fortes, que atuam na manutenção do tendão na sua posição correta quando este passa por superfícies que podem causar alteração da posição (McILWRAITH, 2006).

Um tendão pode receber sangue a partir de quatro fontes: o músculo ou o osso ao qual o tendão liga-se, um mesotendão ou uma faixa de bainha sinovial e o paratendão, se não

existir uma bainha. O músculo e o osso fornecem sangue apenas para 25% do tendão nas porções proximal e distal, supõe-se que o paratendão tenha função relevante no suprimento sanguíneo (McILWRAITH, 2006).

3.1.2 Propriedades biomecânicas dos tendões

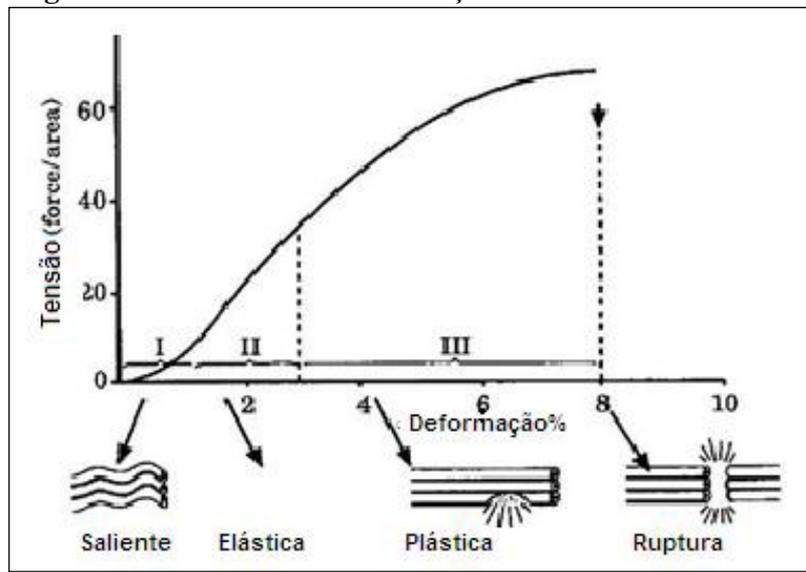
Em termos biomecânicos, o tendão serve principalmente como um transmissor de força. Transferindo passivamente as forças de tensão geradas pela contração do músculo correspondente até à articulação ou osso onde se inserem, para gerar movimento. Outras funções mecânicas recentemente atribuídas aos tendões incluem: amplificador mecânico durante contrações musculares rápidas, armazenamento de energia potencial elástica que é essencial aos andamentos mais rápidos, como o galope, e também um atenuador de forças durante um movimento rápido e súbito (McILWRAITH, 2006).

Os tendões possuem geralmente uma grande resistência à tensão e uma elasticidade diminuída. A rigidez dos tendões é dependente da taxa de deformação imposta. Em uma primeira fase da tensão uniaxial exercida sobre o tendão, esse se acomoda facilmente, entretanto se a extensão do mesmo continuar, a sua resposta à força será cada vez mais rígida (McILWRAITH, 2006). Essa transição corresponde ao desaparecimento do padrão ondulado da superfície tendínea, ocorrendo aproximadamente quando o tendão é sujeito a uma distensão correspondente a 2% ou 3% do seu comprimento (SMITH; GOODSHIP, 2004). Quando é removida a força o padrão retorna (McILWRAITH, 2002). Depois de ultrapassar o limite da sua capacidade elástica, o tendão assume propriedades viscoelásticas, sofrendo alterações estruturais irreversíveis ao nível da substância fundamental da matriz extracelular (McILWRAITH, 2006). Durante o alongamento do tendão, as fibras centrais são as primeiras a sofrerem extensão e recebem uma carga superior à recebida pelas fibras periféricas (SMITH; GOODSHIP, 2004). Logo, o desaparecimento do padrão ondulado de um modo diferenciado é um fator que contribui para a ocorrência das lesões centrais nos tendões equinos (SMITH, 2011).

A curva tensão-deformação (figura 1) possui quatro fases distintas. A “Fase saliente” é a fase inicial de acomodação. A “Fase elástica” caracteriza a elasticidade do tendão. Segundo Smith (2011) quanto mais rígida a estrutura tendínea mais curta será esta fase. A atividade fisiológica normal do tendão ocorre nesta fase (McILWRAITH, 2006). A “Fase plástica” ou “Fase de deformação plástica” ocorre quando se excede o limite elástico do tecido e o tendão torna-se permanentemente deformado, talvez devido a interrupção das ligações cruzadas

covalentes e o deslizamento das fibrilas de colágeno (SMITH, 2011). Segundo Smith (2011), durante a “Fase de ruptura”, a curva de stress-tensão desce rapidamente para zero devido à ruptura sequencial das fibrilas de colágeno; a ruptura total do tecido pode ocorrer devido a um único evento ou em virtude de sobrecargas repetitivas.

Figura 1 – Curva tensão-deformação



Fonte: Adaptado de Sharma e Maffulli (2005).

3.1.3 Fisiopatologia da lesão tendínea

O estiramento de um tendão pode levar de uma inflamação de pouca importância a uma ruptura do tendão ou sua avulsão na inserção óssea correspondente (SMITH; SCHRAMME, 2003; McILWRAITH, 2006). Distensões ou entorses menos graves dos tendões flexores dos membros torácicos são comuns em cavalos de grande desempenho. A resultante resposta inflamatória induzida pela distensão pode causar uma tendinite, afetando o corpo do tendão, ou uma tenossinovite, quando afeta o tendão e a bainha tendínea (KNOTTENBELT; PASCOE, 1998).

A tendinite dos tendões flexores, de modo geral, e a tendinite do tendão flexor digital superficial (TFDS), são causas comuns de claudicação em cavalos de corrida, assim como em outros cavalos atletas (SMITH; SCHRAMME, 2003; MCILWRAITH, 2006). Fadiga e treinamento inadequado podem fazer parte da patogênese (KNOTTENBELT; PASCOE, 1998). O TFDS dos membros anteriores é o local afetado com maior frequência (SMITH; SCHRAMME, 2003). Lesões similares também ocorrem no tendão flexor digital profundo

(TFDP). A tendinite resulta em alta morbidade, com períodos prolongados de afastamento da atividade física (McILWRAITH, 2006). As tendinites podem ser classificadas em agudas, caracterizando-se como tendinites mais severas com dor significativa, calor e tumefação (KNOTTENBELT; PASCOE, 1998), e as tendinites crônicas (degenerativas) que apresentam deterioração generalizada da matriz extracelular, com diminuição significativa de colágeno tipo I, ausência de reação (infiltração) inflamatória do tendão e diminuição na vascularização (CARMONA; LÓPEZ, 2011).

A região do TFDS ao nível da parte média da canela é a estrutura mais comumente afetada (KNOTTENBELT; PASCOE, 1998; McILWRAITH, 2006), tipicamente apresentando-se a ultrassonografia como um centro anecoico ou hipoeicoico circundado por um tecido de aparência normal (figura 2) (BAXTER, 2011). Nessa região metacárpica do TFDS, existe uma menor área de secção transversa e, embora essa região contenha proporcionalmente mais fibras longitudinais de colágeno de sustentação de cargas que outras; essas fibras não são suficientes para compensar a área menor de secção transversa (McILWRAITH, 2006). Têm-se proposto diferentes mecanismos (bioquímicos e físicos) para explicar a causa da lesão central no TFDS. As causas bioquímicas incluem mecanismos de hipóxia isquêmica, reperfusão, entre outras. As causas físicas incluem sobrecarga e hipertermia (GOODSHIP; BIRCH; WILSON, 1994; SMITH; SCHRAMME, 2003; CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009).

