UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARATIVO DA UTILIZAÇÃO DE PRP (PLASMA RICO EM PLAQUETA) AUTÓLOGO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS METACARPIANAS EM EQÜINOS.

ASPECTOS MACROSCÓPICOS, HISTOPATOLÓGICOS, IMUNOISTOQUÍMICOS E MORFOMÉTRICOS.

VANESSA JUSTINIANO BERMEJO

Botucatu/SP

Julho/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARATIVO DA UTILIZAÇÃO DE PRP (PLASMA RICO EM PLAQUETA) AUTÓLOGO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS METACARPIANAS EM EQÜINOS.

ASPECTOS MACROSCÓPICOS, HISTOPATOLÓGICOS, IMUNOISTOQUÍMICOS E MORFOMÉTRICOS.

VANESSA JUSTINIANO BERMEJO

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra Ana Liz Garcia Alves

Botucatu – SP

Julho 2014

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Ana Liz Garcia Alves

Presidente da Banca e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu

_____

Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni

Membro da Banca

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu

_____

Profª. Drª. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Membro da Banca

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências - UNESP/Botucatu

I

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Profª. Drª. Ana Liz Garcia Alves, agradeço imensamente o carinho e dedicação que teve comigo, obrigado pela sua paciência e compreensão quanto as minhas falhas.

Aos professores colaboradores, Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni, Prof. Dr. Celso Antônio Rodrigues, Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe, Profª. Drª. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Profª. Drª. Flavia Delella, por dedicando um tempo para me ajudarem nas dificuldades e repassando seus ensinamentos.

Aos meus colegas, Mirian Rodrigues, Karoline Rodrigues, Juliana Alonso, Gustavo Parisi e Mariana Gonçalves. Aos residentes, Vitor, Diana, Marina e aos funcionários sempre prestativos, Clotilde “CLÔ” e Jairo.

Aos meus queridos e amados instrumentos de experimento, os equinos (Rosa, Mel, Luna, Gold, Jade e Gina), que com muito carinho agradeço por terem feito parte do experimento.

DEDICATÓRIA

Ao meu querido DEUS, que me proporcionou esperança e garra para seguir até aqui, mostrando sempre o caminho da verdade e confiança em mim mesma, me livrando das desesperanças e sofrimentos, para que pudesse realizar mais esta vitória.

Aos meus amados pais, IZAIAS e APARECIDA, que me incentivaram e dedicaram individualmente suas vida para que eu pudesse me destacar, desistindo de sonhos para que eu pudesse alcançar o meu.

Ao meu irmão, LUCAS, com suas experiências na vida acadêmica me auxiliou nas escolhas corretas e dignas de permanecer e lutar por essa conquista.

Aos meus avôs, IRIDE, MÁRIO, que com a ingenuidade e simplicidade me transformavam numa pessoa amada e vitoriosa e me demonstraram que simples gestos e a própria velhice basta apenas uma escolha para que possamos dizer: “eu já tentei e fui feliz”. Que com coragem e força vale a pena cada minuto de nossas vidas.

III

“Beleza dos Avessos

Às vezes na pressa de encontrar a gente não vê,
Quantas vezes desprezamos as pessoas,
Porque consideramos o “agora”,

É tão dolorido sermos vistos somente a partir do presente,
Quando as pessoas olham e só veêm o que temos no momento,
Isso é fascinante em Jesus,
Por isso ele era capaz de preferir quem ele preferia,
Porque Jesus não era um homem que se prendia no presente,

Os amantes nunca esgotam as criaturas amadas,
Porque o amor sobrevive de futuro....
Ele enxerga o que ainda não vimos,
Enxerga o que o outro ainda não é....vê o avesso!

A beleza do tecido tem um sustento,
Uma trama que está por trás....
Compreender as pessoas e amá-las só é possível,
No momento que entramos na trama do avesso.
Quando enxergamos aquilo que não somente os olhos
Podem revelar.... Podem conhecer,
Mas, sobretudo aquilo que ainda está oculto.

Deus nos ama porque consegue enxergar o que a gente ainda não é,
Mas pode ser.....

Pe. Fábio de Melo”

SUMÁRIO

Agradecimentos I

Listas de Figuras VI

Lista de Quadros e Tabelas VIII

Lista de Abreviaturas e Símbolos X

Resumo XII

Abstract XIV

1.Introdução e Justificativa do Projeto 2

2.Revisão de Literatura 5

2.1 Ferida 5

2.2 Reparação 9

2.3 Tratamento das Feridas 16

2.3.1 Plaquetas 16

2.3.2 Plasma Rico em Plaquetas 17

2.3.3 Fatores de Crescimento 20

3. Objetivos 27

3.1 Objetivo Geral 27

3.2 Objetivos Específicos 27

4. Materiais e Metódos 29

4.1 Animais Experimentais 29

4.2 Delineamento Experimental 30

4.3 Obtenção e Processamento do Material 31

4.4 Padronização do Protocolo de Obtenção e Aplicação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) 32

4.5 Aplicação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) 36

4.6 Procedimentos Clínicos após a Administração do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) 36

4.7 Avaliação Macroscópica e Morfométrica 37
4.8 Biópsia 37
4.9 Avaliaçãp Histopatológica 38
4.10 Avaliação Imunoistoquímica 39
5. Resultados 42
5.1 Avaliação Macroscópica e Morfométrica da Lesão 42
5.2 Descrição da Avaliação Macroscópica das Feridas 45
5.3 Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica da Reparação 52
6. Discussão 68
6.1 Plasma Rico em Plaquetas 65
6.2 Avaliação Macroscópica e Morfométrica 70
6.3 Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica 76
7. Conclusões 82
8. Cronograma de Execução 83
9. Referências 85
ARTIGOS 103
ANEXOS 122

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Obtenção de Plasma Rico em Plaqueta (PRP) para aplicação nos bordos da ferida induzida localizada na região metacarpiana de equinos. **43**

FIGURA 2. Esquematização da indução da ferida cutânea e aplicação do plasma rico em plaquetas (PRP). Na figura A mostra o molde de plástico utilizado para padronizar as feridas, nas figuras B, C e D esquematiza a indução cirúrgica, na figura E mostra a aplicação de PRP nos bordos da ferida do membro tratado e a figura F indica o término do procedimento finalizando com bandagem e fechamento da ferida. **44**

FIGURA 3. Visualização das feridas metacarpianas, observando a ferida tratada (figura esquerda) e a ferida controle (figura direita), apresentando sinais de inflamação no membro controle e no membro tratado uma aceleração do processo proliferativo. **48**

FIGURA 4. Reta estimada para ambos os grupos tratado e controle, mantendo o animal 1 no grupo. **52**

FIGURA 5. Reta estimada para ambos os grupos tratado e controle, excluindo o animal 1 no grupo. **53**

FIGURA 6. Visualização da ferida metacarpiana de um animal do experimento, evidenciando as feridas tratadas (membro direito) e controle (membro esquerdo), o animal em destaque é o número 1, onde houve alteração resultando na exacerbação. **54**

FIGURA 7. Na fotomicrografia, o círculo e a seta preta mostram um neovaso possivelmente uma vênula por apresentar paredes irregulares e menos espessas, as setas bordos indicam glândulas sebáceas que acompanham ao redor ou nas proximidades do folículo piloso que é indicado pela seta vermelha. **56**

FIGURA 8. Fotomicrografia de neoformação de vasos, evidenciando que a arteríola (A) vem acompanhada de uma vênula (V). **57**

FIGURA 9. Corte histológico ilustrando a região epidérmica e dérmica, evidenciando pelas setas pretas a presença de células de colágena na região da derme e possivelmente figuras de mitose indicadas por setas vermelhas. **58**

FIGURA 10. Fotomicrografia de Imunoistoquímica marcados pelo anticorpo IGF, nota-se a derme com tecido conjuntivo denso não modelado, presença de folículos pilosos (P), glândulas sebáceas (Se), glândulas sudoríparas (Sd) num corte transversal do tecido epitelial. **59**

FIGURA 11. Visualização da marcação de IGF em membros tratados, evidenciando com setas pretas as glândulas sebáceas e sudoríparas ao redor do folículo piloso (A), e na figura B marcação do IGF é menos expressiva em membros controle. Na figura C, a visualização de arteríolas e vênulas em formação, marcados pelo VEGF em membros tratados e na figura D a imunorreatividade para neovasos é pouco significativa em membros controle apresentados pelas setas pretas. **64**

FIGURA 12. As figuras acima representam cortes histológicos submetidos a técnica de imunoistoquímica, sendo aplicado para identificação de fatores de crescimento, alguns biomarcadores. Na figura A, B e D, observa-se a marcação de IGF (fator de crescimento derivado da insulina, a figura C e E representam o controle negativo. Nas figuras F,G e I, observa-se a marcação com PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), e a figura H representam o controle negativo. As figuras J,L e K representam a marcação do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e as figuras M e O representam a marcação com TGF B B (fator de crescimento transformante) e a figura N representa o controle negativo. **66**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. Escore Quantitativo da Presença de Dor e Exsudação dos Animais Tratados e Controles. **49**

QUADRO 2. Resultados relacionados a ferida incisional na região metacarpiana de equinos, referindo a altura versus largura. **49**

QUADRO 3. Resultados diferenciais das áreas entre os grupos tratados e controles. **50**

QUADRO 4. Resultados diferenciais das áreas entre os animais do grupos tratados e controles, evidenciando o animal número 1. **50**

QUADRO 5. Resultados diferenciais das áreas entre os animais do grupos tratados e controles, excluindo o animal número 1 da estatística. **51**

TABELA 1. Resultados Hematológicos dos animais mostrando o valor basal plaquetário e a contagem plaquetária resultando na concentração de plaquetas de 4 – 5 vezes comparado ao valor basal. **33**

TABELA 2. Média dos escores quantitativos de marcadores para cicatrização do controle negativo obtido no tempo 0 (dia zero, no momento da incisão cirúrgica) adquiridos a partir do software Image J. **60**

TABELA 3. Média dos escores quantitativos de marcadores para cicatrização do membro tratado com plasma rico em plaquetas (PRP) obtido no tempo 30 (30 dias pós lesão) adquiridos a partir do software Image J. **61**

TABELA 4. Média dos escores quantitativos de marcadores para cicatrização do membro controle que não recebeu tratamento com plasma rico em plaquetas (PRP) obtido no tempo 30 (30 dias pós lesão) adquiridos a partir do software Image J. **62**

TABELA 5. Média das concentrações dos fatores de crescimento no tempo 0 com o controle negativo e tempo 30 com os membros tratados e controles. **62**

LISTA DE ABREVIATURAS

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PPP – Plasma Pobre em Plaquetas

TGFβ – Fator de Crescimento Transformante Beta

PDGF – Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

IGF – Fator de Crescimento derivado da Insulina

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

Ki67 – Proteína 67

Wistar – espécie de ratos

Cm^2 – centímetro quadrado

CN – Controle Negativo

MT E – Membro Torácico Esquerdo

MT D – Membro Torácico Direito

Se – Glândula Sebácea

Sd – Glândula Sudorípara

E – Epitélio

P – Folículo Piloso

D – Derme

V – Vênula

A – Arteríola

mm – milímetro

DAB – Diaminobenzidina

pH – Potencial Hidrogênionico

PBS – Tampão Fosfato Salino

mg – Miligrama

Kg – Quilograma

% - Porcentagem

cm – Centímetro

XI

NaCl – Cloreto de Sódio

Na^{-} - Sódio

K^{+} - Potássio

H^{+} - Hidrogênio

µL – Micromilímetro

mL – Mililitro

UI – Unidade Internacional

FC – Fator de Crescimento

IR – Receptor de Insulina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

AMP – Adenosina Monofosfato Cíclico

ADP – Adenosina Di-Fosfato

MHC – Complexo de Imunohistocompatibilidade

IL – Interleucina

PAF – Fator Ativador de Plaquetas

B - Beta

XII

BERMEJO, V.J. Estudo Comparativo da Utilização do PRP (Plasma Rico em Plaquetas) Autólogo na Cicatrização de Feridas Metacarpianas em Equinos. Aspectos Macroscópicos, Morfométricos, Histopatológicos e Imunoistoquímicos. Botucatu, 2014, 122 p., Dissertação de Mestrado, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

A cicatrização da pele é o objetivo de estudos e pesquisas, devido ao seu interesse clínico, científico e econômico, principalmente devido à grande freqüência de feridas causadas por lesões em cavalos. A cura da ferida é um fenômeno fisiológico que se inicia a partir da perda da integridade da pele, gerando uma solução de continuidade que atinge as camadas subjacentes em diversos graus e depende de uma série de reações químicas (BERTONE,1989). Vários fatores influenciam a cicatrização após lesão traumática ou cirúrgica. Feridas abaixo do jarrete ou joelho nos eqüinos são um problema, mesmo em animais sadios. Contudo esta dificuldade não ocorre na parte superior do corpo, isto pode ser explicado ao baixo suprimento sanguíneo, baixa oxigenação, temperaturas mais baixas e um desequilíbrio de fatores de crescimento (DYSON, 1997). É essencial na reparação tecidual uma fonte rica em fatores de crescimento. As plaquetas atuam na hemostase, cicatrização de feridas, reepitelização, liberadora de diversos fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, promotores de crescimento e proliferação de fibroblastos que por sua vez proporciona

um aumento na síntese de colágeno, sendo o PRP uma fonte natural e segura, pois é plasma do próprio animal (DYSON, 1997). Esse trabalho tem como objetivo a avaliação

de eqüinos induzidos com uma solução de continuidade, ferida, na face dorsal da região metacarpiana dos membros torácicos, onde foram utilizados 6 animais da espécie eqüina, SRD, tendo como tratamento o uso de plasma rico em plaqueta (PRP) centrifugado e solução fisiológica. Os animais serão avaliados por parâmetros clínicos, morfométricos, avaliações histopatológicas e imunoistoquímicas durante 30 dias.

Palavras-chave: Equino; Ferida; Plasma Rico em Plaquetas; terapia.

XIV

BERMEJO, V.J. Comparative Study of the Use of PRP (Platelet Rich Plasma) Autologous in Wound Healing in Equine Metacarpal. Aspects Macroscopic Morphometric Histopathological and Immunohistochemical. Botucatu, 2014, 122p., Master Dissertation, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ABSTRACT

The healing of the skin is the purpose of study and research, due to its clinical, scientific and economic interest, mainly due to the high frequency of wounds caused by injuries in horses. The wound healing is a physiological phenomenon which starts from the loss of skin integrity, generating a continuous flow that reaches the underlying layers to different degrees and depends on a series of chemical reactions (Bertone, 1989). Several factors influence healing after traumatic or surgical injury. Wounds below the knee or hock in horses are a problem, even in healthy animals. However, this difficulty does not occur in the upper part of the body, this can be explained by low blood supply low oxygenation, lower temperatures and an imbalance of growth (DYSON, 1997) factors. It is essential in tissue repair a rich source of growth factors. Platelets act in hemostasis, wound healing, re-epithelialization, releasing several growth factors that stimulate angiogenesis, growth promoters and proliferation of fibroblasts which in turn provides an increase in collagen synthesis, the PRP being a natural source and secure because it is the animal's own plasma (DYSON, 1997). This study aims to evaluate horses induced with a solution of continuity, wound on the dorsal surface of the metacarpal region of the forelimb, where 6 animals of the equine species, SRD were used, with treatment as the use of platelet rich plasma (PRP) saline and centrifuged. The animals will be evaluated by clinical, morphometric, histopathological and immunohistochemical reviews for 30 days.

Keywords: Equine; Wound, Platelet Rich Plasm; therapy

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Feridas resultantes de traumatismos são causas comuns de substanciais perdas econômicas em medicina veterinária eqüina (SCOTT, 2011). A capacidade regenerativa é um fenômeno nos organismos vivos. O reparo tecidual ocorre de duas formas, pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização com o restabelecimento da hemostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz (BALBINO, 2005).

Danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam de imediato uma série de eventos que de forma simples se traduzem como inflamação. Estes sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química feita por compostos celulares rompidos, fragmentos teciduais inertes (colágeno, fibronectinas, elastinas) e proteínas séricas que extravasam pelos vasos e por ação de mediadores inflamatórios pré formados (liberados por plaquetas, mastócitos) e neossintetizados (eicosanóides e PAF) (CONTRAN, 2001 apud BALBINO, 2005; KUMAR et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2012).

Um segundo evento inflamatório é ativado, levando à liberação de mediadores de natureza peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídios), proteínas de adesão de neovasos permanecendo sobre a membrana endotelial e, além disso, a alteração físico-química como baixa saturação de oxigênio, mudança de pH e radicais

livres também sinalizam e ativam a reparação tissular (BALBINO, 2005; PAGANELA et al., 2009; LIMA et Al., 2012).

É essencial na reparação tecidual uma fonte rica em fatores de crescimento, e as plaquetas atuam na hemostasia, cicatrização de feridas, reepitelização, liberação de diversos fatores de crescimento estimulando a angiogênese e proliferação de fibroblastos que, por sua vez, proporciona um aumento na síntese de colágeno, sendo o PRP uma fonte natural e segura, pois é plasma do próprio animal (DYSON, 1997).

Apesar de existir várias formas de tratamento já testadas para acelerar o processo cicatricial em feridas, a utilização da técnica de obtenção de plasma rico em plaqueta autólogo derivando uma purificação.

Esse processo culmina em uma resposta natural e rápida de acelerar a diferenciação epitelial, crescimento e epitelização do tecido em questão e aumentar os mediadores e fatores de crescimento no local lesado, proporcionando o objetivo deste trabalho e gerando um potencial sinérgico no tratamento de feridas em equinos.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de plasma rico em plaquetas no tratamento de feridas metacarpianas de equinos através de acompanhamento macroscópico, morfométrico, histológico e imunoistoquímico.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERIDA

Histologicamente, a pele é dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si. A epiderme é a camada mais externa, composta por quatro camadas celulares: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células neuroendócrinas de Merkel. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo frouxo (camada Papilar) e tecido conjuntivo denso (camada reticular). A medida que camadas mais superficiais da epiderme são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular (BLANES, 2004; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008; ALMEIDA, 2011).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. Na derme situam-se os anexos da pele, muitos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna. A derme contém muitos tipos diferentes de células, incluindo fibroblastos e fibrócitos, macrófagos e leucócitos sanguíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Essa 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. O controle é realizado pelo hipotálamo e pelas fibras nervosas simpáticas sobre o fluxo sanguíneo na derme, propiciando um mecanismo de termorregulação (BLANES, 2004; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008; ALMEIDA, 2011).

Macrófagos, fibroblastos e neovasos, são suportados por uma matriz frouxa formada de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno, caracterizada por ser edematosa e com presença de muitos espaços vazios e vasos que sangram com facilidade, apresentando-se às vezes com aspecto granuloso, conhecido como granulação (GUIDUGLI-NETO, 1992; DUDLEY,1988). A ativação de fibroblastos é intensificada após presença de macrófagos da fase inflamatória, formando uma matriz provisória e quimioatraente, dando início a produção local de colágeno, essa matriz se torna tecido conjuntivo elástico, durante a fase fibroblástica decorrente da baixa oxigenação dar-se início a neovascularização (KNIGHTON et al, 1981).