Figura 2 – Imagem de ultrassom. Lesão central no TFDS.



Fonte: Baxter (2011).

O cavalo durante o galope (figura 3), quando os membros anteriores tocam o solo, o boleto é hiperestendido e os tendões flexores submetidos à carga de tração muito alta. Para maximizar a energia armazenada, os tendões alongam-se a um ponto próximo ao da falha, acreditando-se que isso possa contar para uma incidência relativamente alta de lesão durante a atividade atlética (McILWRAITH, 2006). Segundo Knottenbelt e Pascoe (1998), muitas lesões são decorrentes de pancadas durante o exercício, quando o membro posterior alcança o tendão do membro anterior contra lateral. Provavelmente a maioria das lesões aos tendões desenvolve-se lentamente e cicatriza com extrema lentidão.

Figura 3 – Equino ao galope. Hiperextensão do boleto, ligamento suspensório e dos tendões dos músculos flexores do membro anterior (MA) esquerdo.



Fonte: Schultz (2004).

Os tendões depois de lesionados cicatrizam muito lentamente, como também não voltam a recuperar suas características biomecânicas originais (GOODSHIP; BIRCH; WILSON, 1994). Quando um equino sofre um episódio de tendinite, é muito provável que volte a repetir a lesão, em um grau semelhante ao anterior, ou ainda, com maiores consequências (SMITH; SCHRAMME, 2003).

É importante considerar, independente da causa inicial, que se produzem trocas bioquímicas (ex. expressão de citocinas catabólicas e ativação exagerada das metaloproteinases de matriz (MMP's)) e celulares (ex. apoptose de tenoblastos e proliferação de miofibroblastos, entre outros) (GOODSHIP; BIRCH; WILSON, 1994; CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009) produzindo impactos estruturais e funcionais negativos sobre o tendão, que com o tempo geram uma lesão clínica (SMITH; SCHRAMME, 2003).

Depois da lesão, o processo de reparação do tendão segue os mesmos padrões básicos que se observam na maioria dos tecidos corporais. A ruptura fibrilar inicial é seguida de uma hemorragia e um hematoma com conseqüente formação de uma malha de fibrina, acompanhado de edema e inflamação. Logo, chegam os macrófagos que eliminam os resíduos do processo inflamatório e de maneira sobreposta os fibroblastos começam a formar uma cicatriz. O novo tecido de cicatrização apresenta uma deposição inicial desorganizada de colágeno tipo III. Posteriormente, apresenta um processo de maturação com aumento das fibras de colágeno tipo I, que possuem maior diâmetro organizando-se paralelamente, mais parecido com a forma tendínea original (GOODSHIP; BIRCH; WILSON, 1994; SMITH; SCHRAMME, 2003).

3.1.4 Terapia regenerativa

A medicina regenerativa concentra-se em estratégias terapêuticas que permitem substituir ou restaurar os tecidos lesados diminuindo o envelhecimento das células no corpo e assim melhorando sua função (GURTNER; CALLAGHAN; LONGAKER, 2007; BROCKES; KUMAR, 2008). O objetivo principal é obter a regeneração dos tecidos e evitar a cicatrização disfuncional dos mesmos (CARMONA; LÓPEZ, 2011).

Diferentes revisões sobre a fisiopatologia das lesões de tendões são feitas com ênfase sobre a influência dos fatores físicos (estresse mecânico, hipertermia, excesso de treinamento,...) na deterioração dessas estruturas (CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009). No entanto, atualmente é necessário incluir alguns fatores bioquímicos, que anteriormente eram pouco citados dentro dos mecanismos fisiopatológicos (CARMONA; LÓPEZ, 2011).

Recentemente descreveu-se a presença de citocinas catabólicas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina um (IL-1 α) e a interleucina um β (IL-1 β) em biópsias de tendões equinos com tendinite crônica do TFDS (HOSAKA et al., 2002). Ademais, alguns fatores de crescimento (GF's), como o fator de crescimento transformante β (TGF- β), diminuem suas concentrações na matriz extracelular tendínea, à medida que o animal envelhece. Sabe-se que o TGF- β é crucial na síntese de colágeno tipo I (SMITH; SCHRAMME, 2003).

O tendão é basicamente composto de colágeno tipo I. Sabe-se que as células dessa classe tecidual interagem entre si por meio de numerosas citocinas celulares, fatores de crescimento e diversas enzimas proteolíticas. Essa interação é muito importante para manter a

saúde tecidual, visto que assegura o equilíbrio entre a proliferação das células residentes, a síntese e a degradação dos diferentes componentes da matriz extracelular (CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009; CARMONA; PRADES, 2009).

A partir do conhecimento, das interações celulares mediadas pelas citocinas pode-se explicar uma das causas do fracasso dos tratamentos convencionais das patologias tendíneas e ligamentares. Geralmente, a terapia farmacológica através da utilização de anti-inflamatórios não esteroidais, como também os anti-inflamatórios esteroidais ou corticoides atuam nos sinais clínicos. Não obstante, os anti-inflamatórios podem agravar as lesões, ao inibir a síntese de moléculas, por exemplo, as prostaglandinas. Ademais, alterar a expressão de genes fundamentais (ex. genes para cicloxigenases) nos processos de resolução da inflamação, reparação ou regeneração tecidual do tendão. Também é lógico pensar que os tratamentos com ácido hialurônico e os glicosaminoglicanos polissulfatos podem ser mais racionais no manejo dessas patologias, já que ambas as substâncias são componentes naturais da matriz extracelular (SMITH; SCHRAMME, 2003).

Atualmente, iniciou-se uma busca por compostos biológicos com efeitos de regeneração: “terapia regenerativa”. Em equinos, tem-se realizado diferentes investigações *in vitro* (NIXON; BROWER-TOLAND; SANDELL, 1999) e *in vivo* com enfoque na terapia regenerativa em lesões do TFDS e do ligamento suspensório (LS) (DAHLGREN et al., 2002). Também, tem-se documentado investigações clínicas sobre o uso do PRP como tratamento de patologias crônicas do aparelho locomotor de equinos (CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009) e a injeção intralesional de células tronco como tratamento das tendinites do TFDS (SMITH et al., 2003).

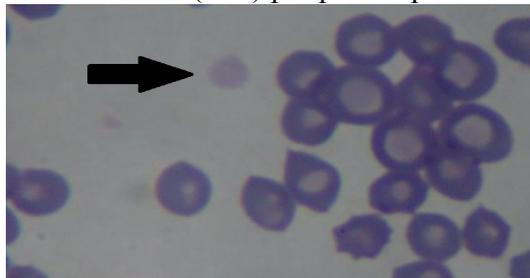
O PRP vem sendo pesquisado por diversos autores em relação aos métodos para sua obtenção (CARMONA, 2006; PRADES et al., 2006; CARMONA; LÓPEZ; PRADES, 2009; VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009; MAIA et al., 2009a; MAIA; SOUZA, 2009; CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011; VENDRUSCOLO et al., 2012b; PEREIRA et al., 2013). Por outro lado, além das pesquisas de obtenção, o PRP tem sido estudado quanto sua utilização clínica em patologias do aparelho locomotor de equinos: desmites do LS (DAHLGREN et al., 2002; ABELLANET, 2009), doenças articulares (CARMONA et al., 2007; CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011; YAMADA et al., 2012) e tendinites do TFDS (MAIA, 2008; ABELLANET, 2009; FORTIER, 2009; BOSCH, et al., 2010; MEIRELES et al., 2010), com efeitos positivos, melhorando a migração e proliferação celular, angiogênese e deposição de matriz extracelular na cicatrização tecidual (VENDRUSCOLO et al., 2012b).