O evento inicial pode vir decorrente de uma ruptura nas junções celulares ou nas células epiteliais, vasos sanguíneos e extravasamento dos seus constituintes, sendo a primeira resposta ao estímulo a vasoconstrição, que desencadeia outros eventos como a deposição de plaquetas que provisoriamente promove a hemostasia, o trombo que é formado pela ativação das plaquetas forma um substrato para os constituintes da reparação (LEFKOVITS et al, 1995). As plaquetas são atraídas através das proteínas de membrana e ativadas por fatores como colágeno exposto da lesão, trombina gerada do processo coagulativo, sendo fortes agonistas para ativação plaquetária (DAVIES, 1990; LEFKOVITS et al, 1995; AMBROSE, 1996; AMOS, 1996). O Fator ativador plaquetário, também é ativador e indutor plaquetário, e concomitantemente o ácido aracdônico que libera seus leucotrienos e tromboxanos, este que quando oxidado pelas enzimas é um potente vasoconstritor (COLLER, 1982). O fluxo sanguíneo sobre as células circulatórias diminui, devido à vasodilatação local causada pela formação de bradicinina, os neutrófilos são as primeiras células a chegar,

predominando no local e eliminando possíveis microrganismos e debris celulares através da fagocitose, tendo ainda uma segunda barreira quimiotática abaixo da superfície da lesão, sendo expressiva e seletiva a produção de interleucinas, principalmente a IL-8 (FINN, 2008). Os macrófagos juntamente com os neutrófilos auxiliam na fagocitose e apresentam o complexo de histocompatibilidade (MHC) criando um elo entre o sistema imune inato e adaptativo e também auxiliam produzindo e exportando mediadores peptídicos e lipídicos (NEWMAN et al, 1992; DI PIETRO,1995; RICHES, 1996).

A fase proliferativa de reparo envolve angiogênese, fibroplasia e epitelização (CHVAPIL, 1979). O processo torna-se responsivo a lesão através de sua própria anatomia, proporcionando estímulo celular migratório e proliferativo a partir das margens lesadas, as células vizinhas adquirem propriedades mitóticas, proliferando em direção ao centro da lesão e mesmo que haja presença de granulação, as margens se movimentam uma em direção a outra, em um efeito quimioatrativo (MONTESANI E ORCI, 1988; PEACOCK, 1984).

A matriz extracelular da pele é composta por plaquetas e plasma, sustentação para fibroblastos e macrófagos migratórios e também para formação de neovasos, que passam a produzir e auxiliar as células locais, como a fibronectina e ácido hialurônico, auxiliando na fixação e resistência tecidual e proporcionando um microambiente para a movimentação celular (BALBINO, 2005).

Com a maturação das células, o ácido hialurônico diminui e aumenta a síntese de proteoglicanos, essa diferenciação da matriz extracelular torna imóveis as células, favorecendo a maturidade das mesmas, os neovasos se diferenciam em células de

revestimento, assumindo funcionalidade de capilares e as células migratórias caracterizam ativamente pela síntese proteica, secretando colágeno até se tornar o componente principal na cicatrização, nessa fase é necessário grande quantidade de oxigênio para hidroxilação de resíduos, migração e proliferação celular, que é proporcionado pela rede de capilares neoformados, dando início a força de contração devido a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (GABBIANI et al., 1970).

Na fase de epitelização o granulação adquire aspecto fibrótico, característicos de cicatrização, devido a maior deposição de colágeno, surgem os neutrófilos para eliminarem os microrganismos existentes, dando espaço aos linfócitos que nessa fase são mais abundantes, sendo efetores imunes e produtores de fatores de crescimento (CLARK e HENSON, 1988; TODD et al., 1991; BLOTNIK et al., 1994; ENGELHARD et al., 1998).

O processo de remodelamento da pele envolve produção, digestão e orientação das fibras colágenas, através de sucessivas digestões pela colagenase, reorganização das fibras de tecido conjuntivo adjacente, colágeno e ligações transversais covalentes resultando numa configuração mais regular da cicatriz (CLARK, 1985). Anexos da pele, como folículos pilosos, glândulas e coloração sofrem limitações, devido à hipovascularização e deficiência na produção de melanócitos (JOHNSTON, 1990).

A epitelização tem como finalidade, reestruturar os estratos de queratinócitos: basal, espinoso ou espinhoso, granuloso, lúcido em peles espessas e córneo e as funções da epiderme que se perderam com a ocorrência da lesão: proteção mecânica,

regulação térmica do local, defesa contra afecções secundárias e barreira hídrica (KIERSZENBAUM, 2004).

O processo de fechamento da ferida ocorre por contração ativa de miofibroblastos (derivados da transformação dos fibroblastos) com fibras de actino-miosina, que se conectam com outras células. Na contração, as fibras de colágeno se sobrepõem, iniciando a epitelização. A contração conduz o tecido epitelial para o centro da ferida, levando à redução temporária da espessura com o aumento da tensão da pele adjacente. A contração cessa quando um lado da ferida encosta o lado oposto ou quando a tensão da pele ao redor equipara a tensão da atividade proveniente dos fibroblastos e miofibroblastos (RAISER, 1995; ANDERSON, 1996; FONSECA, 2011).

Ao final, a lesão é toda preenchida pela granulação e a circulação reestabelecida pela neovascularização, finalizando o mecanismo de reepitelização (GUIDUGLI-NETO, 1992; JORIS, 1997).

2.2 REPARAÇÃO

A reparação de feridas pode ser avaliada através da divisão de fases cicatriciais, tendo elas atividades concomitantes e independentes, ou seja, sobrepostas umas as outras, iniciando pela hemostasia, fase inflamatória, proliferação e formação de tecido granulomatoso com consequente depósito de células da matriz extracelular como colágeno, elastina, fibras reticulares, e terminando o ciclo, o remodelamento (BRANSKI ET AL., 2005; SHIMIZU, 2005; MENDONÇA ET AL., 2006; ROCHA JÚNIOR ET AL., 2006).

O tamponamento sanguíneo inicia a partir da atividade plaquetária e ativação da cascata de coagulação, sendo iniciada pós-lesão. Após o surgimento de uma ferida, a ruptura dos vasos sanguíneos, extravasamento do conteúdo vascular e alterações das células endoteliais, é promovida uma vasoconstrição reflexa ao trauma, que imediatamente diminui o fluxo sanguíneo para o espaço extravascular (KUMAR ET AL., 2005).

A presença de fibrinas restabelece a hemostasia do local, proporcionando um ambiente favorável para a instalação de rede plaquetária e simultaneamente para que ocorra a degranulação e liberação de fatores de crescimento, citocinas e produção de matriz extracelular, protegendo e proporcionando proteção e provisoriamente organizando a lesão (DARIO,2008). Todos os mediadores envolvidos na fase inicial recrutam macrófagos e neutrófilos ativando o processo de reparação tecidual, com isso reduzindo a taxa de contaminação por organismos e agentes externos (IRION, 2005; SANTORO & GAUDINO, 2005).

A presença de células inflamatórias é correlacionada à fase hemostática. Essa fase depende de células presentes na circulação e tecido, sendo ativadas pelos mediadores liberados pela cascata de inflamação, células polimornucleares (PMN), macrófagos e linfócitos (MANDELBAUM ET AL., 2003). A migração das células ocorre através dos vasos, arteríolas, vênulas e capilares e pela permeabilidade vascular pelo processo de vasodilatação (CARVALHO, 2002).

Os polimorfonucleares são predominantes na fase inflamatória e permanecem por um período de 3 a 5 dias atuando como fagocíticos e apresentadores de antígenos

e fonte de fatores de crescimento juntamente com as plaquetas, sustentando o processo cicatricial (NETO, 2003; MANDELBAUM ET AL., 2003). Através do debridamento das células necróticas, a proliferação de granulação é expressiva, as PMN também atuam sintetizando proteases, reorganizando as fibras de colágeno e gerando a líse da rede de fibrinas (NETO, 2003).

Outros mediadores e citocinas são relevantes no porcesso, os linfócitos liberam substâncias, como as linfocinas, interleucina-2, fator ativador de macrófagos e fatores quimiotáticos que auxiliam na fase inicial da cicatrização através da estimulação de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (NETO, 2003).

A reparação do tecido conjuntivo ocorre juntamente com o crescimento da granulação, deposição de colágeno e de fibroblastos (SARANDY, 2007). A proliferação de fibroblastos segue na camada mais superficial da ferida, denominado de fibroplasia, a modulação é realizada por macrófagos e interleucina-1, o fibrinogênio do exsudato inflamatório é transformado em fibrina, que é depositada e formando uma rede ou malha, local onde os fibroblastos se proliferam e sintetizam proteínas para formação do tecido cicatricial, e produzindo a matriz extracelular, formada por glicosaminoglicanos, fibras colágenas tipo I e III e neovasos através da angiogênese (KUMAR et al. , 2005, SARANDY, 2007). Essa neovascularização é simultânea a proliferação de granulação que é denominado pela sua aparência irregular e granular decorrente da formação de novos capilares (WERNER & GROSE, 2003).

A granulação é composta por vasos, colágeno, elastina, fibroblastos e seus produtos, sendo sintetizado a partir dos 3 ou 4 dia pós lesão, intermediando a

formação da rede de fibrina e fibronectina e a organização de colágeno, após reestabelecido o fluxo sanguíneo de forma a sustentar os aportes necessários para sobrevivência das células e estruturar a oxigenação tecidual, a angiogênese é diminuída e dá início a redução da ferida (BERRY & SULLINS, 2003).

A retração dos bordos das feridas é realizada pelos fibroblastos que se diferenciam em miofibroblastos presente nas células do granulação e que possui uma força contrátil e tênsil reduzindo o sangramento e facilitando a epitelização (PAGANELA, 2009). Através das fibras de actina e miosina formam conexões ou fibronexus juntamente com a matriz extracelular que promovem a aproximação dos bordos lesados, forçando as fibras de colágeno se sobreporem para facilitar o fechamento da FERIDA (RAMALHO et al., 2003; SARANDY, 2007; PAGANELA et al., 2009).

Finalizando o processo inicia a epitelização que gera o fechamento das superfícies iniciando pela presença dos queratinócitos (CARVALHO, 2002). Através da divisão e migração de células da camada basal da epiderme sobre a área de tecido conjuntivo subjacente, decorrentes das várias atividades mitogênicas e hiperplasia do epitélio (MANDELBAUM ET AL., 2003).

As células sofrem alterações fenotípicas, desencadeando a retração de filamentos intracelulares, dissolução de desmossomos intercelulares e a formação de actina citoplasmática na periferia celular (CARVALHO, 2002; EHRLICH & DIEZ, 2003), dando-lhes movimentação necessária para completar a fase de reepitelização, e retornando ao seu fenótipo normal após o término da fase, a membrana basal é

reconstituída pelo epitélio recém formado e os hemidesmossomos e desmossomos são reestruturados (CARVALHO, 2002).

A fase de remodelamento pode alcançar dias como meses, tendo como exclusiva responsabilidade o aumento da força tênsil, redução da lesão e sinais de eritema, nesta fase ocorre a maturação das células e tecidos, que se tornam característicos em um novo tecido o qual foi perdido (NETO, 2003). Os fibroblastos perdem seus núcleos e consequentemente sua atividade proliferativa e de aporte ao tecido, a atividade celular e angiogênese é diminuída, levando a maturação de uma cicatriz (VIEIRA et al., 2002). Nesta fase aumenta-se o número de colágeno principalmente tipo I e III que se dispõem paralelamente, formando feixes ou fibras que seguem a orientação para sua organização através a atividade da colagenase, aos poucos as fibras se tornam mais espessas configurando uma forma regular sendo diretamente relacionadas as forças mecânicas atuantes no tecido, promovendo a lesão um tecido mais resistente (OLIVEIRA, 2008). Após o término da epitelização observa-se um grande número de apoptose, desaparecimento de células que se faziam presentes e finalmente o surgimento de um novo tecido, no qual havia perdido, conhecido como cicatriz ou tecido cicatricial (BALBINO et al., 2005).

A cicatrização por primeira intenção em feridas cutâneas, é a mais indicada, através da sutura de pele por procedimentos cirúrgicos e ser realizado o mais rápido possível pós lesão, sendo limitado em algumas regiões de acordo com a anatomia (RUSZCSAK, 2003; THEORET et al., 2013). Esses locais devem permitir a adaptação dos bordos, sendo assim, em feridas amplas e profundas não é possível o fechamento por primeira intenção, e sim por segunda intenção participando os processos de contração

celular e reepitelização que são independentes, ocorrendo de forma lenta e susceptíveis a algumas complicações (ENOCK e LEAPER, 2007).

Existem diversos fatores que corroboram para o retardo na cicatrização de feridas, sendo ambientais, locais e sistêmicos, a reparação por muitas vezes ocorre corretamente, e por vezes se alcança a cicatrização de forma inadequada (NETO, 2003; HALLORAN e SLAVIN, 2002).

Os fatores locais podem contribuir como barreiras físicas, inibindo o desenvolvimento ordenado de fibras colágenas, granulação, crescimento epitelial. O movimento restrito pode gerar uma desorganização das fibras colágenas, resultando na diminuição da força tênsil da ferida, já o excesso de movimento propicia uma fragilidade na formação de capilares devido a alta mobilidade e pertubando o crescimento endotelial vascular, e a deposição de colágeno (KNOTTENBELT, 2003), presença de sujidades ou resíduos na ferida como tecido necrótico, corpo estranho, contaminação bacteriana e exacerbação inflamatória e hipóxia tecidual pode ser a priori o motivo do retardo cicatricial e irritabilidade do local (HALLORAN e SLAVIN, 2002; HENDRICKSON e VIRGIN, 2005).

O fluxo sanguíneo no local lesado é um fator importante em cicatrização, principalmente na espécie equina, a sua deficiência pode gerar uma diminuição da perfusão tecidual gerando o aumento de hipóxia regional, reduzindo o metabolismo e crescimento das células e proporcionando um ambiente favorável as infecções bacterianas, dentre todos os fatores, a contaminação bacteriana secundária é uma das causas de maior relevância para o retardo na cicatrização, podendo ser

concomitantemente causada por microrganismos externos ou colonizados da própria flora do local (SARANDY, 2007), devido a diminuição de grupos musculares e presença de diversas estruturas significativas como ligamentos, tendões, nervos e vasos que se torna desfavorável o manuseio e maiores estudos em membros de equinos, limitando os processos cicatriciais (SARANDY, 2007; HENDRICKSON e VIRGIN, 2005).

Os fatores sistêmicos podem ser causados em decorrência as deficiências nutricionais, hipovolêmicas, hipotensão, hipóxias, hipotermias, infecções em geral, traumas e a utilização de medicamentos antinflamatórios (NETO, 2003). Segundo PAGANELA (2009), hipóxia e hipotermia podem ser relacionadas à cicatrização pela diminuição do tônus vasomotor periférico, proporcionando uma vasoconstrição reflexa, reduzindo a microcirculação local levando a um quadro de hipóxia e diminuição de nutrientes (NETO, 2003; PAGANELA, 2009). Os medicamentos antinflamatórios reduzem a atividade das fases cicatriciais como a inflamatória, restringindo os efeitos da taxa e qualidade no crescimento epitelial, que consequentemente demandam um atraso na formação de granulação, proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e reorganização das fibras e neovascularização (FREITAS et al., 2011).

Anatomicamente e fisiologicamente, o equino torna o processo de cicatrização mais relevante em alguns aspectos físicos e estruturais por apresentar estruturas importantes para locomoção e aporte para nutrição. A diminuição no número de grupos musculares na região metacarpiana gerando uma diminuição na rede de vascularização, em contraposto a inervação é extensa e circundante as vasos existentes, tornando mais sensitivo, e ainda possuem variações de tendões

sobrepostos aos outros e ligamentos que tem como funções auxiliar no sistema locomotor, promovendo dinamismo e interligando uma estrutura a outra (DI FILLIPO et al., 2012).

2.3 TRATAMENTO DAS FERIDAS

2.3.1 PLAQUETAS

As plaquetas são células incolores, produzidas quando o citoplasma das células da medula óssea, megacariócitos, entram na circulação (BEHNKE, 1998). As plaquetas estão presentes no meio intravascular, não podendo ser replicadas, sendo assim possuem um período de vida útil de 5-9 dias, sendo fagocitadas por células do sistema imune, os macrófagos, as plaquetas possuem características discóides e são de aproximadamente 3.0 por 0.5 μm de diâmetro, são anucleadas, mas contém grânulos e organelas. Seus grânulos possuem mais de 30 protéinas bioativas que têm um papel central na hemostase e cicatrização tecidual (HARRISON, 1993).

As plaquetas geralmente não interagem com outras plaquetas ou tipos celulares. Após lesão tecidual, inicia liberação de leucotrienos, causando uma vasoconstrição primária (BROUGHTON, 2006), a ativação das plaquetas circulantes se inicia quando as mesmas se encontram com proteínas subendoteliais, como colágeno, fator de Von Willebrand, fibronectina, trombospondina e lamininas, incluindo mudança morfológica com manifestação de pseudopódos e degranulação (BEHNKE, 1998; DIEGELMAN, 2004).

O difosfato de adenosina (ADP) é uma das primeiras substâncias secretadas a partir das plaquetas, seguidos de serotonina e tromboxanos amplificando sua ativação. Os peptídeos e proteínas liberados a partir dos grânulos como, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, auxiliam na migração celular, podendo citar alguns, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF β (fator de crescimento transformante), IGF (fator de crescimento insulin-like), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), EGF (fator de crescimento epidérmico), Fator plaquetário, IL- 1 (interleucina 1), fibrinogênio, vitronectina, fibronectina, trombospondina (HARRISON, 1993; MARX, 2004; EPPLEY, 2004; BROUGHTON, 2006; SCHMIDMAIER, 2006).

As plaquetas desempenham um papel fundamental, na cicatrização de feridas principalmente através da produção e liberação de grandes quantidades de fatores de crescimento. Uma vez ocorrido a degranulação, os fatores de crescimento ativos se ligam a receptores transmembranares de células alvos, tais como células estaminais mesenquimatosas, osteoblastos, fibroblastos, células endotelias e epidérmicas derivando diretamente no crescimento celular, morfogênese e diferenciação (MARX, 2004).

Vários estudos em animais tratados com plasma rico em plaquetas mostram que fatores de crescimento segregados a partir dos grânulos plaquetários ativados pós lesão, especificamente PDGF, TGF β, EGF, VEGF e IGF desempenham papel fundamental no processo inicial na cicatrização, sendo o PRP uma fonte autóloga destes fatores de crescimento (SLATER, 1995; MARX, 2005).

2.3.2 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas, conhecido como PRP, é derivado de sangue autólogo e é definido como um volume de plasma com uma concentração plaquetária acima dos níveis fisiológicos (MARX, 2001; GANDHI et al., 2006). É uma fonte autógena e de baixo custo de fatores de crescimento (FC) (ANITUA, 1999; LIEBERMAN, 2002). FC são moléculas bioativas fundamentais no reparo e regeneração de diversos tecidos (THOWARTH, 2006; FARRAG et al., 2007; FOSTER et al., 2009), capazes de estimular a mitogênese, angiogênese, quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular (SANCHEZ, 2003; THOWARTH, 2006).

A qualidade do plasma rico em plaqueta deve ser instituída com base na sua coleta, objetivando um método que proporcione um PRP asséptico, concentrado e com plaquetas funcionais. Alguns cuidados como ambiente, o local a ser coletado (veia jugular), ausência de movimentos bruscos no manuseio das amostras e proteção contra incidência luminosa e calor extremo, no armazenamento até seu processamento são procedimentos mínimos para a aquisição de um PRP de boa qualidade (MACEDO, 2004; MESSORA et al., 2009).

O PRP pode ser obtido a partir do sangue autólogo através da centrifugação ou filtração, o centrifugado de plaquetas tem sido a técnica mais utilizada para obtenção do PRP. A centrifugação do sangue total autólogo torna possível a separação da série branca e plasma, uma centrifugação adicional é realizada separando ainda mais o PRP a partir da porção essencialmente desprovido de plaquetas, denominado plasma

pobre em plaqueta (PPP), o PPP é utilizado clinicamente como um selante de fibrina para hemostasia (MAN, 2001; PETRUNGARO, 2001; EPPLEY, 2006).

Vendruscolo et al. (2012) testaram vários protocolos descritos na literatura para obtenção do PRP observando a influência da força G, medida de força da velocidade de rotação da centrífuga e do tempo de centrifugação na concentração plaquetária e leucocitária. Os protocolos testados foram o de Carmona et al. (2007) de 120 e 240 *g*, respectivamente na primeira e na segunda centrifugação, Maia et al. (2009) de 120 e 473 *g*, De Rossi et al. (2009) de 300 e 640 *g*, Del Bue et al. (2007) de 350 e 510 *g* e um protocolo proposto de 90 e 180 *g*, todos com 5 e 10 minutos de centrifugação. Os protocolos que resultaram na maior concentração plaquetária foram o de Carmona et al. (2007), concentração de 2,18 vezes com cinco minutos de centrifugação e 2,36 vezes com dez minutos, e o protocolo proposto, concentração de 2,04 vezes com cinco minutos e 2,25 vezes com dez minutos, porém a diferença não foi significativa.

O PRP derivado do sangue autólogo envolve vários fatores importantes, incluindo a relação de concentração de plaquetas, técnica de processamento, quantificação da concentração, manipulação, aplicação e uso clínico (EPPLEY, 2006). O PRP é considerado uma substância que fornece mais plaquetas a uma ferida ou lesão do que o que seria produzido por uma resposta fisiológica normal. Em adição, o PRP deve atingir um período de três a cinco vezes maiores em relação ao valor de concentração basal de plaquetas (EPPLEY, 2006).

A centrifugação do sangue total autológo separa a série vermelha e plasma, uma centrifugação adicional é realizada separando ainda mais o PRP a partir da porção essencialmente desprovida de plaquetas, denominado plasma pobre em plaqueta (PPP), o PPP é utilizado clinicamente como um selante de fibrina para hemostasia, a dupla centrifugação é considerável para a completa separação do plasma rico em plaqueta, *buffy coat* (porção contendo leucócitos e plaquetas) e o plasma pobre em plaqueta, resultando em um concentrado e purificado do PRP (MAN, 2001; PETRUNGARO, 2001; EPPLEY, 2006).

2.3.3 FATORES DE CRESCIMENTO

Durante essas fases existem sinalizadores de importância, exercendo influência sobre os fibroblastos e outras células adjacentes, essas moléculas são conhecidas como fatores de crescimento liberados ou atraídos pelas plaquetas, sendo o VEGFs, TGFs, IGFs, PDGFs, EGFs, Fator 8 e etc, que induzem diversos efeitos, incluindo migração, proliferação e síntese proteica (SPLINDER, et al.,1996).

As várias respostas celulares dos fatores de crescimento exigem a presença de receptores específicos na superfície das células alvos, após a interação alvo-receptor e formação do complexo, que é internalizado e degradado, ocorrendo uma série de reações como ativação proteica da tirosina- quinase e fosforilação de proteínas intracelulares (FAUSTO, 1994; FAUSTO, et al. 1995; MICHALOPOULOS, 1997).

Esse estímulo resulta-se em processos através dos sistemas transdutores de sinais envolvendo segundos mensageiros como AMP cíclico, cálcio, inositol, trifosfato, diacil-glicerol ou fosfolipase C, ativando a proteína C quinase, desencadeando

atividades secundárias, como alteração do fluxo iônico através da membrana celular, com a resposta da entrada de NA^{+} e a saída de H^{-}, elevando o pH intracelular aumentando a atividade da ATPase $Na + / K^{+,}$ e conseguinte ativa os genes envolvidos no processo proliferativo, levando a replicação do DNA e divisão celular (FAUSTO, 1994; MICHALOPOULOS, 1997).

Os fatores de crescimento são classificados de acordo com suas ações, podendo ser mitogênicos completos, que induzem a síntese de DNA e mitose, mitogênicos incompletos ou co-mitogênicos que auxiliam na indução da síntese de DNA e os agentes inibidores do crescimento que controlam o término do processo proliferativo celular. No processo proliferativo das cicatrizações cutâneas, observa-se a reatividade maior de alguns fatores de crescimento, como os IGFs, PDFGs, EGFs, TGF β e ativinas que são subfamílias dos TFGs β (FAUSTO et al., 1995).

O fator de crescimento derivado da insulina ou mais conhecido como IGF é uma molécula peptídica, que atua em funções de crescimento celular, proliferação, metabolismo, homeostase da glicose, diferenciação celular e apoptose (DUPORT, 2003). A molécula de insulina é produzida e secretada pelas células das ilhotas de Langerhans no pâncreas em resposta ao aumento nos níveis de glicose no sangue que é obtida através do consumo de alimentos. Como consequência, a insulina liga-se a receptores de membrana de tirosina-quinase que respondem principalmente expressando a produção de receptores de insulina, como as superfícies dos hepatócitos, adipócitos e células musculares (XU et al., 1998).

A insulina é primariamente envolvida no metabolismo celular, mas também influencia proliferação e crescimento das células, proporcionando um potencial mitogênico de algumas células específicas do tecido epitelial, além de modular a sobrevivência das mesmas (SACHDEV, 2007). Os fatores de crescimento derivados da insulina ou IGFs produzidos na maioria dos órgãos e tecidos, sendo principalmente de origem hepática, tendo como principais representantes os IGFs 1 e 2, apresentando elevado grau de homologia com a pró- insulina e possuindo atividade sobre o metabolismo intermediário, proliferação, crescimento e diferenciação celular, responsável pela atividade mitogênica de fibroblastos (SIDDLEK, 2011).

Os IGFs são potentes estimuladores da mitogênese e sobrevivência de muitos tipos celulares exercendo funções autócrinas, parácrinas e endócrinas (CLEMMONS, 1997; O`DELL e DAY, 1998).

O fator de crescimento derivado das plaquetas, conhecido com PDGF, é acumulado nos grânulos plaquetários e liberado através da ativação e degranulação das mesmas, podendo também ser produzido por macrófagos ativados, células endoteliais, células musculares lisas e células tumorais, causando a migração e proliferação de fibroblastos, célula musculares lisas e monócitos, possuem outras propriedades pró-inflamatórias (ANDRAE, 2008).

O PDGF é ativo *in vivo* liga-se a dois tipos de receptores, alfa e beta quando aplicado diretamente em incisões cirúrgicas, estimulando o influxo de monócitos, síntese de colágeno e resistência tênsil nas feridas (SPINDLER et al., 1996). Pode também ser produzido por células endoteliais, macrófagos e plaquetas, com a função

de atuar inicialmente no processo cicatricial, promovendo a síntese de colágeno e proteoglicanos e a mudança de fenótipo de fibroblastos para miofibroblastos, gerando contração, produção e reorganização da matriz extracelular (ANDRAE, 2008).

Tanto o TGF β como o PDFGs são agentes quimiotáticos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos liberados pós lesão tecidual pelas plaquetas (ASSOIAN et al., 2002; HELDIN et al., 2002). TGF β na fase proliferativa são mitogênicos para fibroblastos, inibidores da proliferação de células e queratinócitos e induzem a expressão de integrinas necessárias para a migração pela matriz extracelular, participando também da diferenciação de miofibroblastos e processos angiogênicos (COFFEY et al., 1988, SELLHERYER et al., 1993; GAILIT et al., 1994; ZAMBRUNO et al., 1995; ROBERTS e SPORN, 1996; MASSAGUE, 1998).

O fator de crescimento transformante beta ou TGF β é um inibidor do crescimento para grande parte das células epiteliais e células musculares, seus efeitos sobre os fibroblastos depende de sua concentração celular. Em baixa concentração induz a síntese e secreção do PDGF, agindo como agente mitogênico indireto. Entretanto, ao contrário com concentrações elevados inibe o surgimento e liberação de PDGF, por inibir a capacidade de expressar receptores para o PDGF. Este fator de crescimento estimula a quimiotaxia para fibroblastos e a síntese de fibronectina e colágeno, promovendo simultaneamente a inibição da degradação do mesmo, por inibir a ação das proteases (WOO et al., 1999).

As ativinas, subfamília dos TGF β, promovem a permanência de suas concentrações elevadas ao final do processo de reparo, inibem a proliferação de

queratinócitos, induzem os fibroblastos a expressar EGFs (Fator de Crescimento Epidermal) que aumentam consideravelmente o granulação na lesão. Enquanto os TGF β promovem a deposição de granulação e de matriz extracelular, as ativinas induzem a deposição de fibronectina e outras moléculas (ROBERTS et al., 1986; HUBNER et al., 1996; SHIMIZU et al., 1998; SEISHIMA et al., 1999; WANKELL et al., 2001). ·.

O fator de crescimento endotelial vascular ou VEGF é considerado o principal regulador da angiogênese e vasculogênese. Os macrófagos regionais aumentam seus receptores de forma expressiva para VEGF nos vasos e na granulação (NAVARATNA et al., 2009; WANG et al., 2013). É sintetizado e secretado por células mesenquimais, fibroblastos e macrofágos caracterizando-se por ser um agente indutor da angiogênese, com ação significativa na angiogênese tumoral, processo inflamatório, cicatrização de feridas e na regeneração de tecidos (YAN, et al., 2010).

O VEGF apresenta uma dependência com a presença da molécula de óxido nítrico (ON), induzindo a regulação da enzima NOSi (Oxido Nítrico Sintetase) e sendo a responsável pela síntese de ON (BROUGHTON, 2006). As citocinas angiogênicas participam da ativação das células endoteliais que iniciam expressando o ativador de plasminogênio, o qual cliva o plasminogênio sérico e pró-colagenase em respectiva plasmina com ação fibrinolítica (KIERSZENBAUM, 2004).

Ao ocorrer à degradação local da membrana basal, o endotélio inicia um processo proliferativo em resposta a ativação das citocinas iniciais que ativaram e encontram-se concentradas no arcabouço circundante. Através da presença de fibronectina e laminina, as interações entre as integrinas e as células da matriz

extracelular migram e sintetizam uma nova membrana basal. Após esse processo regridem e involuem, resultando na diminuição de fatores angiogênicos no local, mudança de arcabouço rico em moléculas pró-angiogênicas para um arcabouço rico em colágeno e aumento expressivo de substâncias inibitórias no processo. Estes vasos formados são característicos da presença do granulação com a finalidade de nutrir, oxigenar o tecido em crescimento (KIERSZENBAUM, 2004; EMING, 2007; TOWNSEND et al., 2011).

As investigações sobre a eficácia de plasma rico em plaqueta (PRP) e o seu uso clínico surgiram a partir da maior compreensão do osso e cicatrização de tecido mole o nível celular, sendo os compostos do sangue, tais como, citocinas e fatores de crescimento derivados das plaquetas, essenciais para a iniciação e na modulação do processo da cura. Há o conceito de que estes fatores de crescimento podem ser concentrados, com a produção de plasma rico em plaqueta, e aplicados de forma terapêutica para alterar ou acelerar a cura tecidual, segundo a biologia e evidências da utilização do PRP (SMITH, 2009).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do PRP (Plasma Rico em Plaquetas Autológo) como tratamento de feridas cutâneas da região metacarpiana de equinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer e padronizar a concentração plaquetária do protocolo de escolha para obtenção de um PRP de qualidade.

Avaliação Clínica e Morfométrica da lesão pós tratamento .

Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica através de marcadores biológicos.

MATERIAS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados seis animais da espécie equina, sem raça definida, clinicamente saudáveis de ambos os sexos e, avaliados clinicamente observando sinais de desconforto que foram submetidos a analíse do Cômite de Ética para a realização dos procedimentos. Os animais foram tranquilizados por via intravenosa (IV) com administração de acepromazina 1% (0,03 – 0,07 mg/Kg) e xilazina 10% (0,5 – 1,1 mg/Kg) e no local anestesia local da via subcutânea com Cloridrato de Lidocaína 0,2% (1 – 7 mg/Kg). O local cirúrgico foi preparado através de tricotomia do local, lavagem com clorexidine e a assepsia com álcool iodado e/ou clorexidine alcoólico, uma forma retangular (6X4 centímetros) de material descartável (plástico) foi estabelecido como molde para as realizações das feridas, padronizando-as de largura, comprimento e espessura semelhantes objetivando o equivalente a uma ferida de 6 X 4 X 1 cm^2 , na face dorsal dos membros torácicos direito e esquerdo (n= 12), sendo 2 feridas por animal. As lesões dos membros foram aleatoriamente sorteadas entre grupos tratados com plasma rico em plaqueta e os grupos controle, sem tratamento com plasma rico em plaqueta.

Os animais foram mantidos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Fazenda de Rubião Junior. Foram pesados, vermifugados com Ivermectina na dose da 200μg/Kg via oral, precedendo o experimento os animais foram confinados em baias individuais, recebendo água e alimento balanceado e feno de “coast-cross”.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados conjunto de seis animais, divididos em dois grupos, G0 (grupo tratado com PRP centrifugado), G1 (grupo controle). Para induzir a lesão, os animais foram submetidos a incisão e antissepsia com clorexidine 0.5%, seguido de sedação com xylazina 10% (0.5 – 0.7 mg/Kg) e acepromazina 1% (0.03 – 0.05 mg/Kg) e anestésico local, no volume de 5-7 mL de Cloridrato de Lidocaína 2% . Durante o procedimento cirúrgico, a incisão foi realizada na pele com lâmina de bisturi (número 24), seguindo-se a dissecção do tecido subcutâneo e remoção do fragmento tissular. A ferida foi limitada à pele e subcutâneo. Após a incisão, foi realizada a aplicação do PRP (plasma rico em plaqueta) de 8 – 10mL de PRP e injetado na região subcutânea, próximo aos bordos da lesão. No décimo quinto dia, o mesmo procedimento foi realizado (8 – 10 mL de PRP) nos bordos da ferida. Após a cirurgia, foi realizado bandagens em todos os membros, sendo retirada 48 horas pós cirúrgica. Em cada animal foi administrado 5.000UI de soro antitetânico e 20.000UI/Kg de antibiótico penicilina G. As feridas foram limpas diariamente com solução fisiológica e compressa e os animais foram mantidos em baias durante 15 dias, sendo soltos em piquetes, após este período. O monitoramento da cicatrização foi realizado, observando-se a força de contração, crescimento epitelial, presença de secreção e crostas, presença de edema, dor e aumento de temperatura. Para estimar o efeito do tratamento ao longo de tempo ajustou-se os modelos do teste T pareado e Regressão Linear considerando correlação entre as respostas obtidas no mesmo animal. Para isso utilizou-se no teste de Regressão Linear o SAS/STAT/Proc Mixed, versão 9.3 do SAS System.

Para produzir o PRP, diversos protocolos foram testados com o objetivo de concentrar o maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma (MARX, 2004; VENDRAMIN et al, 2006; CARMONA, 2006; MAIA, 2008; VENDRAMIN et al, 2009). A ativação do PRP foi obtido com a adição de Cloreto de Cálcio 10%.

4.3 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

O PRP pode ser obtido a partir do sangue total extraído de punção de um vaso através da centrifugação ou filtração pelo método semi-automático, resultando em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e fatores de crescimento. O centrifugado de plaquetas tem sido a técnica mais utilizada para obtenção do PRP (VENDRAMIN et al., 2006).

O processamento foi realizado através da dupla centrifugação, com velocidades constantes (1º - 300G/5’ e 2º - 700G/15’), evitou-se freadas bruscas, e manteve-se as amostras climatizadas em uma temperatura ambiente. As plaquetas da espécie equina são muito sensíveis a diversos fatores externos, incidência luminosa ou temperaturas extremas, excesso de manipulação por apresentarem uma característica de degranulação, ao esbarrarem nas paredes dos tubos ou entre si.

Foram coletados através da punção venosa jugular por vacuteiner 20 G diretamente ao tubo de ensaio e condicionados e armazenados para repouso em uma caixa térmica (isopor) durante 30 minutos. Aproximadamente 40mL de sangue, produz o equivalente a 25 – 30 mL de plasma, sendo este constituído de aproximadamente 75% de plasma pobre em plaqueta(PPP) e 25% de plasma rico em plaqueta(PRP). O PPP também é resultado da dupla centrifugação, localizado na parte superior do tubo,

quando descartado, resta apenas o plasma rico em plaqueta e a região de buffy coat, que contém células inflamatórias e plaquetas. Para separar o PRP da camada de células vermelhas, centrifuga-se novamente para ressuspender suavemente essas duas camadas e obter o plasma rico em plaqueta purificado, representando uma forma concentrada de múltiplas citocinas obtidas a partir da degranulação ou da ativação das plaquetas, liberando no local, fatores de crescimento (MONTEIRO, 2009).

4.4 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

A obtenção do plasma rico em plaqueta foi realizado através da punção venosa da jugular dos equinos, onde foi coletado aproximadamente 80 ml de sangue, que foi acondicionado em caixas térmicas e processados para a obtenção do PRP. Para a padronização da técnica foram testados vários protocolos precedendo dentre os descritos na revisão de literatura. Para este experimento nos baseamos principalmente nos protocolos de Carmona, 2009 e Vendramin 2006, levando-se em consideração a avaliação de Vendruscolo et al., 2012.

Para obter um PRP de boa qualidade, foi seguido alguns cuidados desde a coleta que foi feita com segurança, animais contidos em troncos adequados, o acondicionamento em caixas de isopor para a diminuição da incidência luminosa, foi feito um repouso de 30 minutos que auxiliou na sedimentação celular, evitando a movimentação com o frasco, que gera um atrito com frasco resultando no rompimento da membrana plaquetária e degranulando seus constituintes, como os fatores de crecsimento importantes na cicatrização. Após o repouso iniciou o processo

de centrifugação, tomando-se cuidados com a freagem da centrífuga para evitar um atrito das células com o frasco, dificultando a contagem e diminuindo o concentrado plaquetário.

O controle de temperatura tambémfoi realizado, pois, as plaquetas equinas possuem muita sensibilidade e durante a contagem pela técnica de diluição de Brecher, minimizamos a intensa agregação e reatividade plaquetária intensa que ocorria com frequencia.

A modificação dos protocolos citada acima foi realizada principalmente em realação ao tempo de centrifugação e a potência rotacional/minuto, e obtivemos uma concentração superior ao preconizado pela literatura (tabela 1), que cita que para ser PRP dever ter acima de 4 vezes o número de plaquetas em relação ao valor basal do animal.

TABELA 1 Resultados Hematológicos dos animais mostrando o valor basal plaquetário e a contagem plaquetária resultando na média de concentração de plaquetas de 4 vezes comparado ao valor basal.