3.2 Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados, discoides, derivados dos megacariócitos da medula óssea e sobrevivem aproximadamente dez dias na circulação sanguínea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; BOUDREAUX, 2010; VENDRUSCOLO et al., 2012a). Os megacariócitos, células gigantes e multinucleadas, representam aproximadamente 0,1-0,5% das células da medula óssea. Essas células encontram-se na região mais profunda da medula óssea e emitem prolongamentos citoplasmáticos (pró-plaquetas). Esses prolongamentos são seccionados e liberam as plaquetas na corrente sanguínea (CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011).

As plaquetas de equinos (figura 4) são menores e de coloração mais pálida em comparação com plaquetas de outros animais domésticos (LATIMER; RAKICH, 2002) possuindo de 5-7 μm de comprimento por 1-3 μm de largura. As plaquetas contêm no citoplasma várias proteínas, citocinas e fatores bioativos que estão envolvidos com a regulação dos aspectos básicos da reparação tecidual (VENDRUSCOLO et al., 2012a), além de promover a coagulação sanguínea e auxiliar a reparação da parede dos vasos sanguíneos, evitando perda de sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 4 – Esfregaço de sangue. Evidenciando (seta) plaqueta equina.



Fonte: LACVET/UFRGS (2014).

3.2.1 Membrana plasmática plaquetária

A membrana plasmática das plaquetas compõe-se de três camadas: glicocálix, bicamada fosfolipídica e a camada submembranosa (TABLIN, 2000; BOUDREAUX, 2010). O glicocálix é a camada exterior que contém receptores glicoproteicos envolvidos na ativação e agregação plaquetária (BOUDREAUX, 2010). Estas glicoproteínas constituem os antígenos de membrana das plaquetas, que se dividem em três famílias: integrinas, proteínas ricas em

leucina e selectinas. Uma bicamada fosfolipídica assimétrica com propriedades anticoagulantes constitui a camada central (TABLIN, 2000). As integrinas produzem agregação e adesão plaquetária (BOUDREAUX, 2010). As integrinas estão constituídas por duas subunidades e estão conectadas internamente com o citoplasma plaquetário. A parte interior das integrinas está associada com as proteínas de sinalização (proteína G, tirosina-quinase) e fosfoinosítois. A p-selectina é a principal glicoproteína de adesão das plaquetas e megacariócitos (GENTRY, 2000).

Os microtúbulos são estruturas cilíndricas localizadas abaixo da membrana plasmática. São responsáveis pela manutenção da forma de disco das plaquetas na circulação, como também atuam durante a fragmentação plaquetária a partir do citoplasma megacariocitário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; BOUDREAUX, 2010). As plaquetas têm um sistema de canais, o sistema canalicular aberto, que se comunica com invaginações da plaqueta. Assim o interior da plaqueta comunica-se livremente com sua superfície, disposição que tem importância funcional por facilitar a liberação de moléculas ativas que são armazenadas nas plaquetas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.2.2 Citoplasma plaquetário

A rede citoplasmática plaquetária está constituída por dois tipos de actina (globular e filamentosa). A actina filamentosa atua estruturando os diferentes grânulos plaquetários e as mitocôndrias. A resposta plaquetária é produzida por uma atividade contrátil mediada pela polimerização do complexo actina-miosina (GENTRY, 2000). As plaquetas dos mamíferos contêm três tipos de grânulos citoplasmáticos: lisossomais, densos e os grânulos α . Os grânulos lisossomais contêm enzimas proteolíticas e hidrolíticas como as glicosidases, lipases e proteases (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; BOUDREAUX, 2010). Os grânulos densos têm 250-300 nm de diâmetro armazenando ATP, ADP, 70% do cálcio plaquetário, fósforo e serotonina. Os grânulos α têm 300-500 nm contendo vários componentes (citocinas, quimiocinas, fatores da coagulação, fatores de crescimento, proteínas, entre outros) (BOUDREAUX, 2010). Entre os fatores de crescimento, destacamos alguns (tabela 1): fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento insulínico tipo I (IGF-I), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011).

Tabela 1 - Fatores de crescimento armazenados nos grânulos α das plaquetas.

FATOR DE CRESCIMENTO FORMA(S) BIOLÓGICA(S) RECEPTOR	EFEITOS BIOLÓGICOS DURANTE A CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS
Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y -DD. Dois receptores (PDGFRs): α y β .	Indutor da proliferação celular. Estimula a angiogênese e promove a expressão das metaloproteinases de matriz 1 (MMP-1) e seu inibidor tecidual (TIMP-1) na última fase da remodelação. Os produtos da proliferação de fibroblastos, migração epitelial, vascularização extensiva e a infiltração de neutrófilos.
Fator de crescimento transformante beta (TGF- β). TGF- β 1, - β 2, - β 3. Cinco receptores (T β Rs). T β R1 e T β R2 são os mais importantes.	Regula a expressão do colágeno e fibronectina. Restringe a degradação da matriz extracelular (MEC). Diminui a expressão das MMPs, promove a síntese das TIMPs e do fator de crescimento de fibroblastos e a produção de angiogênese. TGF- β 3 possui efeitos antifibróticos. Interação com T β R1 produz proliferação celular e com T β R2 síntese de MEC.
Fator de crescimento epidérmico (EGF). Um receptor EGF (EGFR)	Induz proliferação e diferenciação celular. É altamente expressado na margem das feridas promovendo a reepitelização. EGF induz a expressão de MMP-1 e regula a troca de colágeno tipo I.
Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). VEGF-B, -C, -D. Dois receptores: VEGFR-1 e R-2	Promove a vascularização dos tecidos lesionados e facilita a chegada de células inflamatórias e reparadoras. Tem efeitos sobre a proliferação de células do endotélio vascular.
Fator de crescimento de fibroblastos (FGF). FGF-1, -2, -4, -7, -9, -10 e -19.	FGF-1 (FGF básico) é uma potente proteína angiogênica e controla os depósitos de MEC.
Fator de crescimento insulínico (IGF). IGF-I e IGF II. Dos receptores: IGF-I-R e - II-R	IGF é em peptídeo anabólico. Produz proliferação celular e depósito de MEC.
Fator de crescimento de hepatócitos (HGF).	Esse peptídeo tem efeitos angiogênicos, visto que aumenta a expressão de VEGF.

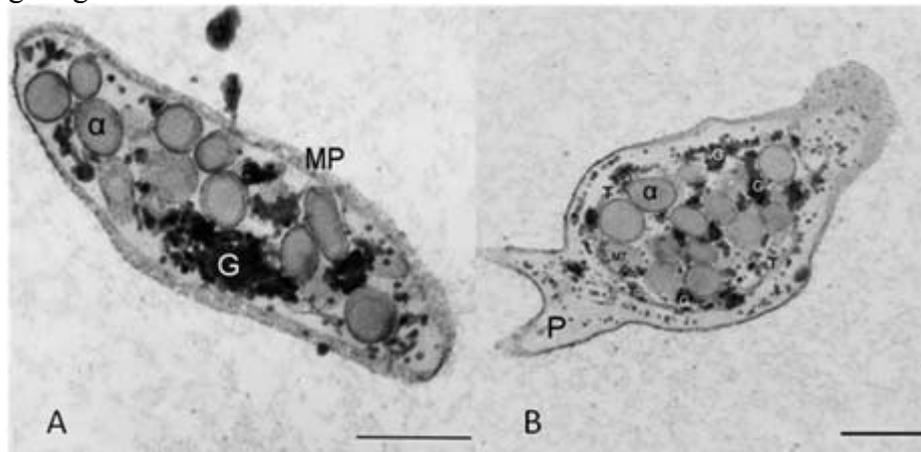
Fonte: Adaptado de Carmona; López e Giraldo (2011).