ANIMAL	PLAQUETAS/ µ L	PRP	LEUCÓCITOS	HEMÁCIAS/µ L
ANIMAL 1	166.000	642.500	11.300	6.370.000
ANIMAL 2	221.000	726.800	10.200	6.980.000
ANIMAL 3	169.000	697.600	11.600	8.100.000
ANIMAL 4	190.000	841.250	7.600	6.730.000
ANIMAL 5	139.000	625.800	9.900	7.970.000
ANIMAL 6	185.000	730.300	8.900	6.680.000
MÉDIA	178.333	710.708	9.917	7.138.333
DESV PADRÃO	27.522	77.094	1.498	722.313

O protocolo de escolha foi realizado a partir de modificações em protocolos já estabelecidos e testados, tendo como critério o aumento de concentrado plaquetário que variava de 5 a 6 vezes o número de plaquetas basais de cada animal, as alterações na velocidade e tempo de centrifugação que foram testadas até a obtenção de uma contagem plaquetária referente ao considerado concentrado plaquetário.

A centrifugação foi importante para avaliar fatores desfavoráveis a obtenção do PRP, como a frenagem da centrífuga, a temperatura adequada, o manuseio e materiais utilizados na amostra, evitando desajustes no plasma, como rompimento plaquetário, ativação e degranulação das plaquetas, aderência das células ao frasco utilizado. Sendo de importância esses procedimentos para padronizar uma técnica adequada na obtenção do PRP.

Os protocolos foram testados, repetindo cada uma das técnicas por duas vezes. As metodologias foram realizadas em tempos distintos. Estes cuidados foram adotados a fim de padronizar as variáveis (operador, tempo, ambiente, equipamentos) e diminuir os vieses da pesquisa. Para a análise dos resultados designou-se que o protocolo A, metodologia proposta por CARMONA (2006) e o protocolo B proposto por VENDRAMIN et al. (2006).

Todas as metodologias propostas consistiam em protocolos de dupla centrifugação. O protocolo A preconizou a primeira centrifugação a 120 g durante 5 minutos. Ao seu final, o tubo apresentava três camadas distintas formadas pelas hemácias: inferior (zona de névoa) composta pelos leucócitos e plaquetas maiores;

intermediária; e superior (plasma). Foi coletado o plasma e a zona de névoa e o restante do volume correspondente à porção mais concentrada em hemácias foi descartado. A porção coletada foi novamente centrifugada a 240 G durante 10 minutos. Ao final da segunda centrifugação obteve-se a formação de um precipitado (pellet) sedimentado ao fundo do tubo e uma porção de plasma. Coletou-se o pellet e uma fração de 80 µL do plasma, que após homogeneização, formaram o PRP.

A metodologia proposta no protocolo B consistiu em uma primeira centrifugação a 300 G durante 10 min. Ao final desta etapa obtiveram-se três frações: células vermelhas do sangue (fundo do tubo), PRP (meio do tubo) e plasma pobre em plaquetas (PPP) (parte superior do tubo). Para a segunda centrifugação, a porção superior foi transferida para outro tubo vazio, para nova centrifugação a 640 G por 10 min. Em seguida, separou-se todo o PPP, e a substância remanescente correspondeu ao PRP. A plaquetometria foi realizada, no momento da coleta do sangue e após cada protocolo de concentração, em todas as amostras pelo método manual de contagem.

O protocolo B foi escolhido, entretanto foram realizadas algumas modificações, sujeitando-se o protocolo a ser modificado, permanecendo a dupla centrifugação, mas a velocidade e tempo alterados foram realizados a partir da coleta de sangue dos animais experimentais em tubos de ensaio com citrato de sódio 3,2%, que em seguida foi homogeneizado e transferido para tubos Falcon de 15 mL e posto em descanso durante 30 minutos em uma caixa térmica (Isopor), durante 30 minutos. Após o descanso, deu-se início a primeira centrifugação na rotação de 300G durante 5 minutos, após a primeira centrifugação, o sobrenadante superior não foi descartado e foi passado juntamente com a zona de névoa (buffy coat) para um novo tubo Falcon

de 15 mL, realizando novamente um descanso durante 30 minutos em uma caixa térmica. Na sequência, realizou-se a segunda centrifugação na rotação de 700G durante 15 minutos. Após a segunda centrifugação, 75% do sobrenadante superior foi descartado, o restante obtido, totalizando 25% foi o PRP (plasma rico em plaqueta), realizando outro descanso de 30 minutos antes de injetar no animal de experimento.

O objetivo da contagem plaquetária foi de aumentar o número de concentrado de plaquetas no plasma autólogo dos equinos em experimento.

4.5 APLICAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Os animais foram tratados após a lesão de pele onde foi realizado somente limpeza com solução fisiológica NaCL 0,9% nas feridas de ambos os grupos , o PRP foi administrado com agulha 25X7 e seringa de 10 mL em pontos espalhados pela lesão próximos aos bordos da ferida. O membro não selecionado foi denominado de grupo controle, o qual recebeu solução fisiológica NaCl 0,9%, seguindo os mesmos tratamentos do membro tratado com PRP. A avaliação macroscópica da ferida foi realizada a cada 4 dias até a biópsia final, sendo as variáveis analisadas, grau de epitelização, formação de granulação, presença de exsudação, presença de edema, dor e aumento de temperatura. As biópsias foram realizadas no dia 30, onde um fragmento de 1,0 a 1,5 cm foi removido a partir do bordo da ferida, contendo a zona de transição de epitelização e granulação ou cicatricial.

4.6 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas foi administrado no dia 0 e a segunda aplicação foi realizada no dia 15 pós-lesão. Após a administração do plasma rico em plaqueta, os animais foram acompanhados durante 30 dias. Na primeira semana realizou-se o exame físico, sendo notificada a presença de exsudação ou não, aumento de volume e temperatura e sensibilidade dolorosa da região através da avaliação de inspeção e física. Na segunda, terceira e quarta semanas seguintes foram realizados avaliações de inspeção e exame físico, observando a evolução da lesão, através da morfometria a cada 4 dias e realizou-se à biópsia da lesão após 30 dias de lesão, nas semanas seguintes foi mantido a avaliação morfométrica até completa cicatrização.

4.7 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E PLANIMETRIA DA FERIDA

Foi realizado durante o período completo de observações (30 dias), o aspecto físico da ferida, avaliando a presença de exsudações, aumento de temperatura e volume, a sensibilidade dolorosa, o crescimento epitelial e suas características físicas e morfométricas, através de uma régua graduada em centímetros que era realizado a cada 4 dias. Após cada troca de curativo, os bordos das feridas foram limpos com gaze e solução fisiológica e fotografados com uma câmera digital. Houve pouca incidência de granulação exuberante, não necessitando a ressecção. A quantificação de uma cicatrização foi realizada através de avaliações dimensionadas (0 - 3) como segue controle de dor, 0= ausência de dor; 1= dor leve; 2= dor moderada, 3= dor intensa controle de exsudato, 0= ausência de exsudato; 1= pouco exsudato; 2= moderado exsudato, 3= intenso exsudato, todas as avaliações foram realizadas nos primeiros quinze dias e dos quinze aos trinta dias.

4.8 BIÓPSIA

A biópsia foi realizada no 30º dia de tratamento através a contenção química com sedação por administração intravenosa de acepromazina 1% (0,03 – 0,07 mg/Kg) associado à xilazina 10% (0,5 – 1,1 mg/Kg) e no local da biópsia administrado anestésico local Cloridrato de lidocaína 2% (1 – 7 mg/Kg). As amostras foram coletadas com a utilização de uma lâmina de bisturi, onde aproximadamente 1,5 cm extraídos entre uma faixa de transição, granulação e tecido epitelial saudável das feridas dos dois membros. Foi acondicionado em frascos contendo Formol 70% e uma segunda amostra acondicionada em microfrascos e criopreservadas em seguida, para posteriormente realizar avaliações histopatológicas e imunoistoquímicas.

4.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Na avaliação histopatológica foram observadas alterações nas características dos dois grupos (tratado e controle) como: hipercelularidade, deposição de colágeno e presença de fibroblastos, e presença de células adiposas e glandulares.

O alinhamento e organização das fibras colágenas foi observado no período de 30 dias, avaliando se ambos os grupos apresentariam semelhanças ou diferenças quanto à disposição e organização das células, principalmente colágeno e fibroblastos.

Os resultados histopatológicos e imunoistoquímicos tinham como objetivo demonstrar a eficácia do tratamento com PRP obtidos através da observação de

maturação celular, deposição de fibroblastos e colágeno e expressão de fatores de crescimento no local.

4.10 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos de 5 µm foram inicialmente submetidos a desparafinização em série de xilol e álcool, com posterior recuperação dos sítios antigênicos em vapor fluente (panela de valor) por 30 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos em agitador com tampão Fosfato Salino 0,1M, pH 7.5 (PBS) e, posteriormente, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito por imersão em peróxido de hidrogênio a 1% por 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS (2x, 5 minutos) e o bloqueio dos sítios não específicos foi realizado com soro normal de cabra diluído em tampão fosfato salino 0,2M, pH 7,4 (PBS). Após incubação "*overnight*" a 4º C em câmara escura com os anticorpos primários monoclonais anti-PDGF, IGF-1, TGF β e VEGF (marca IMUNY, Rheabiotech Ltda, Brasil), diluídos 1:400 em PBS, as amostras foram submetidas a repetidas lavagens em PBS, e em seguida incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com biotina na diluição de 1:400. Posteriormente incubados com reagente AB (complexo streptavidina-biotina) por 30 minutos, a temperatura ambiente (DAKO), e revelados com DAB (Sigma Chemical Co, Saint Louis MO, USA) por 1 minuto a temperatura ambiente. Os cortes foram então corados com solução de hematoxilina, fixados em série de álcool – xilol e montados em Permount (Fisher, USA).

Os resultados de imunoistoquímica foram realizados através do software Image J, seguindo uma cromatografia obtida através das marcações com os anticorpos para VEGF, IGF, PDGF e TGFβ, que utilizava a mensuração de colorações em pixels por área

dos campos marcados, gerando uma contagem celular e colorimétrica em porcentagem de células coradas pelos anticorpos.

RESULTADOS

5 . RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MORFOMÉTRICA DA LESÃO

Durante a avaliação clínica realizada diariamente durante 4 semanas, verificando o processo cicatricial e suas fases, observamos que na primeira semana pós lesão o aumento de volume, sensibilidade dolorosa a palpação ao redor do local da lesão estavam presentes na indução da lesão até a segunda semana, variando quanto a intensidade entre os animais. Não notamos a presença de claudicação entre os animais, tanto nos membros tratados quanto nos membros controle. A cicatrização de cada animal foi evidenciada gradativamente, sendo a diminuição de temperatura próximo a lesão, o primeiro sinal a desaparecer ao redor de 15 dias.

O aumento de volume esteve presente em três tempos, no início (pós lesão dia 3), pós reaplicação de PRP (segunda aplicação – dia 15) e pós biópsia (dia 30). Alguns animais apresentaram exacerbação de sinais exsudativos do tipo seroso, alguns dias após a lesão (dia 2) tanto no membro tratado quanto no controle. Sendo possível que o animal 1 tenha apresentado uma contaminação bacteriana que foi controlada apenas com a limpeza diária, condizendo com os resultados morfométricos e imunoistoquímicos, observados no quadro 4.

A atividade física que foi realizada de forma natural, onde os animais foram soltos em piquetes após 15 dias e permaneceram até o final das avaliações (dia 30) , tornou sustentável a idéia, segundo alguns trabalhos, que os movimentos (fisioterapia) geram uma força tênsil, auxiliando na reorganização das fibras colágenas que a priori se depositam na camada dérmica de forma desorganizada e irregular, formando uma

malha e podendo desenvolver uma região fibrótica denominada cicatriz. No nosso experimento pudemos observar uma rápida reparação e uma síntese e organização das fibras de colágeno que aceleraram a formação de uma nova pele semelhante ao que foi extraído pela indução cirúrgica.



FIGURA 1. Obtenção de Plasma Rico em Plaqueta (PRP) para aplicação nos bordos da ferida induzida localizada na região metacarpiana de equinos.

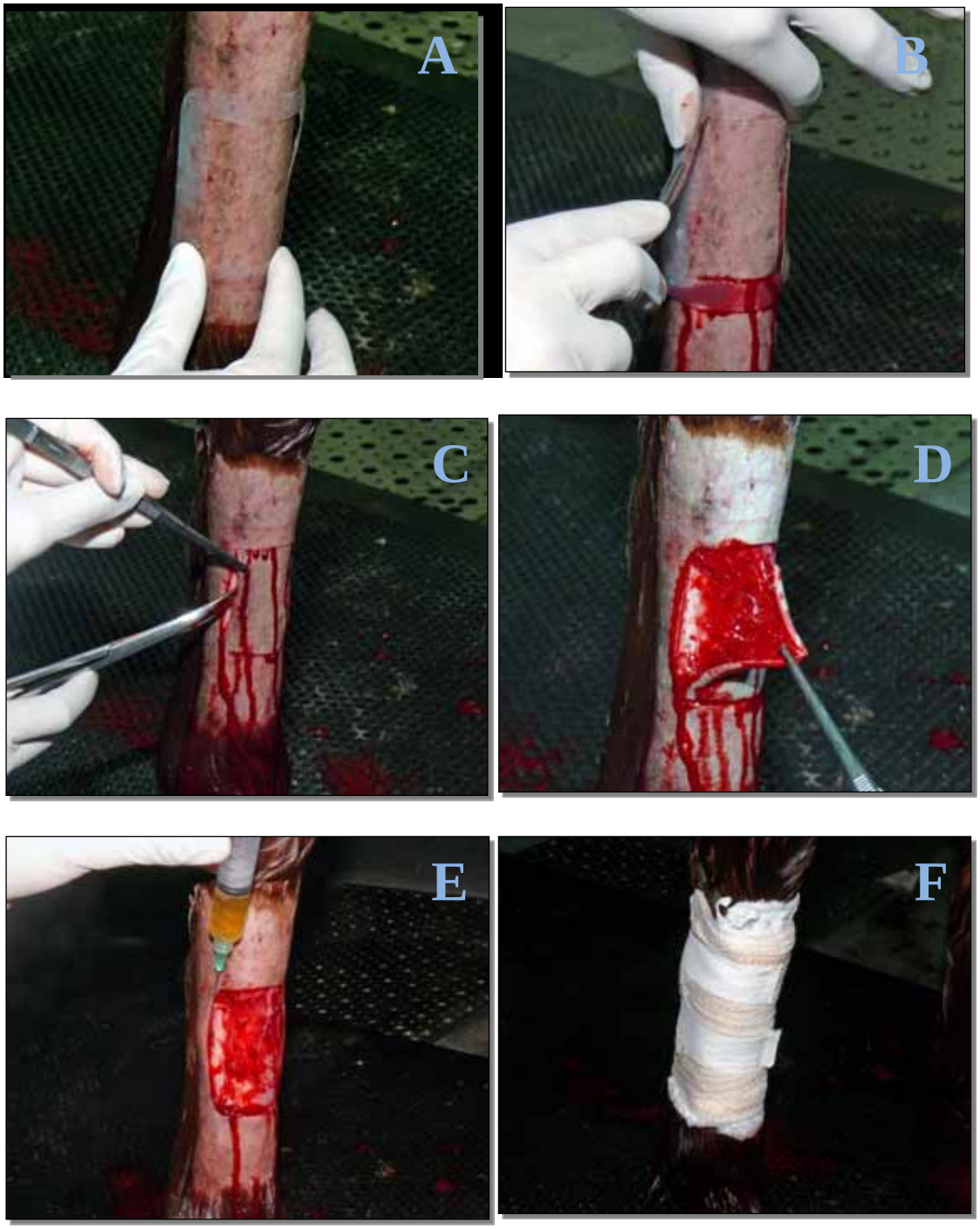


FIGURA 2. Visibilização da indução da ferida cutânea e aplicação do plasma rico em plaquetas (PRP). Na figura A mostra o molde de plástico utilizado para padronizar as feridas, nas figuras B, C e D esquematiza a indução cirúrgica, na figura E mostra a aplicação de PRP nos bordos da ferida do membro tratado e a figura F indica o término do procedimento finalizando com bandagem e fechamento da ferida.

5.2 DESCRIÇÃO DA AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

Foi realizado o procedimento cirúrgico no membro torácico esquerdo, a lesão foi observada durante quatro semanas, presença de edema, exsudação, aumento de temperatura e sensibilidade dolorosa, e foi realizado a morfometria da lesão.

Em geral nas avaliações da primeira semana foi observado aumento de temperatura local, com presença de edema e sensibilidade dolorosa, e moderada exsudação serosa, seguindo a segunda semana que apresentou diminuição dos sinais inflamatórios com presença de pouca exsudação serosa. A cada semana era realizado uma mensuração através de um molde de plástico e régua em centímetros onde observamos um crescimento epitelial que foi de aproximadamente 0.1mm nos membros controle e de 0.15- 0.20 milimetros quadrados avaliados diariamente. Após 15 dias de lesão os animais foram soltos em piquetes e nas semanas seguintes foi observado uma retração dos bordos devido a força de contração da ferida, sendo mensurado uma redução da lesão com valor máximo de 4,5 céntimetros quadrados no membros tratados e de 8 centímetros quadrados nos membros controles.

No experimento, a lesão foi avaliada durante 30 dias em ambos os grupos (controle e tratado), sendo necessário um tempo máximo de 60 dias para completa cicatrização, observado após o término do experimento.

Todos os animais apresentaram cicatrização por segunda intenção, seguidos pelo fechamento completo da área lesada no período máximo de 60 dias. Entretanto um animal do grupo tratado apresentou contaminação bacteriana local, tornando não significativo (P= 0,27047458), segundo o teste estatístico T pareado, apresentando uma

diferença na área de lesão (com valor de diferença entre área de tratados igual a -7). Inferimos que este fato foi relevante na analíse geral dos resultados, fazendo com que não houvesse diferença significativa entre tratados e controles como demonstra o quadro 4 e 5. Não havendo parâmetros de avaliações em membros de equinos, estabelecemos a comparação dos resultados com outras citações, como no relato de Schwartz e colaboradores (2007) que descreveram semelhança em feridas não contaminadas na região torácica, equivalentes a um tempo médio de cicatrização de 4 semanas e apresentaram um resultado com diferença estatística entre o grupo tratado com PRP e o grupo controle, com valor aproximado de P = 0,59. A diferença em área por centímetro quadrado da ferida foi avaliada por observações semanais e padronizadas por um molde de plástico que era colocado sobre a ferida e mensurado por uma régua, onde foi observado e descrito em 5.2.1, observando a diminuição da área lesada e a retração das feridas, relatando que macroscopicamente as feridas tratadas apresentaram-se melhor organizadas, com sinais inflamatórios controlados, ou seja menos exsudação, edema e dor.

Já o membro que não foi tratado com PRP apresentou macroscopicamente sinais mais intesnsos de inflamação visualizados na figura 3 e no quadro 4, que definiu a diferença de até 9 centímetros quadrados de retração tecidual entre animais tratados e controle em um prazo de 30 dias.

Analisando os resulatdos através de um outro teste estatístico, analíse de regressão linear, estimamos que o efeito de tratamento ao longo do tempo sobre a área da lesão foi não foi significativo, mantendo o animal 1 que apresentou diferença nas retas lineares demonstrando que a diferença é pequena e não viabiliza o tratamento com PRP em ambos os grupos, já excluindo-se o animal 1, os resultados

relacionados a tempo versus diminuição na área de lesão são significativos entre o grupo tratado, apresentando uma taxa de diminuição da lesão maior do que no grupo controle. Onde pudemos observar que se excluíssemos o animal 1 do grupo apresentaria uma diferença de 0,13 cm^2 (tempo/cm^2 /dia),em relação ao grupo controle, sendo significativo ao tratamento com PRP, já se mantivéssemos o animal 1, o resultado seria não significativo, entretanto, observamos que mesmo com alteração do membro tratado no animal 1, ainda obtém-se uma diferença de 0,7 cm^2 (tempo/ cm^2 /dia) em relação ao grupo controle.