3.2.3 Ativação plaquetária

Na circulação, as plaquetas se encontram em estado inativo, pois estão em contato com substâncias produzidas pelo endotélio vascular que exercem efeito inibitório sobre a ativação plaquetária, como as prostaciclina e o óxido nítrico, que bloqueiam a liberação de cálcio (EVERTS et al., 2006). A ativação plaquetária pode ocorrer tanto por agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) como farmacológicos (ionóforos de cálcio), que exercem seu efeito através da interação com receptores localizados na membrana plaquetária (BLOCKMANS et al., 1995).

Uma vez as plaquetas ativadas, ocorre liberação de cálcio, polimerização da actina do citoesqueleto, promovendo a mudança da forma discoide para a esférica e a formação de pseudópodes, que promovem agregação plaquetária e subsequente liberação do conteúdo granular (EVERTS et al., 2006) (Figura 5). Primeiro, os grânulos α liberam seu conteúdo. Em seguida, os grânulos densos são ativados e, finalmente, os grânulos lisossomais liberam seus produtos proteolíticos (GENTRY, 2000).

Figura 5 – Micrografias através de microscopia eletrônica de transmissão. (A) Plaqueta equina inativa. (B) Plaqueta equina ativada. MP: membrana plasmática. α : grânulos alfa. P: pseudópodo. G: glicogênio.



Fonte: Adaptado de Carmona; López e Giraldo (2011).

3.2.4 Função Plaquetária

As plaquetas desempenham papel importante na hemostasia, bem como nos processos inflamatórios e de cicatrização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; VENDRUSCOLO et al.,

2012a). Quando existem poucas plaquetas ou estas estão afuncionais, pode-se instalar um quadro hemorrágico. Por outro lado, o excesso de ativação plaquetária leva a quadros tromboembólicos (BLOCKMANS et al., 1995). Após ocorrer a lesão, as reações mais importantes que levam à coagulação imediata são mediadas pelas plaquetas e por mudanças na parede vascular (EVERTS et al., 2006). Os processos que levam à coagulação incluem adesão plaquetária, agregação, liberação do conteúdo granular. Quando os agentes agonistas se ligam aos receptores plaquetários, eles induzem alterações nas glicoproteínas da membrana que permitem a ligação de proteínas que mediam a adesão e agregação plaquetária. Por sua vez, a ligação destas proteínas que promovem a adesão resulta em eventos que promovem, como também intensificam a liberação do conteúdo granular, agregação plaquetária, formação de fibrina e retração do coágulo (BOUDREAUX, 2010). Os principais agentes indutores da agregação plaquetária e liberação do conteúdo granular são o tromboxano, ADP e a trombina. Através destes três mecanismos, o tampão plaquetário é formado na tentativa de cessar a perda sanguínea, ativando em seguida o sistema de coagulação. A hemostasia secundária é ativada através dos fatores de coagulação e a formação de uma rede de fibrina que estabiliza o tampão plaquetário. Por fim, os leucócitos liberam citocinas na área afetada, que ativam a fibrinólise, levando à retração do coágulo (EVERTS et al., 2006).

O processo de cicatrização se inicia com a formação do tampão plaquetário, ativação da cascata de coagulação e liberação do conteúdo granular das plaquetas, com consequente liberação dos fatores de crescimento (EVERTS et al., 2006).

Os fatores de crescimento são peptídeos sinalizadores que regulam o metabolismo celular pela interação com um organizado complexo de receptores de superfície celular, pelas vias de sinalização intracelular e, finalmente, pelo aumento da transcrição de fatores e produção da matriz extracelular (DAHLGREN et al., 2001). Esses peptídeos liberados na matriz extracelular ligam-se ao receptor tirosina-quinase, presente nas células teciduais. A ativação desse receptor cursa com a sinalização de informações para genes responsáveis pelo controle da divisão celular. O RNAm é transcrito, produzindo assim uma resposta biológica que inicia a cascata que induz a reparação e regeneração tecidual (ANTONIADES; WILLIAMS, 1983). Resumidamente, os fatores de crescimento provenientes dos α grânulos plaquetários produzem quimiotaxia recrutando outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas, iniciando o processo inflamatório, bem como promovendo a angiogênese, que resulta em neovascularização e formação de um novo tecido conjuntivo, necessário à cicatrização (EVERTS, 2006).

3.3 Plasma Rico em Plaquetas

O PRP é um derivado do sangue total onde obtemos altas concentrações plaquetárias (VENDRUSCOLO et al., 2012a) e fatores de crescimento (TGF, PDGF, FGF, VEGF, EGF, IGF e HGF) importantes na regeneração tecidual, devido à ação mitogênica, quimiotáxica e neovascular (CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009; CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011). O PRP pode conter entre três a cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos (MAIA et al., 2009a; CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011) que, nos equinos, podem variar entre 100.000 e 350.000 plaquetas/ μ L (BOUDREAUX, 2010). Concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L são necessárias para o efeito terapêutico desejado (VENDRUSCOLO et al., 2012a).

PRP pode ser obtido basicamente por três técnicas: do tubo (manual), centrifugação (semiautomática) e por aférese (automática) (PRADES et al., 2006; CARMONA; PRADES; ARGUELLES, 2009). Todas as técnicas utilizadas para preparar o PRP apresentam vantagens e desvantagens (CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011). Nesses procedimentos variam o custo, facilidade de preparação, o volume de sangue necessário e a concentração de plaquetas obtida. A técnica manual tem custo mínimo, o volume utilizado é pequeno e o PRP é facilmente obtido, mas com pequena concentração de plaquetas. Na centrifugação os custos são baixos, porém é necessária a aquisição de uma centrífuga; o volume necessário é pequeno e também é de fácil obtenção, obtendo maior concentração de plaquetas. O método de aférese é caro, pois são necessários equipamentos e “kits” específicos; o volume de sangue necessário é grande, porém se obtém altas concentrações plaquetárias e maior volume de PRP (VENDRUSCOLO et al., 2012a).

Apesar de existirem inúmeros protocolos de preparação, ainda não foi desenvolvido um método ideal e padronizado para obtenção do concentrado de plaquetas e fatores de crescimento (CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011).

3.3.1 Métodos de centrifugação para obtenção do PRP

A obtenção do PRP pelo método de centrifugação é uma técnica simples e de baixo custo que consiste na coleta de sangue autógeno em tubos contendo citrato de sódio ou em bolsas de sangue contendo citrato/fosfato/dextrose/adenina como anticoagulante (CARMONA, 2006). Segundo Vendruscolo et al., (2012b) o citrato de sódio preserva a integridade da membrana plasmática plaquetária, podendo-se reverter o efeito anticoagulante

com a adição de cálcio à amostra viabilizando o seu uso nos géis de PRP, sendo o anticoagulante mais adequado no preparo.

No processamento, pode-se realizar uma ou duas centrifugações do sangue total. Os protocolos com duas centrifugações obtêm maiores concentrações plaquetárias do que com uma única centrifugação (CARMONA, 2006). A primeira centrifugação separa as células vermelhas ($7\mu\text{m}$ de diâmetro) e brancas ($7\text{-}15\mu\text{m}$ de diâmetro) das plaquetas, devido à diferença de densidade. Na segunda centrifugação ocorre a concentração das plaquetas, produzindo o PRP e o plasma pobre em plaquetas (PPP) (FOSTER et al., 2009). Protocolos com força centrífuga relativa (FCR) alta, que tem como unidade de medida a força da gravidade (g), não obtêm altas concentrações plaquetárias, provavelmente por ativar ou lesar as plaquetas durante a centrifugação levando a formação de *pellets* no fundo do tubo (MAIA et al., 2009a; VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009; VENDRUSCOLO et al., 2012b). O produto final resulta em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009) e fatores de crescimento sendo uma opção útil no tratamento de variadas lesões (MAIA; SOUZA, 2009).

Maia et al., (2009a) realizaram um estudo para obtenção de PRP. O sangue venoso foi coletado pela veia jugular de equinos em tubos com anticoagulante citrato de sódio. Realizou-se a primeira centrifugação das amostras a 120g por 5 min, descartando-se parte do plasma sanguíneo. O restante do plasma sanguíneo foi acondicionado em um novo tubo sem anticoagulante. Procedeu-se em seguida à segunda centrifugação do novo tubo a 473g por 5 min, descartando-se o sobrenadante, PPP, e reservando a fração remanescente denominada PRP. Para ativação do PRP adicionou-se 125 μL de solução de cloreto de cálcio a 0,0125 mol/L. Posteriormente, o PRP foi incubado em estufa a 22°C, por 2 horas, com a finalidade de estimular a degranulação plaquetária. Adicionalmente, procedeu-se nova centrifugação a 1.720g por 8 min, obtendo um PRP homogêneo sem coágulos de fibrina. A concentração plaquetária do PRP variou entre 320.000 e 500.000 plaquetas/ μL .

Vendruscolo et al., (2012b) desenvolveram um estudo para estabelecer um protocolo, entre diversos protocolos (tabela 2), para obtenção do PRP equino, que resulte na maior concentração de plaquetas. Nas avaliações dos resultados foi observado um aumento de 1,30 a 2,36 vezes em relação à concentração inicial das plaquetas no sangue total. Os resultados revelaram diferença ($p>0,05$) em relação às concentrações de plaquetas nos protocolos testados, porém os protocolos que apresentaram os melhores resultados (1, 2, 3 e 4) não diferiram ($p<0,05$) entre si. Com relação ao tempo de centrifugação não foi observada influência ($p<0,05$) na concentração de plaquetas. Já em relação à concentração de leucócitos,

células indesejáveis no PRP devido liberação de citocinas pró-inflamatórias, observou-se diminuição ($p<0,05$) na sua quantidade com o aumento do tempo nos protocolos de 1 a 6. A quantidade média de TGF- β 1 obtida nos protocolos não obteve diferença ($p<0,05$). Baseado nos resultados obtidos quanto à maior concentração plaquetária, o melhor protocolo foi o proposto por Carmona et al., (2007) conforme tabela 2.

Tabela 2 – Diferentes protocolos de centrifugação com variação da força centrífuga relativa e variação do tempo para obtenção do PRP.

Protocolo	Primeira centrifugação		Segunda centrifugação		Autor
	Força (g)	Tempo (min)	Força (g)	Tempo (min)	
1	120	5	240	5	Carmona et al., 2007.
2	120	10	240	10	
3	90	5	180	5	Vendruscolo et al., 2012.
4	90	10	180	10	
5	120	5	473	5	Maia et al., 2009a.
6	120	10	473	10	
7	300	5	640	5	De Rossi et al., 2009.
8	300	10	640	10	
9	350	5	510	5	Del Bue et al., 2007.
10	350	10	510	10	

Fonte: Adaptado de Vendruscolo et al., (2012b).

Pereira et al., (2013) avaliaram sete protocolos (tabela 3) de obtenção de PRP através do método de centrifugação quanto à capacidade de concentração de plaquetas, contaminação com leucócitos e hemácias e a correlação entre a capacidade de concentração plaquetária com os níveis do fator de crescimento TGF- β 1 nas amostras de PRP. Dez equinos sadios foram usados durante o experimento. Realizou-se a primeira centrifugação separando o plasma sanguíneo da capa leucocitária e das hemácias. O plasma sanguíneo foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado, conforme o protocolo. Após essa segunda centrifugação, o PPP foi descartado sendo conservado apenas o PRP, equivalente a 10% do volume do sangue total inicial. A partir dos resultados, não foi observada diferença na capacidade de concentrar plaquetas entre os sete protocolos neste estudo. Todos os protocolos testados permitiram concentrar plaquetas em média quatro vezes acima do número inicial presente no sangue total. Todas as amostras apresentaram leucócitos, o PI foi o protocolo que apresentou maior concentração desse parâmetro nas amostras analisadas ($P<0,05$). Não houve contaminação com hemácias nas amostras obtidas a partir dos PIII e PIV. Todavia, houve diferença significativa entre o PI e os demais protocolos por este apresentar maior número de

hemácias e leucócitos nas amostras de PRP, sendo um protocolo inadequado para o volume de sangue utilizado. Não foi observada diferença entre os sete protocolos quanto à presença do TGF- β 1 ($P < 0,05$). Também não houve correlação entre a concentração plaquetária, contagem de plaquetas e a concentração de TGF- β 1 nos sete protocolos testados. Os autores concluíram que, mesmo os resultados não apresentando diferenças significativas quanto a capacidade de concentração plaquetária e os níveis de TGF- β 1 entre os sete protocolos, foi sugerido para obtenção do PRP os protocolos PIV, PV e PVI devido à menor contaminação com hemácias e leucócitos, as maiores médias de concentração de plaquetas e níveis consideráveis de TGF- β 1 nas amostras analisadas.

Tabela 3 – Força centrífuga relativa e tempo de centrifugação dos protocolos usados para obtenção de PRP.

Protocolo	Primeira centrifugação		Segunda centrifugação	
	Força (g)	Tempo (min)	Força (g)	Tempo (min)
I	120	5	240	5
II	120	10	240	10
III	300	10	640	10
IV	400	10	800	10
V	224	10	440	10
VI	113	10	652	5
VII	120	5	473	5

Fonte: Adaptado de Pereira et al, (2013).

3.3.2 Variáveis que influenciam a obtenção do PRP

A FCR, o tempo de centrifugação e a redução do volume plasmático são variáveis importantes que influenciam a qualidade do PRP (VENDRAMIN et al., 2006). A FCR, que é um fator importante para a separação dos componentes sanguíneos, depende da velocidade de centrifugação e do raio da centrífuga. Por isso, trabalhos que relatam apenas a velocidade de centrifugação, sem mencionar o raio da centrífuga, fornecem informações incompletas sobre a metodologia, pois uma velocidade de 1500 rpm, por exemplo, irá resultar numa maior força de centrifugação em uma centrífuga de 16 cm de raio do que numa de 12 cm de raio (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009).

Segundo Vendramin, Franco e Franco (2009) o aumento da FCR leva ao aumento da concentração plaquetária. Entretanto, utilizando 1600g, muitos tubos quebram durante o processo de centrifugação. Ainda, ao avaliarem a redução do volume plasmático em um estudo para obtenção de PRP através de sangue humano, retiraram dois terços do PPP,

obtendo uma concentração satisfatória de plaquetas (438%), porém havia uma variação na quantidade de PRP produzida. Por isso, fixaram que o volume de PRP produzido seria 10% do volume de sangue utilizado. Com isso, obtiveram mais plaquetas, fornecendo um PRP de melhor qualidade, com uma concentração plaquetária em média 570% maior que a dosagem do sangue total.