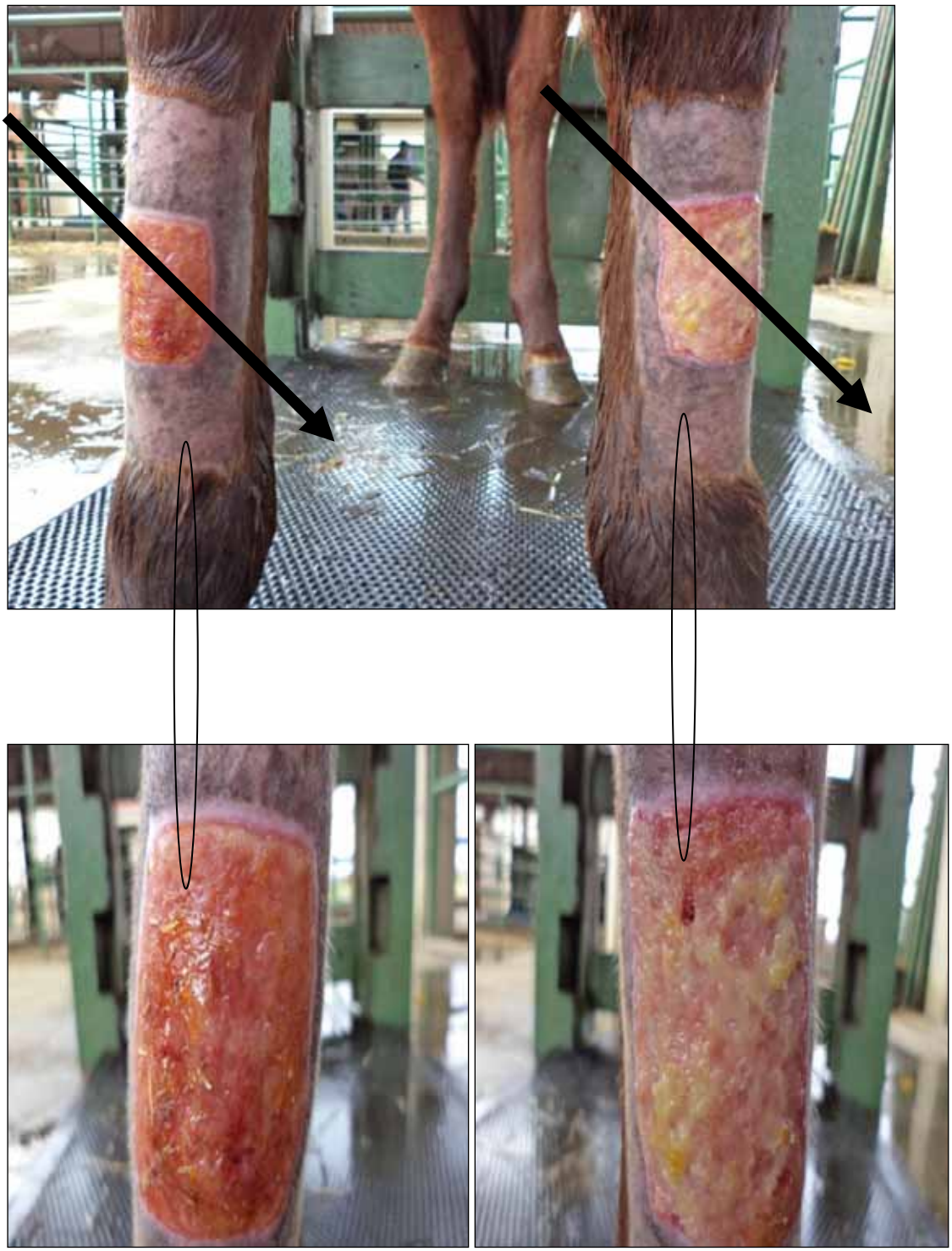


FIGURA 3. Visualização das feridas metacarpianas, observando a ferida tratada (figura esquerda) e a ferida controle (figura direita), apresentando sinais de inflamação no membro controle e no membro tratado uma aceleração do processo proliferativo.

QUADRO 1. Escore Quantitativo da Presença de Dor e Exsudação dos Animais Tratados e Controles.

	CONTROLE DA DOR		PRESENÇA DE SECREÇÃO	
MEDIDA	0-15 DIAS	15-30 DIAS	0-15 DIAS	15-30 DIAS
ANIMAL 1/C	2	1	3	1
ANIMAL 1/T	1	0	2	0
ANIMAL 2/C	1	0	2	1
ANIMAL 2/T	1	0	2	0
ANIMAL 3/C	2	1	3	2
ANIMAL 3/T	1	1	2	1
ANIMAL 4/C	1	0	3	2
ANIMAL 4/T	1	0	3	1
ANIMAL 5/C	2	1	3	1
ANIMAL 5/T	1	0	2	0
ANIMAL 6/C	1	0	2	1
ANIMAL 6/T	1	0	2	0

Legenda: C – CONTROLE/T - TRATADO

QUADRO 2. Resulatdos relacionados a ferida incisional na região metacarpiana de equinos, referindo a altura versus largura.

MEDIDA	LARGURA (cm^2)	ALTURA (cm^2)	ESPESSURA (cm^2)
ANIMAL 1/C	2	4	1
ANIMAL 1/T	3	5	1
ANIMAL 2/C	2	5	1
ANIMAL 2/T	2	4,5	1
ANIMAL 3/C	2	4	1
ANIMAL 3/T	2	3,5	1
ANIMAL 4/C	3	5	1
ANIMAL 4/T	2	4	1
ANIMAL 5/C	3	5	1
ANIMAL 5/T	2	4	1
ANIMAL 6/C	3	4,5	1
ANIMAL 6/T	1,5	3	1

Legenda: C – CONTROLE/T – TRATADO

QUADRO 3. Resultados diferenciais das áreas entre os grupos e tratados e controles.

	ÁREA CONTROLE (cm^2)	ÁREA TRATADO (cm^2)	DIFERENÇA (cm^2)
ANIMAL 1	8	15	-7
ANIMAL 2	10	9	1
ANIMAL 3	8	7	1
ANIMAL 4	15	8	7
ANIMAL 5	15	8	7
ANIMAL 6	13,5	4,5	9
MÉDIA	11,58	8,58	3
DESVIO PADRÃO	3,32	3,49	5,93

Nos resultados acima, embora podemos observar que houve diferença entre as médias dos grupos, esta não foi significativa, justificado por um animal (animal 1) que apresentou resultado discrepante durante o processo cicatricial.

QUADRO 4. Resultados das diferenças das áreas entre os animais do grupos tratados e controles, evidenciando o animal número 1.

	ÁREA CONTROLE (cm^2)	ÁREA TRATADO(cm^2)	DIFERENÇA($cm^{2)}$
ANIMAL 1	8	15	**-7**
ANIMAL 2	10	9	1
ANIMAL 3	8	7	1
ANIMAL 4	15	8	7
ANIMAL 5	15	8	7
ANIMAL 6	13,5	4,5	9
		MÉDIA	3
		DESVIO PADRÃO	5,93295879
		ERRO PADRÃO	2,42212028
		ESTATÍSTICA T	1,23858424
		PROB.SIGNIFICÂNCIA	**0,27047458**

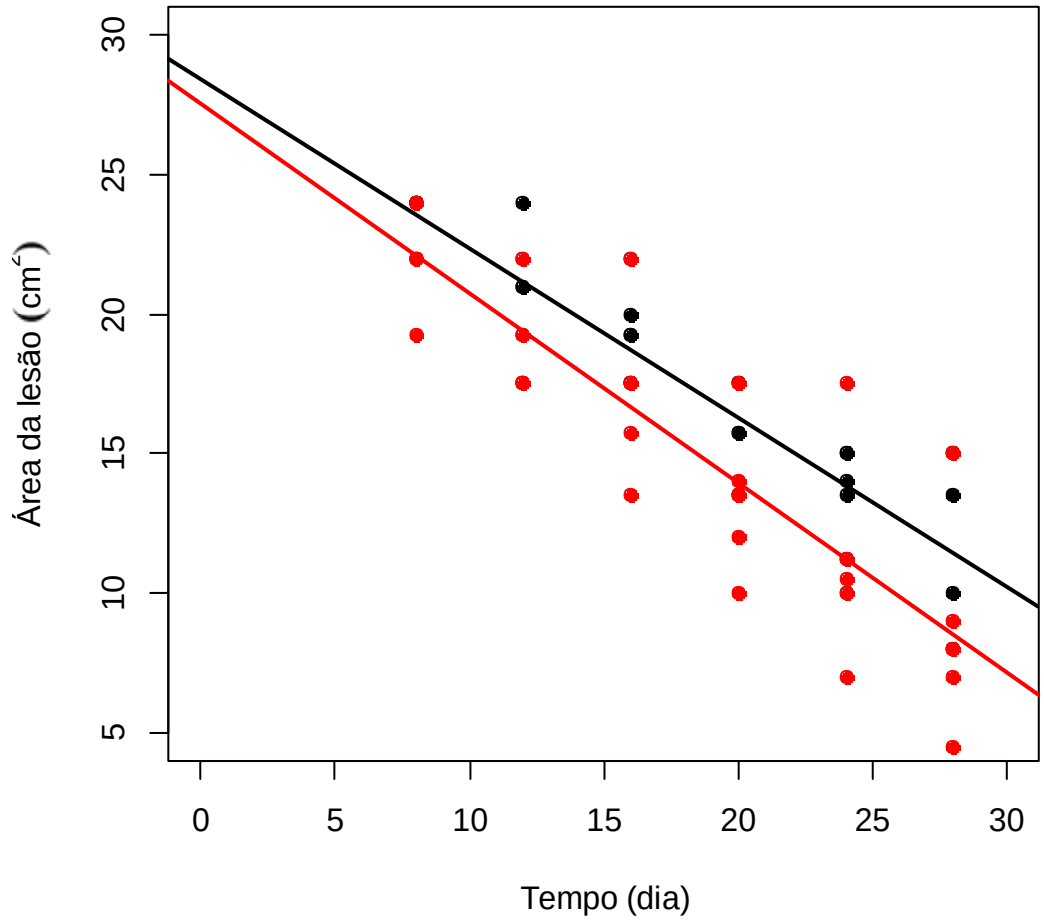
No quadro 4, os valores evidenciados são da diferença entre a área de ferida final aos 30 dias dos membros tratados em relação aos membros controles. Destacamos, em azul o resultado do animal de número 1 com resultados discrepantes.

QUADRO 5. Resultados diferenciais das áreas entre os animais do grupos tratados e controles, excluindo o animal número 1 da estatística.

	ÁREA CONTROLE (cm^2)	ÁREA TRATADO (cm^2)	DIFERENÇA (cm^2)
ANIMAL 2	10	9	1
ANIMAL 3	8	7	1
ANIMAL 4	15	8	7
ANIMAL 5	15	8	7
ANIMAL 6	13,5	4,5	9
Média	12,3	7,3	5
		MÉDIA	5
		DESVIO PADRÃO	3,74165739
		ERRO PADRÃO	1,67332005
		ESTATÍSTICA T	2,98807152
		PROB.SIGNIFICÂNCIA	**0,04041504**

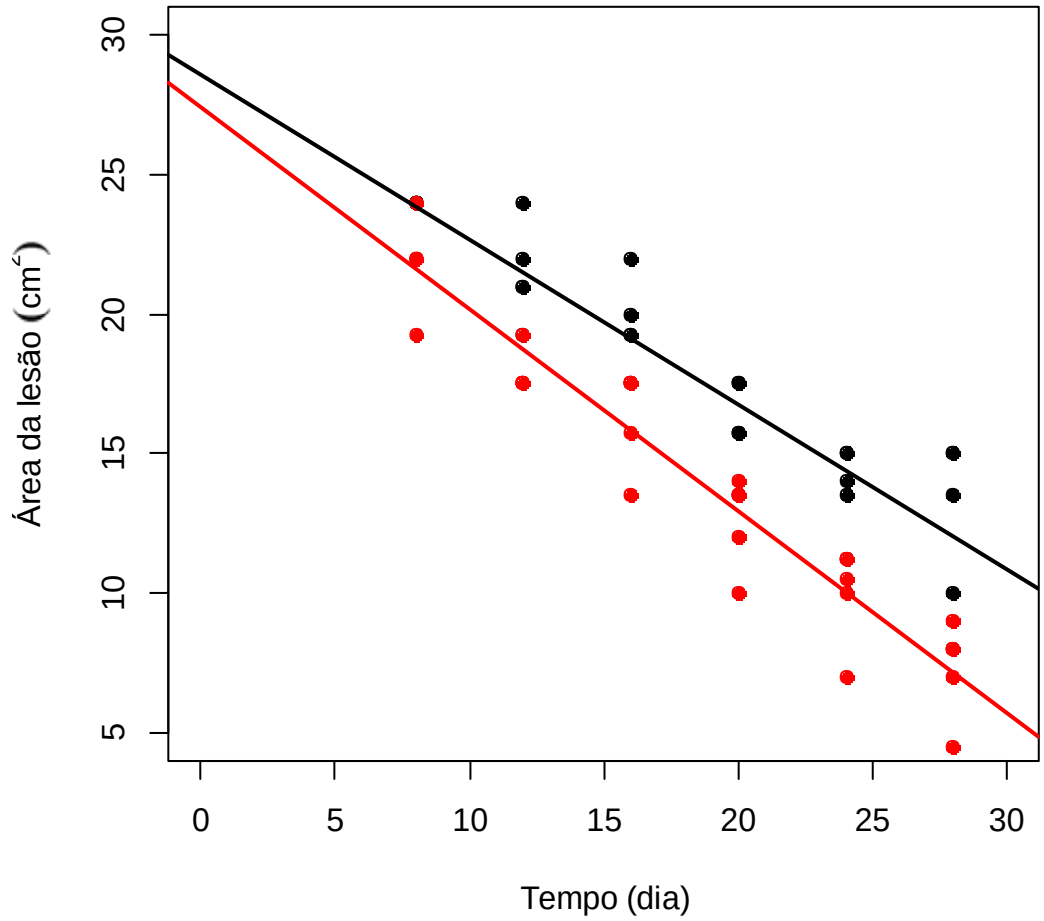
No quadro acima, os resultados se diferenciam, seguidos da exclusão do animal 1, observando no quadro, que houve significância em todos os animais que tiveram como tratamento o plasma rico em plaqueta, sendo um tratamento que viabiliza e acelera o processo de cicatrização comparado ao grupo que não houve tratamento.

Figura 4. Reta estimada para ambos os grupos tratado e controle, mantendo o animal 1 no grupo.



A estimativa da diminuição da área de lesão/dia no grupo controle mantendo o animal 1 e excluindo o dia 4(primeira mensuração), devido o valor se manter constante em ambos os grupos neste período é de 28,41 (área inicial) – 0,61 (tempo/cm ^{2} /dia), demonstrada pela reta preta, representado pelo grupo controle e 27,57 (área inicial) – 0,68 (tempo/ cm ^{2} /dia), demonstrada pela reta vermelha, representado pelo grupo tratado.

Figura 5. Reta estimada para ambos os grupos tratado e controle, excluindo o animal 1 no grupo.



A estimativa da diminuição da área de lesão/dia no grupo controle excluindo o animal 1 e excluindo o dia 4(primeira mensuração), devido o valor se manter constante em ambos os grupos neste período é de 28,61 (área inicial) – 0,59 (tempo/cm ^{2} /dia), demonstrada pela reta preta representado pelo grupo controle e 27,43(área inicial) – 0,72 (tempo/ cm ^{2} /dia), demonstrada pela reta vermelha, representado pelo grupo tratado.



Figura 6. Visualização das feridas metacarpianas de um animal do experimento, evidenciando as feridas tratadas (membro direito) e controle (membro esquerdo), o animal em destaque é o número 1, onde houve alteração resultando na exacerbação dos sinais de inflamação como mostrado na figura a esquerda que correlaciona ao membro tratado com PRP.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA REPARAÇÃO

De um modo geral, os dois grupos (tratado e controle) apresentaram características histopatológicas esperadas como: aumento de células, deposição de colágeno e presença de fibroblastos, houve marcante presença de células adiposas e glandulares.

Não foi possível observar o alinhamento e organização das fibras colágenas pelo curto período avaliado, tendo os dois grupos avaliações semelhantes quanto a disposição e organização das células.

Houve presença de neoformações de vasos, angiogênese que se apresentaram de forma irregular devido a sua formação ser comprometida com a reestruturação da matriz extracelular, tendendo a uma fragilidade da parede vascular visível a microscopia observando sua espessura através da migração celular evidente no local onde será formado o novo vaso, sendo que os neovasos sempre estavam acompanhados de uma vênula e uma arteríola, sendo uma próxima da outra, demonstrado na figura 6 e 7.

Os resultados histopatológicos e imunoistoquímicos revelaram que a escolha do tratamento foi eficaz através dos resultados obtidos como a maturação celular, a deposição de fibroblastos e colágeno e a expressão de fatores de crescimento no local.

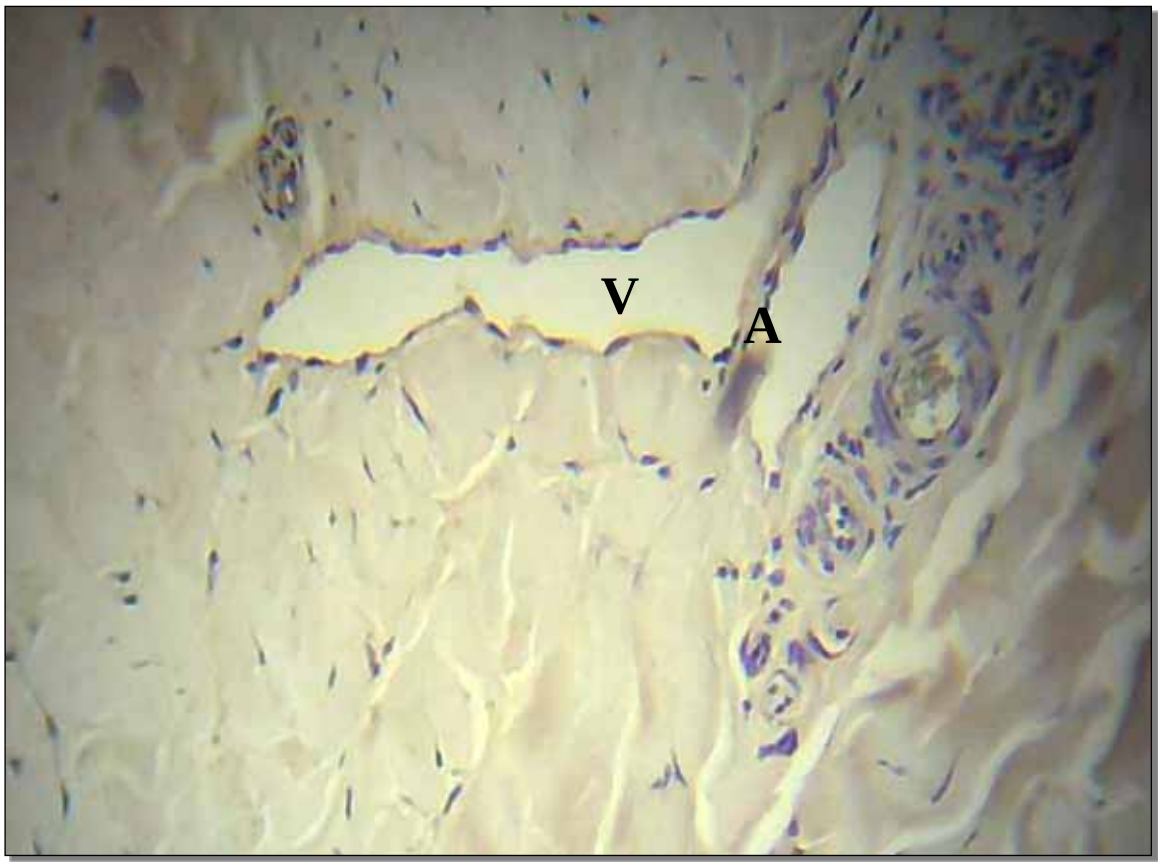
Não foi observado nas lâminas de controle negativo características durante a fase aguda, como a presença de tecidos necróticos, edemas e hemorragias. Foi encontrado grande quantidade de células da matriz extracelular que compõe o tecido conjuntivo propriamente dito, quantidade significativa de células de colágeno e

fibroblastos espalhadas pelo tecido conjuntivo localizado na região dérmica acompanhados de neoformações vasculares e células adiposas e sudoríparas. Os dois grupos, tratado e controle apresentaram uma hipercelularidade caracterizando uma aceleração no processo de cicatrização, demonstrado na figura 7.