3.3.3 Investigações que sustentam o uso clínico do PRP em equinos

O PRP atua na modulação e aceleração dos processos cicatriciais, sendo esses efeitos decorrentes dos fatores de crescimento contidos nos grânulos plaquetários (DINATO et al., 2001). As plaquetas e os GF's têm sido avaliados individualmente na cartilagem e no tendão equino. Esses GF's incrementam a síntese da matriz extracelular da cartilagem e produzem proliferação de condrócitos tendo um efeito benéfico sobre a cartilagem articular (CARMONA; LÓPEZ; GIRALDO, 2011).

Carter et al., (2003) utilizaram PRP na forma de gel ativado com trombina para o tratamento de feridas de pele em membros e observaram que o PRP acelerou a diferenciação epitelial e produziu tecido com fibras de colágeno organizadas e entrelaçadas.

Carmona et al., (2007) utilizaram PRP intra-articular para o tratamento de osteoartrite em quatro equinos, realizando três aplicações com intervalos de 14 dias. Eles observaram melhora no grau de claudicação e redução da efusão articular dois meses após o último tratamento. Corroborando com os resultados obtidos por Carmona, López e Prades (2009) que avaliaram a aplicação de PRP para tratamento de lesões de osteocondrite dissecante (OCD) de quatro equinos, como também lesões de osteoartrite de três equinos. A administração intra-articular melhorou gradualmente o grau de claudicação, sendo mais evidente depois do terceiro tratamento, como também reduziu a efusão articular. Em ambos os estudos, nenhum efeito adverso foi observado com a utilização do PRP intra-articular.

Yamada et al., (2012) estudaram a eficácia do PRP no tratamento de lesões condrais articulares. A lesão condral foi induzida na tróclea medial femoral dos dois membros pélvicos de quatro animais. Após 30 dias da indução, as oito articulações foram divididas em dois grupos. Os animais do grupo I (GI) receberam o tratamento intralesional com PRP, e os do grupo II (GII) foram tratados apenas com solução fisiológica. Foram realizados exames de claudicação, avaliações macroscópicas, histológicas e histoquímicas durante os 150 dias de experimento. Os equinos do GI apresentaram melhora do grau de claudicação em relação aos do GII. No 150º dia, foram observadas sinovite e irregularidades ao redor da lesão,

principalmente no GII. Os dois grupos apresentaram formação de fibrocartilagem, com diferentes intensidades de fibrose cicatricial e feixes de fibras colágenas desorganizadas. Os equinos do GII apresentaram, predominantemente, células fibroblastoides. No entanto, os animais do GI apresentaram melhor organização tecidual e maior número aparente de condrócitos nos tecidos cicatriciais. Nos cortes corados com azul de toluidina, os equinos do GI apresentaram marcação moderada e irregular, enquanto os cortes nos do GII não se coraram pelo azul de toluidina. Essa resposta ao tratamento pode ser decorrente da capacidade do PRP em reduzir a resposta inflamatória e inibir enzimas catabólicas, favorecendo a organização do colágeno, a migração e a proliferação celular (CARTER et al., 2003). Os autores concluíram que a administração de PRP apresentou efeitos benéficos no tratamento de lesões condrais experimentais de equinos revelando um melhor tecido de reparação no GI através dos exames macroscópicos, histológicos e histoquímicos.

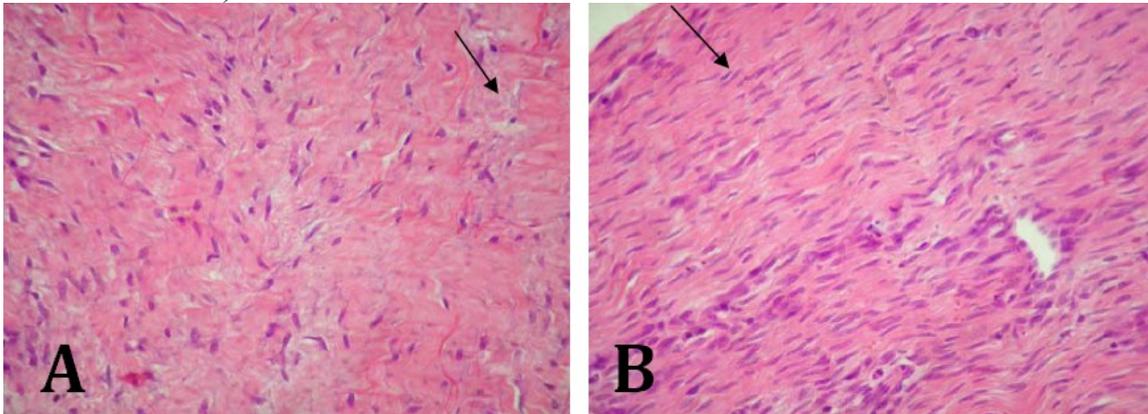
3.3.4 Uso do PRP no tratamento de tendinites em equinos

A utilização clínica do PRP para o tratamento de patologias do aparelho locomotor de equinos, principalmente as tendinopatias do TFDS, é muito recente. Carmona, López e Giraldo (2011) afirmam que o tratamento é seguro, como também as injeções de PRP não induzem reações adversas nos cavalos tratados desde que, tome-se o devido cuidado durante a preparação e aplicação do PRP.

Recentemente, Maia (2008) publicou um experimento avaliando o efeito do PRP no tratamento da tendinite de seis equinos. A tendinite do TFDS foi induzida em ambos os membros anteriores, pela administração intratendínea de colagenase. Doze dias após a indução da tendinite, todos os animais receberam dois tratamentos: aplicação de PRP no TFDS do MA direito (grupo tratado) e aplicação de NaCl 0,9% no TFDS do MA esquerdo (grupo controle). Realizaram-se exames ultrassonográficos avaliando a área transversal do tendão e da lesão, a intensidade e ecogenicidade da lesão, assim como o paralelismo das fibras colágenas. No 48º dia após os tratamentos, foi realizada biópsia da lesão para exame histopatológico (figura 6). A avaliação clínica realizada após tratamento com PRP revelou redução do edema e dor à palpação, bem como menor grau de claudicação. A partir da ultrassonografia observou-se redução da área transversal da lesão e da ecogenicidade da lesão em função do tempo. A análise histopatológica revelou, em ambos os tratamentos, atividade fibroblástica, neovascularização, infiltrado linfoplasmocitário, focos hemorrágicos e desorganização tecidual. O TFDS, que recebeu PRP, apresentou-se mais organizado, com

fibras colágenas e fibroblastos melhor dispostos na fibra tendínea. Maia (2008) concluiu que o PRP promove maior redução da área lesada e melhor organização tecidual.

Figura 6 – Fotomicroscopia de luz. (A) Fibras colágenas e fibroblastos com diferentes tamanhos e formas dispostas aleatoriamente (grupo controle). (B) Fibras colágenas e fibroblastos predominantemente alongados, dispostos de forma mais regular (grupo tratado com PRP).



Fonte: Adaptado de Maia (2008).

A síntese de colágeno tipo III aumenta após uma lesão tendínea. O colágeno tipo III forma ligações interfibrilares irregulares, contribuindo para uma estabilidade inicial, enquanto o colágeno tipo I aumenta gradualmente para restaurar a arquitetura normal do tendão. O tecido fibroso originado, após uma lesão tendínea, é composto por colágeno tipo III e por um alinhamento desorganizado das fibras tendíneas. As características biomecânicas pobres deste tecido cicatricial e a baixa taxa de reparação são responsáveis pela grande reincidência da tendinite. O uso de PRP resulta numa diminuição de colágeno tipo III, como também aumenta o colágeno tipo I, o que é benéfico para a reparação tecidual (FORTIER, 2009), corroborando com os resultados obtidos por Maia (2008).

Abellanet (2009) realizou um estudo clínico controlado onde avaliou o uso clínico do PRP em equinos. Foram utilizados 10 equinos com patologia tendínea do TFDP, 16 equinos com lesões do LS e 72 equinos com patologia tendínea do TFDS. Após o tratamento, os cavalos com tendinite do TFDP apresentaram melhora de 100% em comparação com o grupo controle (n=4) e uma recidiva de 17% dos cavalos tratados. Os equinos com desmiste do LS apresentaram uma melhora clínica de 90% versus 0% do grupo controle (n=16). Naqueles animais que receberam tratamento para tendinite do TFDS obteve-se uma melhora clínica de 80% versus 45% do grupo controle (n=9). Todos os animais tratados com PRP recuperam-se das lesões após seis meses do início do tratamento.

Bosch et al., (2010) realizaram um estudo sobre a qualidade da reparação de lesões tendíneas centrais induzidas mecanicamente em equinos. Observaram que, aos seis meses, o grupo de cavalos tratados com PRP apresentou uma melhor arquitetura histológica, maior conteúdo de colágeno tipo I, glicosaminoglicanos e maior resistência a tensão quando comparados ao grupo controle. Os tendões tratados com PRP obtiveram neovascularização do sítio da lesão devido aos fatores de crescimento.

Meireles et al., (2010) realizou um estudo em cinco equinos, entre quatro e seis anos de idade. No exame clínico específico do aparelho locomotor com auxílio da avaliação ultrassonográfica diagnosticou-se tendinite aguda e crônica do TFDS e TFDP, com diferentes graus de lesão. Em todos os casos foi realizada somente uma aplicação de PRP. Após duas semanas da aplicação intralesional de PRP, houve redução da claudicação, do edema, da sensibilidade e do calor local. A avaliação clínica e ultrassonográfica das lesões foram realizadas semanalmente durante três meses, para acompanhamento da resolução do processo inflamatório e da cicatrização tendínea. No exame ultrassonográfico de dois equinos do estudo observou-se que, após três semanas da aplicação de PRP, houve melhora da ecogenicidade e paralelismo das fibras tendíneas. Em dois animais, que apresentavam maior grau de ruptura do TFDS, após cinco semanas decorrentes do tratamento, as lesões apresentavam-se mais ecogênicas e com paralelismo de fibras colágenas. Entretanto, um equino que apesar de apresentar menor intensidade nas variáveis clínicas (edema, sensibilidade à palpação e calor), bem como menor percentual de ruptura em relação aos outros casos, observou-se maior período para início da reparação da estrutura tendínea. Os autores sugeriram que esta cicatrização tardia ocorreu por se tratar de uma lesão crônica.

4 EXPERIÊNCIA CLÍNICA ACOMPANHADA

Durante o período de 14 de agosto de 2012 até 26 de julho de 2014, totalizando 900 horas, realizei estágio extracurricular acompanhando a rotina de trabalho da Clínica Hípica. O local, há sete anos, situa-se nas dependências da Sociedade Hípica Porto Alegrense (SHPA) na cidade de Porto Alegre/RS - Brasil. O estágio teve a orientação técnica do Médico Veterinário Dr Jarbas Castro Jr.

A Clínica Hípica oferece serviços de atendimento veterinário para equinos na área de clínica e cirurgia (geral, ortopédica e abdominal), exames de compra, diagnóstico por imagem (radiologia digital, ultrassonografia, endoscopia e gastroscopia) e terapias biológicas (plasma rico em plaquetas, células tronco).

O estabelecimento conta com uma área física construída de 380 m², possuindo uma sala para a realização do atendimento clínico e os exames de diagnóstico por imagem, duas salas cirúrgicas, uma sala para indução e recuperação anestésica, sala para lavagem e esterilização dos materiais cirúrgicos, depósito, sala dos estagiários, escritório e dez baias para alojamento dos equinos internados. Em anexo à clínica, há uma pista de diagnóstico de claudicação.

As atividades diárias começavam às 08h00min da manhã, com o exame clínico e os tratamentos medicamentosos dos equinos internados. Os curativos dos mesmos eram feitos logo após as medicações. Ao longo do dia, acompanhavam-se os exames clínicos gerais e específicos dos cavalos que chegavam para consultar. Posteriormente ao atendimento, eram feitos os exames complementares através do diagnóstico por imagem dependendo da patologia. As cirurgias não emergenciais eram marcadas e realizadas preferencialmente no período da tarde, iniciando a partir das 14h00min. O expediente da clínica terminava às 18h00min, entretanto muitos equinos apresentando quadros clínicos de síndrome do abdômen agudo chegavam durante o período da noite, ocorrendo atendimentos e intervenções cirúrgicas emergenciais.

Os diagnósticos de claudicação eram uma das principais rotinas clínicas acompanhadas. O exame de claudicação era realizado em uma pista específica. Os cavalos crioulos, puro sangue de corrida e os brasileiros de hipismo estavam entre as principais raças atendidas. Foram inúmeros os casos clínicos acompanhados de equinos apresentando patologias que acometiam o aparelho locomotor. As enfermidades de tecidos moles e ósseas destacavam-se como as mais encontradas.

Os equinos que, após a realização do exame específico do aparelho locomotor, apresentavam aumento de volume tendíneo evidenciado por edema, calor e sensibilidade à palpação era obtido o diagnóstico provisório de tendinite, sendo os animais encaminhados ao exame complementar de ultrassonografia. A partir do exame de imagem, o tendão (TFDS ou TFDP) afetado que apresentasse um centro anecoico ou hipoeicoico circundado por um tecido de aparência normal era diagnosticado definitivamente a tendinite. É necessário ressaltar que, os exames de imagem são utilizados para apoiar ou eliminar a suspeita clínica e não devem ser usados isoladamente. Para o diagnóstico definitivo é necessário levar em consideração: o histórico de treinamento esportivo do equino, anamnese, inspeção visual em repouso e movimento, os sinais clínicos apresentados, bem como a associação do exame clínico com os exames complementares.

Entre as alternativas de tratamento clínico dos equinos com tendinite, dependendo do caso clínico, o Médico Veterinário responsável optava pela utilização do PRP (processado diretamente na clínica) sendo aplicado intralesional.

Para obtenção do PRP, realizava-se a tricotomia da veia jugular esquerda no terço proximal. A antisepsia do local era feita com solução de clorexidina 2% e algodão embebido em álcool 70°. A partir disso, o sangue venoso era coletado de maneira asséptica em tubos com anticoagulante citrato de sódio. Após a coleta, realizava-se a primeira centrifugação das amostras a 460g por 24 min, descartando-se 90% do plasma sanguíneo. Os 10% restantes do plasma sanguíneo juntamente com a capa leucocitária eram acondicionados em novos tubos sem anticoagulante. Procedia-se em seguida à segunda centrifugação dos novos tubos a 460g por 3 min, descartando-se o sobrenadante, PPP, e reservando a fração remanescente, PRP. Não era realizada a ativação plaquetária e o PRP era aplicado intralesional guiado através de ultrassonografia.

Posteriormente ao tratamento com PRP, realizavam-se exames ultrassonográficos nos equinos nos dias 15, 30 e 60 pós-aplicação, avaliando a área transversal do tendão e da lesão, a intensidade e ecogenicidade da lesão, assim como o paralelismo das fibras colágenas para o acompanhamento da cicatrização tendínea.