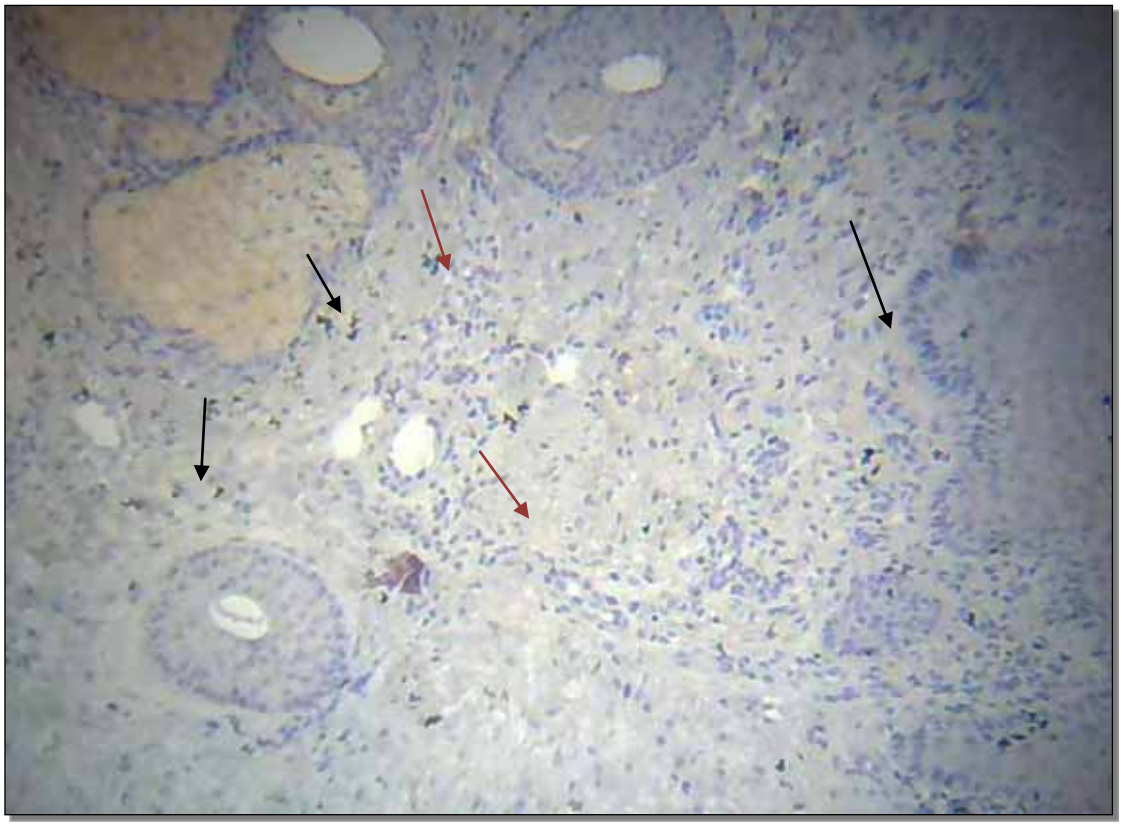
Aumento: 10 X

FIGURA 7. Na fotomicrografia, o círculo e a seta preta mostram um neovaso possivelmente uma vênula por apresentar paredes irregulares e menos espessas, as setas bordos indicam glândulas sebáceas que acompanham ao redor ou nas proximidades do folículo piloso que é indicado pela seta vermelha.



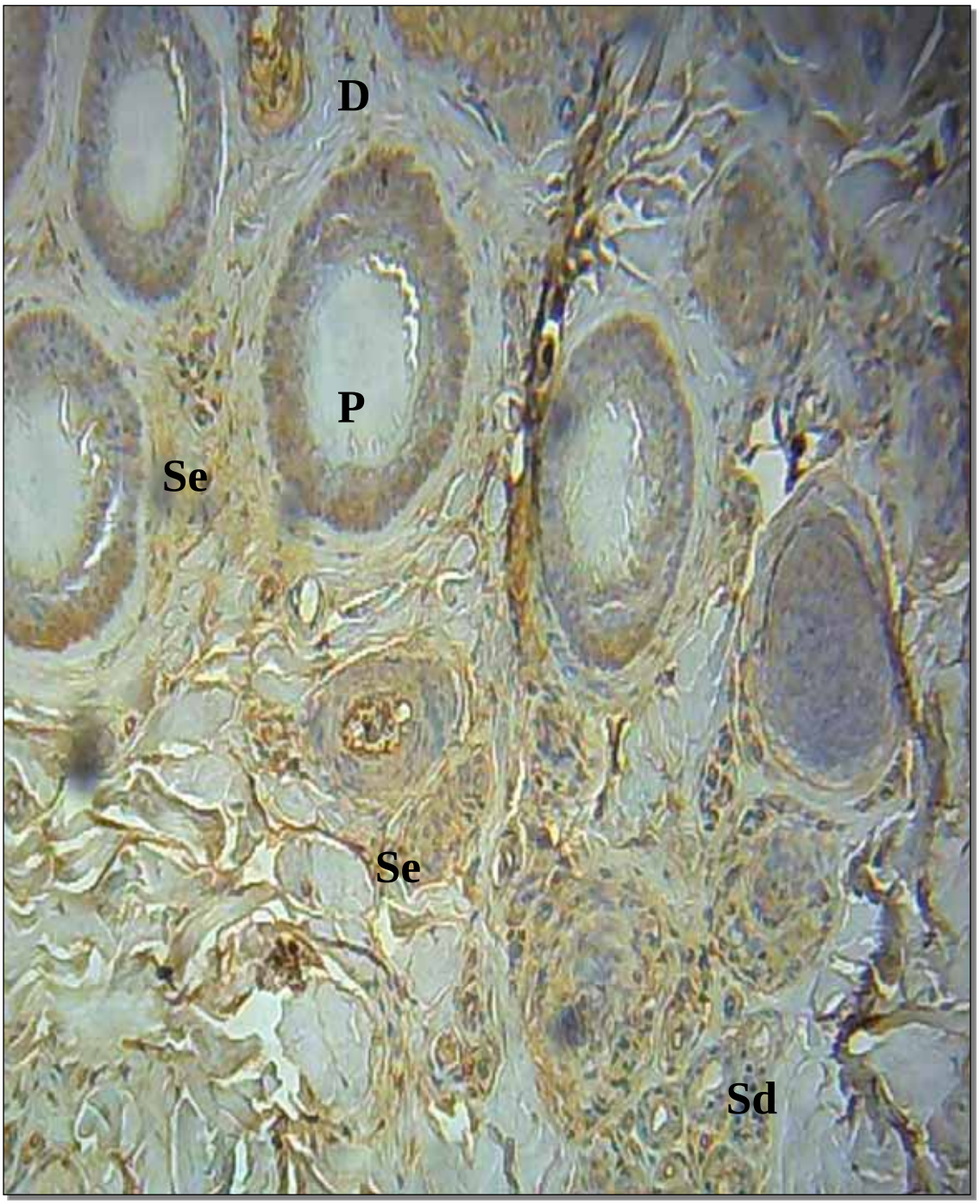
Aumento: 20 X

FIGURA 8. Fotomicrografia de neoformação de vasos, evidenciando que a arteríola (A) vem acompanhada de uma vênula (V).



Aumento: 20 X

FIGURA 9. Ilustração da região epidérmica e dérmica, evidenciando pelas setas pretas a presença de células de colágeno na região da derme e possivelmente figuras de mitose indicadas por setas vermelhas.



Aumento: 20 X

FIGURA 10. Fotomicrografia de Imunoistoquímica marcados pelo anticorpo IGF, nota-se a derme com tecido conjuntivo denso não modelado, presença de folículos pilosos (P), glândulas sebáceas (Se), glândulas sudoríparas (Sd) num corte transversal do tecido epitelial.

TABELA 2. Média dos escores quantitativos de marcadores para cicatrização do controle negativo obtido no tempo 0 (dia zero, no momento da incisão cirúrgica) adquiridos a partir do software Image J.

ANIMAL	IGF%	PDGF%	TGF B B%	VEGF%
1	49.689	19.724	25.445	29.246
2	43.419	47.738	39.949	37.892
3	33.377	35.086	20.605	29.686
4	42.489	30.045	31.523	46.718
5	42.243	39.079	40.538	30.773
6	36.866	32.226	25.922	25.732
MÉDIA	41.347	33.983	30.664	33.341
DESV.PADRÃO	5.157	8.546	7.476	7.476

TABELA 3. Média dos escores quantitativos de marcadores para cicatrização do membro tratado com plasma rico em plaquetas (PRP) obtido no tempo 30 (30 dias pós lesão) adquiridos a partir do software Image J.

ANIMAL	IGF%	PDGF%	TGF β%	VEGF%
1	5.558	48.473	42.985	26.424
2	36.651	32.295	26.603	24.817
3	43.185	23.580	20.610	22.284
4	22.584	30.356	28.363	23.559
5	31.759	31.088	33.132	14.522
6	41.930	54.655	32.750	10.433
MÉDIA	30.278	36.741	30.741	20.340
DESV.PADRÃO	13.009	10.986	6.893	5.819

TABELA 4. Média dos escores quantitativos de marcadores para cicatrização do membro controle que não recebeu tratamento com plasma rico em plaquetas (PRP) obtido no tempo 30 (30 dias pós lesão) adquiridos a partir do software Image J.

ANIMAL	IGF%	PDGF%	TGF β%	VEGF%
1	49.127	31.198	31.637	31.983
2	41.769	34.642	27.575	18.351
3	42.022	5.810	26.925	14.903
4	31.978	28.247	37.515	11.332
5	34.551	34.504	31.654	23.136
6	45.248	34.485	29.225	30.732
MÉDIA	40.783	28.148	30.755	21.740
DESV.PADRÃO	5.893	10.255	3.521	7.684

TABELA 5. Média das concentrações dos fatores de crescimento no tempo 0 com o controle negativo e tempo 30 com os membros tratados e controles.

	IGF%	TGFβ%	PDGF%	VEGF%
CONTROLE NEGATIVO	41.347	33.983	30.664	33.341
TRATADO	30.278	36.741	30.741	20.340
CONTROLE	40.783	28.148	30.755	21.740

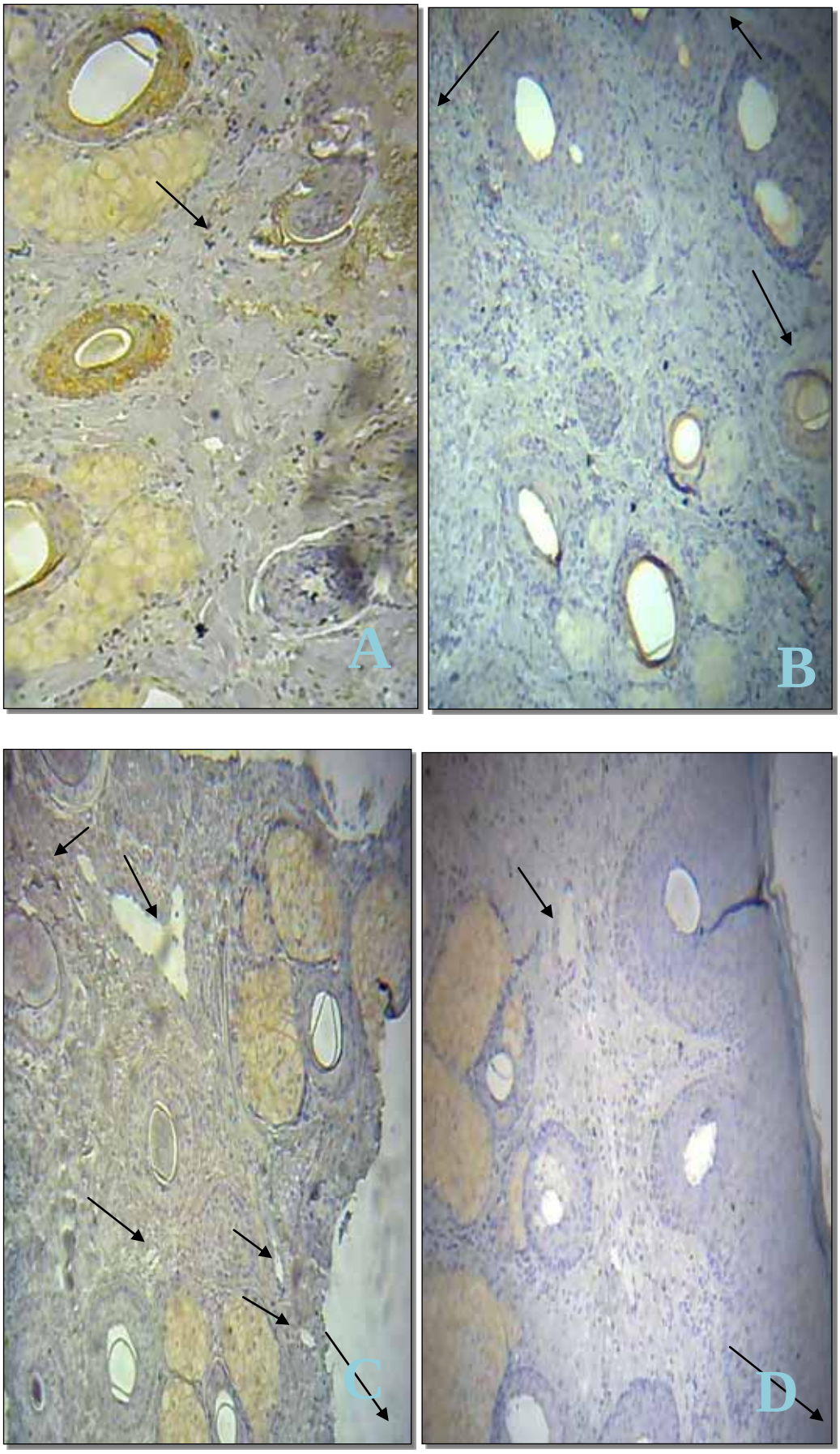
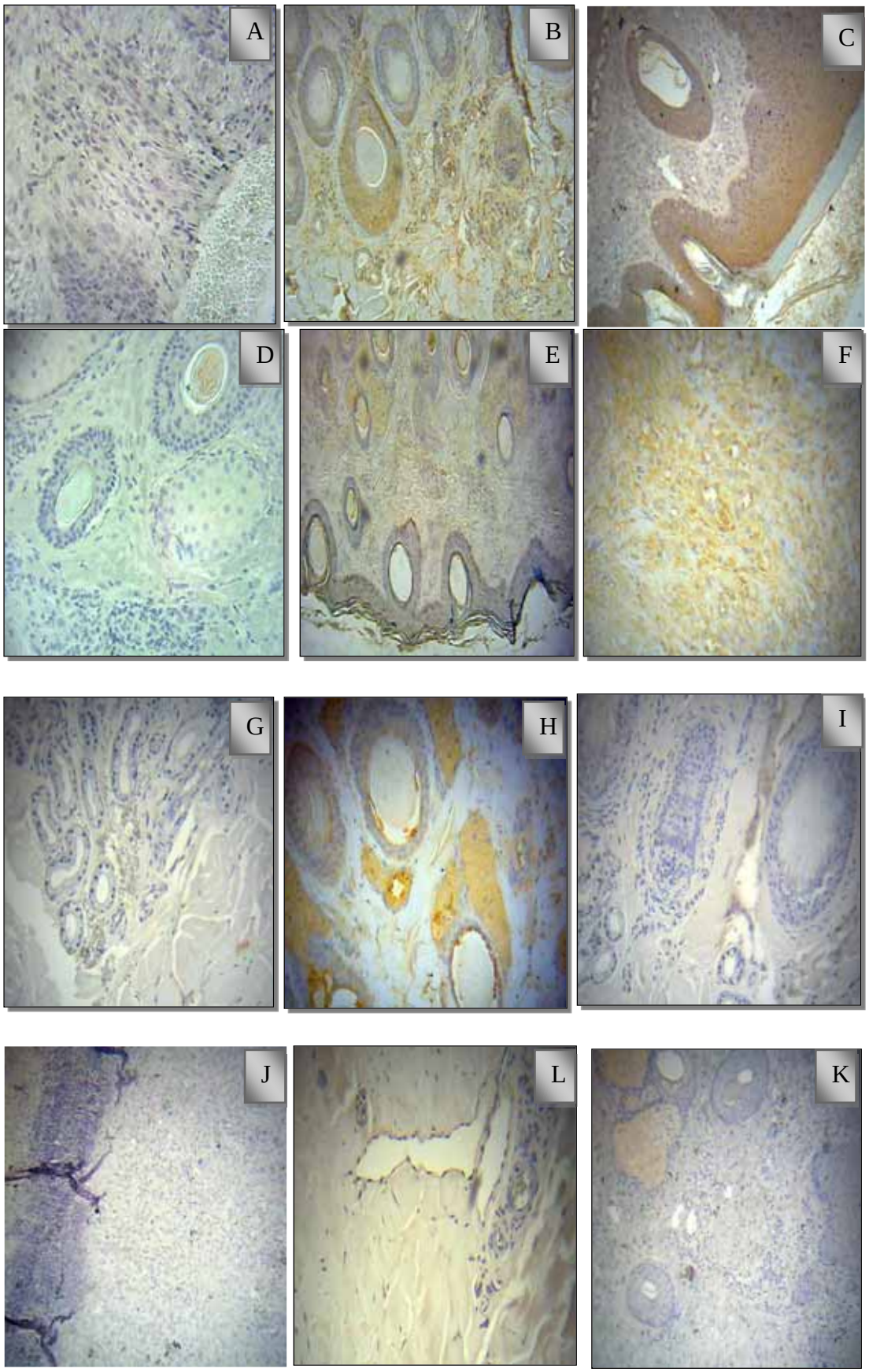

A
B
C
D

FIGURA 11. Visualização que segua na página 62, da marcação de IGF em membros tratados, evidenciando com setas pretas as glândulas sebáceas e sudoríparas ao redor do folículo piloso (A), e na figura B marcação do IGF é menos expressiva em membros controle. Na figura C, a visualização de arteríolas e vênulas em formação, marcados pelo VEGF em membros tratados e na figura D a imunorreatividade para neovasos é pouco significativa em membros controle apresentados pelas setas pretas. **Aumento: 20X**



Aumentos: As figuras A, J e K 10 X.As figuras B,C, D. E, F, G, H, I e L 20 X

FIGURA 12. As figuras acima representam cortes histológicos submetidos a técnica de imunoistoquímica, sendo aplicado para identificação de fatores de crescimento, alguns marcadores. Na figura A, B e C, observa-se a marcação de IGF (fator de crescimento derivado da insulina, a figura D, E e F observa-se a marcação com PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), e a figura G,H e I representam a marcação do TGFβ (fator de crescimento transformante) e as figuras J,L e K representam a marcação com VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) sequenciadas pelo controle negativo, membro tratado e membro controle.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O experimento buscou avaliar os efeitos da utilização do plasma rico em plaquetas na reparação tecidual de feridas induzidas na região metacarpiana de equinos por meio de avaliações macroscópicas, morfométricas, histológicas e imunoistoquímicas.