5 CONCLUSÕES

A revisão bibliográfica sobre a utilização do PRP no tratamento de tendinites em equinos nos permite concluir que:

O PRP é uma alternativa promissora de tratamento para as patologias que afetam o aparelho locomotor de equinos, principalmente na terapêutica da tendinite.

Os equinos tratados com PRP reduzem os escores de claudicação; diminuem o edema, o calor e a sensibilidade dolorosa no tendão afetado.

O PRP aumenta a neovascularização e a concentração de colágeno tipo I no local lesionado melhorando a organização tecidual das fibras tendíneas.

A área tendínea lesionada apresenta melhora na ecogenicidade, áreas mais hiperecoicas, ao exame de ultrassonografia após 150 dias do tratamento com PRP.

Entretanto, há alguns pontos de interrogação sobre o PRP que devem ser respondidos. São necessários mais estudos e investigações clínicas para determinar: o protocolo padrão para obtenção de PRP na espécie equina, o correto volume de PRP que deve ser aplicado na lesão, à frequência ideal de aplicação do PRP, o momento mais eficiente para o uso dessa terapia e determinar se há necessidade ou não da ativação das plaquetas.

REFERÊNCIAS

- ABELLANET, I. **La terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencia clínica y bioquímica que valida su utilización.** 2009. 250 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. 2009.
- ABELLANET, I.; PRADES, M. Repeated intralesional platelet rich plasma (PRP) injection evaluated in 72 sport horses with superficial flexor tendon injuries improves clinical scores and return to performance. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 11. , 2009, Guarujá. **Proceedings...** Guarujá: World Equine Veterinary Association, 2009.
- ANTONIADES, H. N.; WILLIAMS, L. T. Human platelet-derived growth factor: structure and function. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 42, n. 9, p. 2630-2634, Jun, 1983.
- BAXTER, G. M. et al. Tendon and ligament injuries and disease. In: _____. **Adams and Stashak's – lameness in horse.** 6th ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011, cap. 5, p. 1360.
- BLOCKMANS, D. et al. Platelet activation. **Blood Reviews**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 143-156, Sep. 1995.
- BOUDREAUX, M. K. Platelet structure. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology.** 6th ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010, cap. 75, p. 561-574.
- BOSCH, G. et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v. 28, n. 2, p. 211-217, Feb. 2010.
- CARMONA, J. U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse.** 2006. 91f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Autónoma de Barcelona, Bellaterra. 2006.
- 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, Apr. 2007.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Tendinopatía del tendón flexor digital superficial y desmopatía del ligamento suspensorio en caballos: fisiopatología y terapias regenerativas. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 43, p. 203-214. Apr. 2011.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; GIRALDO, C. E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 43, p. 1-10, Apr. 2011.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 41, p. 175-179, Mar. 2009.

CARMONA, J. U.; PRADES, M. Pathophysiology of osteoarthritis. **Compendium Equine**, Yardley, v. 4, n. 1, p. 28-40, Jan. 2009.

CARTER, C.A. et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 74, n. 3, p. 244-255, Jun. 2003.

DAHLGREN, L. A. Pathobiology of tendon and ligaments injuries. **Clinical techniques in equine practice**, v. 6, n. 3, p. 168-173, Sep. 2007.

DAHLGREN, L. A. et al. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, p. 910-919, Dec. 2002.

DINATO, C. J. et al. **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 315-342.

EVERTS, P. A. M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The journal of extracorporeal technology**, St. Paul, v. 38, n. 2, p. 174-187, Jun. 2006.

FOSTER, T. E. et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. **The American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v. 37, n. 11, p. 2259-2272, Nov. 2009.

FORTIER, L. A. Medical Therapies for Tendonitis. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 11. , 2009, Guarujá. **Proceedings...** Guarujá: World Equine Veterinary Association, 2009.

GENTRY, P. A. Platelet biology. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalman's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p. 459-466.

GOODSHIP, A.; BIRCH, H.; WILSON, A. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 10, p. 323-349, Aug. 1994.

GURTNER, G. C; CALLAGHAN, M. J; LONGAKER, M. T. Progress and potential for regenerative medicine. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 58, p. 299-312, 2007.

HALPER, J. et al. Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. **BMC Veterinary Research**, London, n. 12, v. 2, p.12, Apr. 2006.

HOSAKA, Y. Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendon in the horse. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64, n. 10, p. 945-947, Oct. 2002.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. Células do sangue. In: _____. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004, cap. 12, p. 236-237.

KNOTTENBELT, D. C.; PASCOE, R. R. **Afecções e distúrbios do cavalo**. São Paulo: Manole, 1998, p. 240-241.

LANDI, E.P. **Efeito da concentração plaquetária na coleta e criopreservação dos concentrados de plaquetas “secas” obtidas por aférese**. 2004. 106f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M. Peripheral blood smears. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Cytology and hematology of the horse**. 2rd ed. St. Louis: Mosby, 2002, p. 207.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica e histopatológica**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MAIA, L. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultrassonográfica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 3, p. 241-245, mar. 2009a.

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. 618-626, Aug. 2009b.

MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1267-1274, jul. 2009.

MEIRELES, M. G. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento de tendinite em equinos. In: XIX CIC, XII ENPOS II mostra científica, 2010, Pelotas. Periódicos... Pelotas. XII ENPOS II mostra científica, 2010.

McILWRAITH, C.W. Doenças das articulações, tendões, ligamentos e estruturas relacionadas. In: STASHAK, T. S. **Claudicação em equinos – segundo Adams**. 5 ed. São Paulo: Roca, 2006. cap. 7, p. 551-596.

NIXON, A.; BROWER-TOLAND, B.; SANDELL. L. Primary nucleotide structure of predominant and alternate splice forms of equine insulinlike growth factor I and their gene expression patterns in tissues. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 60, n. 10, p. 1234-1241, Oct. 1999.

PEREIRA, R. C. F. et al. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 6, p.1122-1127, jun. 2013.

PRADES, M. et al. Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair. In: ANNUAL MEETING EUROPEAN COLLEGE OF VETERINARY SURGEONS, 15. , 2006, Seville. **Proceedings...** Seville: European College of Veterinary Surgeons, 2006, p.211-216.

- SMITH, R. K. W. Pathophysiology of tendon injury. In: ROSS, M.W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2011, p. 694-706.
- SMITH, R. K. W.; GOODSHIP, A. E. Tendon and ligament physiology. In: HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, R.J. **Equine sports medicine and surgery: basic and clinical sciences of the equine athlete**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2004, p. 130-151.
- SMITH, R.; SCHRAMME, M. Tendon injury in the horse: current theories and therapies. **Practice**, v. 25, p. 529-539, 2003.
- SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Basic biology of tendon injury and healing. **The Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland**, Edinburgh, v. 3, n. 5, p. 309-316, Oct. 2005.
- SCHULTZ, B. L. Functional anatomy of the equine foreleg and hind leg. In: _____. **Howell equine handbook of tendon and ligament injuries**. Hoboken: Howell Book House, 2004, cap. 2, p. 19.
- TABLIN, F. Platelet structure and function. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalman's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000, p. 448-452.
- THORPE, C. T.; CLEGG, P. D.; BIRCH, H. L. A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? **Equine Veterinary Journal**, Hoboken, v. 42, n. 2, p. 174-180, Oct. 2010.
- VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 212-218, maio, 2009.
- VENDRAMIN, F. S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.
- VENDRUSCOLO, C. P. et al. Plasma rico em plaquetas: uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 33-43, mar. 2012a.
- VENDRUSCOLO, C. P. et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 106-110, fev. 2012b.
- YAMADA, A. L. M. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 2, p. 323-332, jan. 2012.
- ZANDIM, B. et al. Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 83-92, jan. 2012.