6.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

A escolha dos protocolos de Carmona, 2009 e Vendramin et al. 2006, discutido por Vendruscolo e colaboradores (2012) e modificado por nossa equipe objetivou a obtenção de um maior número de plaquetas concentradas relacionando ao valor basal de cada animal, onde conseguimos o valor médio de 4 vezes. Embora Oleza (2009) relate que um concentrado plaquetário para aplicação biológica deve ter de 2,5 – 10 vezes o valor sanguíneo basal, acreditamos, baseados em observações clínicas, que uma concentração entre 5 a 8 vezes no plasma rico em plaquetas, seria a ideal. Dentro do objetivo que tivemos de ter uma maior concentração plaquetária, devemos considerar um limite, pois uma concentração acima de 10 vezes pode propiciar um aumento na quantidade de fibrose do final da cicatrização, o que dependendo do tipo de tecido pode não ser desejável. Pinto et al. (2014) e Monteiro (2009) e Souza et al. 2014 compartilham desta idéia sugerindo que quantidades elevadas de plaquetas poderiam resultar em efeitos indesejáveis como alterações na proliferação de fibroblastos.

O momento da coleta sanguínea, a preparação, a cuidadosa manipulação das amostras, a centrifugação e o armazenamento do PRP resultaram em: um melhor

concentrado plaquetário, diminuindo o rompimento das plaquetas um menor número de leucócitos e uma diminuição na agregação plaquetária corroborando com Mazzucco e colaboradores (2009) que referiram sobre os resultados da concentração e contagem plaquetária e de fatores de crescimento, discutidos acima como relevância para obtenção de um PRP de qualidade satisfatóira e concentrado em plaquetas viáveis.

Na obtenção do PRP, a contagem plaquetária resultou em valores variáveis entre 625.000 e 842.000 µL de plaquetas concentradas, e valores entre 129.000 e 181.000 µL de plaquetas basais, as hemácias entre 6.370.000 e 8.100.000 µL e os leucócitos entre 7.600 e 11.600 µL. Estes valores de PRP foram considerados adequados de acordo com Maia (2009), Carmona (2009), Textor (2011), Bosh (2011), Vendruscolo (2012), Zandim e colaboradores (2013), e justificados no experimento realizado por Vendruscolo (2012) que avaliou diversos protocolos no objetivo de quantificar o maior número de concentrado plaquetário, revelando que um maior número de plaquetas favorece a reparação e regeneração do tecido, confirmados por Nikolidakis e Janses (2008).

Através dos testes realizados durante o experimento, observamos a facilidade na realização de um tratamento inovador e de qualidade, apresentando formas alternativas para o tratamento de uma ferida em membros de equinos, identificando-se com a afirmação que o PRP é um tratamento acessível, de baixo custo e rico em fatores de crescimento, que viabiliza e acelera o processo de cicatrização, promovendo a proliferação, diferenciação e remodelamento do tecido, corroborando com Pierce(1991) que diz que o plasma rico em plaquetas é um produto autógeno, atóxico e fonte de fatores de crescimento.

Através de estudos, fizemos a escolha dos fatores de crescimento mais expressivos em feridas, de acordo com a sua imunoreatividade à partir da contagem de lâminas de imunoistoquímicas, determinando resultados quantitativos por pixels/ área, embora concientes de que a imunoistoquímica é basicamente uma avaliação qualitativa. Procuramos observar a expressividade de cada um independentemente, estando de acordo com os resultados de Declair (1999), Ksander e colaboradores (1990) e Ross e Pierce (1989) referindo que os principais fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização são o PDGF (Fator de Crescimento Derivaddo da Plaquetas), IGF (Fator de Crescimento Derivado da Insulina), TGF β (Fator de Crescimento Transformante Beta) e VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), que são expressos significativamente em tecido epidérmico e dérmico.

6.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MORFOMÉTRICA

A reparação de feridas em regiões distais de membros na espécie equina é comparada lenta e por muitas vezes ocorre de forma inadequada e irregular em função da alta retração da ferida, da baixa taxa de epitelização e da predisposição à formação de granulação exuberante (WILMINK et al., 1999). Em nosso experimento estávamos atentos quanto ao tempo máximo de cicatrização, considerando o processo completo, levando-se em consideração o tamanho da ferida, o formato retangular desta e por ser em região dos membros de equinos, esperávamos uma maior dificuldade no processo de reparação, o que não ocorreu. Sendo assim pudemos observar uma rápida reparação e uma síntese e organização das fibras de colágeno que aceleraram a formação de uma nova pele semelhante à que foi extraída pela indução cirúrgica. Segundo Wilmink & Van Weeren, 2005 esssa variação na taxa de

cicatrização das feridas de equinos dependem principalmente da localização, pois lesões cutâneas localizadas no tronco cicatrizam mais rapidamente do que dos membros. Theoret e colaboradores (2013) relacionaram esta variação na reparação de uma ferida com vários fatores, dentre eles a extensão, localização anatômica da lesão e infecção local. Cochrane (1997) comparou as feridas em membros de equinos com úlceras que ocorrem em pernas do homem, principalmente em relação a resistência a cicatrização.

A escolha do formato retangular das feridas ocorreu em função de proporcionarmos uma lesão crítica com maior dificuldade de reparação. MADISON & GRONWALL (1992) referiram que o formato da ferida em equinos não interfere no tempo de cicatrização. Porém no homem há evidências que o tamanho, forma e profundidade da ferida afetam a taxa de contração, observando-se que feridas lineares fecham mais rapidamente, seguidas das retangulares e circulares.

No transcorrer da evolução das feridas dos equinos estudados, algumas caracteriísticas devem ser destacadas, como à partir de dois dias, não evidenciamos qualquer característica marcante ou ressalva entre as feridas realizadas dos dois grupos (tratados e controles). Durante a primeira semana não observamos diferença entre o processo de cicatrização dos animais tratados e controles provavelmente por apresentar influxo diminuído de polimorfonucleares, linfócitos e sinais inflamatórios em ambos os grupos, desacelerando simultaneamente as fases cicatriciais que segundo Wilmink e colaboradores (1999), os equinos em relação aos pôneis apresentam um retardo na cicatrização devido ao influxo mais lento de

polimornucleares, quimioatrativos e fatores de crescimento que são necessários para iniciar a resposta à inflamação.

A aplicação subcutânea pode ter amplificado a inflamação inicial, porém Monteiro et al. (2009) não referiram efeito adverso, como inflamação exacerbada ou infecções decorrente desta aplicação.

Após, e durante a primeira quinzena houve uma súbita diferenciação entre as feridas, sendo a tratada, caracterizada por apresentar organização, diminuição nos sinais de inflamação como exsudação, edema e dor e com granulação ativo. Estas características da ferida após o tratamento com PRP local estão de acordo com Smith & Thomas, 2009 que observaram a aceleração da maturação de feridas após o tratamento com o PRP e contrário ao experimento de Souza et al, 2014 que não observaram nenhum benefício do tratamento com PRP.

Houve apenas o animal um, com ferida contaminada que apresentou resultados totalmente adversos aos outros animais, seu membro tratado apresentava características inflamatórias reativas, observando-se exsudação intensa, dor e edema.

O tecido de preenchimento (granulação) tinha aspecto desorganizado e irregular, visualizados na figura 4, que evidenciou a marcante presença de crostas, exsudação, pontos hemorrágicos, aumento dos bordos, aumento de temperatura e sensibilidade dolorosa. O processo de cicatrização em equinos, temos uma grande diferença de evolução relacionada à localização das mesmas, segundo Jacobs et al. (1984) e Knottenbelt (1997). Junior (2010) relata que, de uma forma geral, as feridas lombares cicatrizaram mais rapidamente do que as feridas metacarpianas, com uma contração centrípeta maior, um granulação mais delgado e uma formação de crostas

mais rápida. Schumacher et al (1992) afirma que os primeiros dias são os momentos onde ocorreu maior pico de sensibilidade, hemorragia, edema e secreção ao redor da área traumatizada.

Durante a terceira semana os animais receberam uma segunda aplicação de PRP, mas não ficaram contidos em baias onde estavam sendo alojados, mas foram soltos em piquetes. Nos primeiros dias seguidos da aplicação, as feridas se mostraram levemente inflamadas, entretanto observamos que com a fisioterapia natural, seguida de trotes e galopes no local que se encontravam, propiciou um auxílio na retração das feridas e acelerou o processo de diminuição do seu tamanho. Consideramos este fato relevante, uma vez que inferimos que a exposição ao sol e ao exercício contínuo e diário tenham também contribuídos para o crescimento epitelial e formação de um novo tecido no local. De acordo com Maciel (2012), a dupla aplicação de PRP desfavorece o processo de cicatrização, já que ao aplicar novamente o produto resulta em uma nova estimulação inflamatória, reeiniciando o processo de quimiotaxia de polimorfonucleares e novamente a degranulação plaquetária. Em nosso trabalho também observamos, após a segunda aplicação, uma reagudização e o aparecimento de alguns sinais inflamatórios que já haviam desaparecido no tecido. Entretanto após a segunda aplicação de PRP notamos uma aceleração do processo cicatrical nos últimos dias, confirmados em alguns animais que apresentaram uma redução significativa na extensão da ferida, alcançando uma diferença na redução da lesão de até 9 cm^2, onde a média foi de 3 cm^2. De acordo com Textor, 2011 uma segunda aplicação de PRP seria benéfica, embora não exista um protocolo definido relacionado ao benefício da repetibilidade das aplicações.

Esta retração tecidual foi também observada por Martins e colaboradores (2013), que avaliaram feridas de metacarpo e metatarso. Entretanto a comparação deve ser realizada com cautela devido a diferença do tamanho das feridas do trabalho em questão. Utilizando membranas de quitosana para avaliar a cicatrização de feridas de metacarpo e metatarso de 20 mm de diâmetro em formato circular, observaram que a partir da terceira semana houve diminuição gradativa de lesão. Souza (2006), obteve, em feridas de 2,0 cm de diâmetro tratadas com creme a base de *Triticum vulgare,* o fechamento completo aos 32 dias de tratamento. Um fato importante a ser considerado é o tamanho inferior das feridas tratadas nos experimentos destes autores recém citados, o que dificulta a comparação dos resultados com o nosso experimento.

Durante a quarta semana o grupo tratado com PRP destacou-se pela diminuição do tamanho da ferida, apresentando resultados diferenciados de acordo com cada animal, mas em geral expressivos quando correlacionados ao grupo controle, que não foi tratado com PRP, alcançando até 80% de diminuição comparado à ferida original. Contudo não foi possível avaliar o fechamento total das feridas, pois o experimento tinha como objetivo apenas a avaliação durante 30 dias corridos. Assim, pode-se afirmar que a utilização do PRP como forma de tratamento ainda necessita ser melhor estudada. De acordo com Andia et al. (2012), a origem da eficácia do PRP parece ser mais complexa do que se pensa, sendo importante considerar que as plaquetas possuem centenas de outras moléculas envolvidas.

A questão do tempo de ação do PRP também deve ser pesquisado, pois em nosso experimento tivemos uma diminuição do tamanho da ferida após 15 dias da primeira aplicação de PRP e logo após a segunda aplicação do mesmo, sobrepondo o

discreto processo inflamatório instaurado. Já Ferreira (2007), e Monteiro et al (2009) observaram que o PRP teria uma ação biológica principalmente no início do processo de reparação de feridas em equinos, porém sem reduzirem o tempo total de cicatrização, relatando que o período máximo de fechamento das feridas tratadas com PRP foi maior do que nas feridas não tratadas, sugerindo que a terapia com PRP tem melhor efeito na fase inicial. Maia et al. (2009) observaram melhora histopatológica do tecido com reparação uniforme e organizada 36 dias após a aplicação intralesional do PRP em lesões do TFDS de equinos induzidas experimentalmente com colagenase.Wilmink & van Werren, 2004. sugeriram que uma das possibilidades da ação do PRP numa fase de reparação mais tardia, seria devido à ação do TGF β por este fator estimular a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos.

Segundo Maciel (2012), o processo de cicatrização de feridas tratadas com PRP apresentou microscopicamente melhor organização de fibras colágenas quando comparadas com feridas não tratadas com PRP. Apesar da diminuição do tamanho da ferida, não tivemos uma total organização da matriz extracelular e densidade de fibras colágena em nosso experimento uma vez que observamos que o tempo máximo para o fechamento das feridas foi de 60 dias e o tempo proposto no experimento realizado foi de avaliações em 30 dias.

A forma simplificada da utilização do PRP (plasma rico em plaqueta) injetável nos bordos de feridas comprovou macroscopicamente e estaticamente que houve uma redução no tamanho da ferida, sendo visualizado através do acompanhamento clínico e morfométrico realizado durante todo o processo, o que difere do relato de Pinto et al. (2014) que observara um maior tempo de cicatrização nos animais tratados com PRP.

Observamos no experimento o benéficio da terapia celular com a utilização de plasma rico em plaquetas, visualizando que o tratamento de escolha para feridas metacarpianas equina foi viável, apresentando resultados significativos acelerando o tempo de cicatrização e redução de área da lesão, enfatizando que o formato crítico e o local de escolha proporcionavam possíveis dificuldades e complicações para uma cicatrização completa e rápida.

6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Na avaliação histopatológica foi confirmada a presença de lesões na região epidérmica e dérmica dos animais, observando-se o epitélio estratitificado bem caracterizado pelas camadas celulares que derivam de uma única camada basal. Essas membranas são altamente diferenciadas para funções secretoras e absortivas, por possuírem alto poder mitótico. Em meio ao tecido conjuntivo, onde houve presença expressiva de grupos celulares glandulares, sebáceas e sudoríparas, encontramos presença de proliferação fibroblástica, alterações na organização celular, descontinuidade do alinhamento das fibras, aumento na celularidade, encontrando figuras de mitose e grande quantidade de colágeno, presença de vasos e inicialmente neoformações de arteríolas e vênulas, apresentando formatos e bordos irregulares, sendo uma formação normal do novo endotélio dos vasos, apresentados por George e Castro (1998), Kierszenbaum (2011). Já Pool (1996) sugeriu que a pouca celularidade e vascularizão indicam a progressiva maturação do tecido, sendo uma das funções do colágeno exercer força mecânica através do seu envolvimento nas paredes dos capilares. Entretando a dificuldade em encontrar outros exeprimentos equivalentes ao

nosso e também um desconhecimento na especificidade de cada marcador escolhido, acreditando que pudesse haver reações cruzadas frente aos trabalhos em ratos e humanos, torna considerável inferir que existe a necessidade de estudos aprofundados e mais experimentos relacionados ao assunto. Por isso fez-se necessário a utilização de uma analíse da lesão através de um software Image J que proporcionou de forma quantitativa, mensurações expressa em porcentagem (%) de área/pixels. Avaliadas pelas lâminas individualmente e obtendo uma média de cada marcador sugerindo a contagem por área corada com o marcador de escolha.

Observando as dificuldades, acreditamos que há necessidade de novas pesquisas sobre marcação e identificação de células, considerando o que Taylor et al. (2009) e Carvalho (2009) discutem sobre as avaliações imunoistoquímicas.

A utilização de marcadores celulares, e a técnica de imunoistoquímica, foram consideradas uma contribuição significativa para obtenção dos resultados no presente trabalho. Assim a realização dos cortes nos tempo 0 e 30 dias, além da avaliação morfométrica que auxiliaram na visualização da redução das feridas, ressaltando a importância da mioretração e fisioterapia “natural” que proporcionaram aos animais do experimento uma aceleração significativa após os 15 dias de tratamento. Além disso, evidenciou a redução na atividade inflamatória visível das feridas tratadas, com diminuição da exsudação e sensibilidade dolorosa do local.

Devemos ressaltar, mais uma vez, que a região de escolha da indução das feridas é um local desfavorecido em decorrência da anatomofisiologia do equino, já que o local é pouco irrigado por vasos sanguíneos e presença diminuída de grupos

musculares, além de apresentar uma série de estruturas comprometedoras como ligamentos, tendões, vasos e nervos que facilitam um erro iatrogênico, que devido às particularidades da cicatrização em partes distais de membros de equinos e à escassez de informações referentes ao uso de biomateriais na reparação de feridas nessa espécie segundo Martins et al.(2013) sendo o objetivo do trabalho avaliar as possíveis complicações em membros de equinos e quantificar os fatores de crescimento que acelera a cicatrização de feridas cutâneas em membros locomotores de equinos.

Barra (2006), Motta (2008) e Mutschall (2009) realizaram a marcação de fatores de crescimento no tecido de reparação seguindo a técnica de imunoistoquímica para marcadores Ki67 e VEGF em ratos Wistar, avaliando a presença de neovasos entre os dois tipos de marcadores e considerando a imunorreatividade de cada um. Este relato foi semelhante ao nosso trabalho onde avaliamos marcadores (IGF, PDGF, TGF β e VEGF) para anticorpos celulares, e ressaltamos através da observação e leitura das lâminas imunoistoquímicas algumas divergências como variações entre animais tratados e controle. A predominância de marcadores para tecido epidérmico foi maior do que por vasos e tecido conjuntivo, sendo observado nas lâminas de IGF e VEGF que podem ser melhor visualizadas na figura 9, apresentando também um aumento em marcações para glândulas sebáceas e sudoríparas e um número menor para marcadores relacionados a presença de vasos (VEGF). Experimentos de Carvalho (2009) mostrava maior expressão de VEGF em neovasos com marcadores que predominavam na presença de fluxo sanguíneo ou seja que já haviam sido formados. Em nosso experimento observamos que há marcação pelo VEGF em neovasos, porém apresenta-se na fase de iniciação da parede endotelial,

tornando o resultado subjetivo decorrente das intensas atividades celulares protagonizadas pelo rompimento de ligações cruzadas durante a fase proliferativa e de remodelamento,

O marcador IGF foi encontrado em maior quantidade, nas células da camada basal do estrato queratinizado epidérmico, que é justificado pela extensa proliferação e diferenciação celular que ocorre nesta região da epiderme e na região da derme. Este achado está de acordo com o relato de Jeschke (2005), que relacionou a expressão de IGF com a ação mitogênica dos fibroblastos. Textor et al. (2011) referiram que a concentração de IGF-1 nas plaquetas é muito baixo em comparação aos níveis deste no plasma circulante.

Já o fator de crescimento proliferativo (PDGF), manifestou sua presença, marcando significantemente as proliferações da camada dérmica, junto à presença de colágeno e matriz extracelular, o que corroborou com Arguelles et al.(2006), Roberts to Sporn (1996) e Kninghton et al. (1986) que relataram que o PDGF atua na região dérmica com ação principalmente na migração celular, angiogênese e aumento na expressão de TGF β.

A expressão do fator de crescimento transformante (TGF β) ocorreu em maior número de células sebáceas e glândulas sudoríparas que circundam o folículo piloso, sendo anexos dos mesmos, comprovando a sua ação como agente inibitório no crescimento epitelial e sua capacidade de inibir a expressão de receptores para PDGF, que tem como função a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, células musculares lisas, que auxiliam na retração da ferida e monócitos, corroborando com

Caminoto (2003) que demonstrou a forma ativa de TGF β na proliferação de fibroblastos, demonstrado também por Ghahary (2002), Bourder e Ruoslahti (1992) que destacaram a capacidade de autoregulação do TGF β. Theoret et al. (2002) também associaram a imunorreatividade e presença do marcador associado ao reparo tecidual e em tecido cutâneo sadio.

O aumento na imunorreatividade de TGF β em animais tratados concorda com Coffey et al. (1988) e Werner e Grose (2003) mostrando, que a expressividade de TGF β na cicatrização de feridas cutâneas , tem uma ação paradoxa. Enquanto o TGF β exógeno estimula a reepitelização, migração de queratinócitos e formação de granulação, o endógeno demonstrou inibir a epitelização.

Nas literaturas consultadas não foram encontrados muitos estudos sobre o uso de PRP em feridas cutâneas em membros, e nem sobre especificidade de marcadores. Portanto faz- se necessário o aprofundamento de estudos específicos com marcadores de tecido cutâneo em equinos, proporcionando resultados mais precisos e confiáveis, além de padronizar técnicas para futuras pesquisas.

A continuidade deste estudo permitirá analisar o tempo de ação desses fatores de crescimento, suas viabilidades, período residual, qual momento exato da predominância de suas ações e qual especificidade celular. Entretanto no trabalho realizado a analíse foi para a redução da extensão da ferida e marcações por meio de anticorpos celulares que interagiam com as células coradas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A analíse dos resultados macroscópicos e morfométricos evidenciou que a utilização de plasma rico em plaquetas resultou na efetividade do tratamento de feridas metacarpianas de equinos, expressados através dos resultados de retração da área de lesão), aceleração do processo de cicatrização e diminuição dos sinais inflamatórios durante o período de avaliação (30 dias).

As avaliações histopatológicas e imunoistoquímicas demonstraram que os marcadores de escolha (IGF, PDGF, VEGF e TGFβ), foram importantes para visualizar o processo cicatricial.

8 . CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

A – Adaptação pessoal e estruturação do projeto

B – Seleção e adaptação dos animais. Avaliação Clínica

C – Coleta do Plasma Rico em Plaqueta (PRP)

D –Indução das Lesões nos membros de escolha

E - Realização do implante de PRP nos membros tratados

F – Avaliação Macroscópica, Morfometríca e Biópsia

G – Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica

H – Análise estatística e Interpretação de resultados

I – Atualização Bibliográfica

J – Redação Final do Trabalho

L - Tradução e Envio para Publicação

	2012										2013												2014											
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
A	X	x	x	x	x	x	x	x																										
B									x	x	x	x	x	x	x	X																		
C																x	x																	
D																x	x																	
E																X	x	x																
F																x	x	x	x															
G																								x	x	x								
H																									x	x								
I																								x	x	x	x	x						
J																										x	x	x						
L																												x	x					

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

AMBROSE, J. Á; WEINRAUCH, M. Thrombosis in ischemic heart disease. **Arch. Intern. Med.**, v. 156, p. 1382-1394, 1996.

AMOS, D. J.; Tonkin, A.M.; White, H.D. New insights into the patogenesis, prevention and management of acute coronary sindromys. **Aust. N.Z. J. Med**., v. 26, p. 344-348, 1996.

ALVES, A.L.G.; SAITO, M.E.; KOHAYAGAWA, A.; AMORIM, R.L.; MOTA, L.S.; OLIVEIRA, P.G.G.; HUSSNI, C.A.; THOMASSIAN, A. WATANABE, M.J. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in experimental superficial digital flexor tendonitis after autologous implanto f boné marrow mesenchymal stem cell. IN: **CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION WEVA**, 10., Moscow. Proceedongs...Moscow: WEVA, 2008 a . p. 521 -522.

ANDERSON, D. Wound management in small animal practice. **In Practice**, v.18, n. 3, p. 115 – 129, 1996.

ANDIA I., SÁNCHEZ M. & MAFFULLI N. 2012. Joint pathology and platelet-rich plasm therapies. **Expert Opion Biol**; Ther. 12:7 – 22, 2014.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparations of future sites for implants. **The international journal of oral & maxillofacial implants**, v.14, n.4, p.529-535, 1999.

ANITUA E, ANDIA I, ARDANZA B, NURDEN P, NURDEN AT. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb Haemost**. 2004;91:4-15.

ANITUA E. Effectiveness of autologus preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. Disponível em: URL: **http://www.interscience.wiley.com [2007 June 26].**

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.U.; PASTOR, J.; et al. Evaluation of Single and Double Tube Methods for Concentrating Equine Platelets. **Res Vet Science**, v.81, 2006. p.237-245.

ARGUELLES, D.; CARMONA, J.U.; CLIMENT, F.; et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Vet. Rec**. v.162, n.7, 2008. p.208-211.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURL, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **RBCF - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol 41, n. 1, Jan/ Mar, 2005.

BLOTNIK, S.; PEOPLES, G. E.; FREEMAN, M. R. E.; EBERLEIN, T. J.; KLAGSBRUN, M. T. Lymphocytes synthesize and export heparing-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblast differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. **Proc. Natl. Acad. SCI**. USA., v. 91, p. 2890-2894, 1994.

BRANSKI R.C., ROSEN C.A., VERDOLINI K. & HEBDA P.A. 2005. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice**. 19(2):283-289.

BEHNKE, O.; FORER, A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. **Eur J Haematol Suppl** 1998;61(1):3–23.

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. Am J Vet Res., v.64, n.1, p.88-92, 2003. Disponível em: <**http:// avmajournals.avma.org/loi/ajvr>.**Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.88.

BOSCH G, VAN SCHIE HT, DE GROOT MW, *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. **J Orthop Res**. 2010;28(2):211-217.

BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; *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**. v.21, 2011. p.554-61.

BLANES, L.Tratamento de Feridas. Baptista Silva JCC. Cirurgia Vascular: guia ilustrado. Disponível em **URL:http// www.bapbaptista.com**, São Paulo, 2004.

BROUGHTON, G. II; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg** 2006;117(Suppl 7S):1eS–32eS.

CAMINOTO, E.T.C. **Efeito das ondas de choque extracorpóreas na desmite experimentalmente induzida em eqüinos.** 2003. 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

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. **Arch. Med. Vet**., v.41, 2009. p.175-179.

CARMONA, J.U.; LOPEZ, C.; GIRALDO, C.E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. **Arch Med Vet**, v.43, 2011. p.1-10.

CARVALHO, A.M. **Implante autológo de células tronco mesenquimais do tecido adipose no tratamento de tendinitis experimentais em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.** 2009. 135 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

CARVALHO, P.T.C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos. P. 72, 2002.

CAVALCANTE, L.C.; MOREIRA, M.C.; LIMA MOTA, O.M.; TURATTI, E.; VIANA, F.A.C.; PEREIRA, S.L.S. Efeito da Pedra Umes no Processo de Cicatrização Tecidual. Estudo Histológico em Dorso de Ratos. **Braz. J. Periodontal**, v.22, n.1, 2012.

COCHRANE, C.A.; FREEMAN, K.L.; KNOTTENBELT, D.C. Effect of growth factors on the caracteristics of cells associated with equine wound healing and sarcoid formation. **Wound Repair and Regeneration**, 4, 58-65, 1997.

COFFEY, R.J. Jr.; BASCOM, C.C.; SIPES, N.J.; GRAVES- DEAL, R. WEISSMAN, B.E.; MOSES, H.L. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor b. **Mol. Cell Biol**., v. 8, p. 3088-3093, 1988.

COLLER BS, PEERSCHKE EL, SCUDDER LE, SULLIVAN CA: A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrino- gen to platelets produces a hrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins llb and/or lila. J **Clin. Invest**. 72:325, 1982

CONTRAN RS, KUMAR V, COLLINST , ROBBINS: Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001: 44-100.

CLARK,R.A.F. Biology of dermal repair. **Dermatol. Clin. II:** 647 – 666, 1993.

CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. **Cytokine Growth Factor Rev**., v. 8, p. 45-62, 1997.

CHVAPIL, M. et al. Dynamics of healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. Exp Mol Pathol, v.30, n.3, p.349-359, 1979. Disponível em: <http://journals.ohiolink.edu/Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1016/0014-4800(79)90089-3.

DAVIES MJ, THOMAS AC. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. **Brit Heart J.** 1985; 53: 363-73.

DECLAIR, V., 1999. The importance of growth factors in wound healing. **Ostomy Wound Manage.** 45, 64–68.

DIEGELMAN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute fibrotic and delayed healing. **Front Biosci** 2004;9:283–9.

Di PIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock,** v. 4, p. 233-240, 1995.

DUTSCHALL, L.; FRANÇA, P.C.; FERREIRA, L.E.; FRONZA JR., H.; BLASIOS, R.; PINHO, M. Analíse da Relação entre a expressão da proteína VEGF e o Estadiamento do câncer colorretal. **Ver. Bras. Coloproct.,** v. 29, n.1, 2009.

DYSON, S.J. Diagnosis and Prognosis of suspensory desmitis. In: Dubai Equine International Symposium: The Equine Athlete: Tendon, Ligament and soft Tissue Injuries, 1996.Dubai. Proceedings…Dubai: Neyenesch Printers, p. 207 – 225, 1996.

DYSON, S.J. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). **Equine Veterinary Journal**, vol.36, n. 5, p. 415-419, 2004.

EHRLICH H.P. & DIEZ T. Role for gap junctions intercellular communications in wound repair. **Wound Repair and Regeneration.** 2003.11:481-489.

EMING, S.; KRIEG, T. DAVIDSON, J. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of investigate Dermatology**, v.127, p. 514 – 525, 2007.

ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOOBELER, M.; DEBUS, S.; BRÜCKER, E. B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase- specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing**. Am. J.Pathol.,** v.153, p. 1849-1860, 1998.

ENOCK, S.; LEAPER, D.J. Basic Science Of Wound Healing, **Surg**. 26:31 – 37, 2007.

EPPLEY, B.L.; WOODELL, J.E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast ReconstrSurg** 2004;114(11):1502–8.

EPPLEY, B.L.; Platelet rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. **Plast Reconstr Surg** 2006;118(6):147e–59e.

FARRAG,T. et al. Effect of plateled rich plasma and fibrin selant on facial nerve regeneration in a rat model. **Laringoscope**, v.117, p. 157 – 165, 2007.

FERREIRA, J. C.; SOUZA, M.V.; VILÓRIA, M.I.V.; FONSECA, E.F.; VIANA, M.W.S. ; COSTA, J.C.M. Efeitos da monofenilbutazona na cicatrização por segunda intenção em equinos. **Ceres** S4: 263 – 270, 2007.

FLEMING BC, SPINDLER KP, PALMER MP, MAGARIAN EM, MURRAY MM. Collagen-platelet composites improve the biomechanical properties of healing anterior cruciate ligament grafts in a porcine model. **Am J Sports Med**. 2009;37:1554-1563.

FREITAS M.C., MEDEIROS A.B.F., GUEDES M.V.C., ALMEIDA P.C., GALIZA F.T. & NOGUEIRA J.M. 2011. Úlcera por pressão em idosos institucionalizados: Análise da prevalência e fatores de risco. **Rev Gaúcha Enferm**. 32(1):143-150.

FONSECA, F.A. **Influência do dia de aplicação do Plasma Rico em Plaquetas no tratamento de Tendinite em Equinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília/UnB, 63 p., 2012. Dissertação de Mestrado.

FOSTER TE, PUSKAS BL, MANDELBAUM BR, GERHARDT MB, RODEO SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. **Am J Sports Med**. 2009;37:2259-72.

GABBIANI, G.; RAYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fribroblats in granulation tissue and possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, n. 5 p. 549-550, 1970.

GAILIT, J.; WELCH, M.P.; CARK, R.A. TGF-beta 1 stimulates expression on keratinocytes integrins during re- epithelialization of cutaneous wound. **J. Invest. Dermatol**., v. 103, p. 221-227, 1994.

GEORGE, L.L.; CASTRO, R.R.L. Histologia Comparada, 2 ed. São Paulo: **ROCA**, 286 pg., 1997.

GHAHARY A, SHEN YJ, NEDELEC B, SCOTT PG, AND TREDGET EE. Enhanced expression of mRNA for insulin-like growth factor-1 in post-burn hypertrophic scar tissue and its fibrogenic role by dermal fibroblasts. **Mol Cell Biochem** 148: 25–32,2002.

GHANDY, A. Et al. The effects of local plateled rich plasma delivery on diabetic fracture healing.**Bone**, v.38, p. 540 – 546, 2006.

GROSE R, WERNER S, KESSLER D, TUCKERMANN J, DURKA S, HUGGEL K, REICHARDT H, AND WERNER S. A role for endogenous glucocorticoids in wound repair. **EMBO Reports** 3: 575–582, 2002.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. **Rev. Odontol.** Univ. São Paulo, v. 6, 66-71, 1992.

HALLORAN C.M. & SLAVIN J.P. 2002. Pathophysiology of Wound Healing. Surgery (Oxford). **The Medicine Publishing Company Ltd**. 5(1):i-v.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha-granules. **Blood Rev** 1993;7(1):52–62.

HASHIMOTO T, NOBUHARA K, HAMADA T. Pathologic evidence of degeneration as a primary cause of rotator cuff tear. **Clin Orthop Relat Res.** 2003;415:111-120.

HELDIN, C.H.; ERIKSSON, U.; OSTMAN, A. New members of the plateled-derived growth factor family of mitogens. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 398, p.284-290, 2002.

HENDRICKSON, D.; VIRGIN, J. Factors that affect equine wound repair. Vet Clin Equine, v.21, p.33-44, 2005.

Disponível em: **<http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739(04)00083-5/fulltext>.** Acesso em: 07 mar.2013. doi:10.1016/j.cveq.2004.11.002.

HUBNER, G.; HU, Q.; SMOLA, H.; WERNER, S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. **Dev. Biol**., v. 173, p. 490-498, 1996.

IRION G. 2005. Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores/Glenn L.Irion; tradução João Clemente Dantas do Rego Barros. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p.390.

JACOBS, K.A.; LEACH, D.H.; FRETZ, P.B.; et al. Comparative aspects of the healing of excisional wounds of the leg and body of horses. **Vet. Surg**. v. 12, p.83-90, 1984.

JESCHKE MG, RICHTER G, HOFSTADTER F, HERNDON DN, PEREZ-POLO JR, AND JAUCH KW. Non-viral liposomal keratinocyte growth factor (KGF) cDNA gene transfer improves dermal and epidermal regeneration through stimulation of epithelial and mesenchymal factors. **Gene Ther** 9: 1065–1074, 2005.

JOHNSTON, D. E. Wonnd healing in skin. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practica**, v. 20, n.1, p. 1-25, 1990.

JORIS, J.L., DUBNER, R., HARGREAVES, K.M. **Opioid analgesia at peripheral sites: a target for opioids released during stress and inflammation?** Anesthesia and Analgesia, v.66, n.12, p.1277-81, 1997.

JUNIOR, L.A. T.O., **Efeitos do Uso Tópico de Óleo de Semente de Girassol (Helianthus annus) em Feridas Cutâneas Experimentalmente Induzidas em Equinos.** UVV – CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA .57 pg. 2010. Dissertação de Mestrado.

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

KIERSZENBAUM, A. Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução a Patologia. **ELSIEVER**, 455 p. , 2004.

KIERSZENBAUM, A. Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução a Patologia. **ELSIEVER**, 455 p. , 2011.

KSANDER, G.A., CHU, G.H., MCMULLIN, H., OGAWA, Y., PRATT, B.M., ROSEN- BLATT, J.S., MCPHERSON, J.M., 1990. Transforming growth factors- 1 and 2 exhance connective tissue formation in animal models of dermal wound healing by secondary intent, in: Piez, K.A., Sporn, M.B. (Eds.), Transforming Growth Factor- 's: Chemistry, Biology, and Therapeu- tics, Vol. 593. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York.

KNINGHTON DR, CIRESI K, FIEGEL VD, et al., Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet derived wound healing factors (PDWHF). **J Ann Surgery** 1986;204:322-330.

KNOTTENBELT D.C. Handbook of equine wound management. Liverpool, UK: WB **Saunders**. 2003.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. 2005. Robbins e Cotran – Patologia: bases patologicas das doencas. 7a ed. **Elsevier**, Rio de Janeiro.

LEFKOVITS, J.M.B.; PLOW, E.F.; TOPOL, E.J. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine. **N Engl J Med** 1995; 332:1553-1559June 8, 1995DOI: 10.1056/NEJM199506083322306

LIEBERMAN, J. DALUISKI, A. EINHORN, T. The hole of growth factors in the repair bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.84, n.6, p. 1032 – 1042, 2002.

LIMA R.O.L., RABELO E.R., MOURA V.M.B.D., SILVA L.A.F., TRESVENZOL L.M.F. 2012. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação. Revisão de literatura**. Revista CFMV.** Ano XVIII. 56:53-59.

MACIEL,F.B.; DeROSSI, R.; MODOLO, T.J.C.; PAGLIOSA, R.C.; LEAL, C.R.J.; DELBEN, A.A.S.T. Scanning electron microscopy and microbiological evalution of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel tratament. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. **ELSIEVER**, v. 38, p. 1058 – 1065, 2012.

MADISON, J.B.; GRONWALL, R.R. Infl uence of wound shape on wound contraction in horses. **Am J Vet Res**, v.53, n.9, p.1575- 1578, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/1416358>. Acesso em: 07 mar.2013.

MAIA L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.

MAN, D.;, PLOSKER, H., WINLAND-;Rown J.E. The use of autologous plateletrich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plast Reconstr Surg**. 2001;107(1):229-37.

MANDELBAUM S.H., DI SANTIS E.P. & MANDELBAUM M.H.S. 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte 1. **An Bras de Dermatol.** Jul./ago., Rio de Janeiro, RJ. 78(4):393-410.

MARTINS, E.A.N.; INVERNIZZI, M.S.; CAMPOS, M.G.N.; TEODORO, P.A.; CONTIERI, M.B.; CORREIA SILVA, L.C.L. Emprego da Membrana Quitosana em Feridas Cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. **CIÊNCIA RURAL**, Santa Maria, v.43, n. 10, p. 1824 – 1830, 2013.

MARX R. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dent.** 2001;10:225-228.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg** 2004;62(4):489–96.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. Journal Oral Maxillofacial Surgery, n. 62, p.489-496, 2005. Disponível em: <**http://www.joms.org/article/S0278-2391%2803%2901272-2/abstract>.** Acesso em 22 de outubro de 2011. doi:10.1016/j.joms.2003.12.003.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annu. Rev. Biochem**., v. 67, p. 753-791, 1998.

MAZZUCCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E.; GUASCHINO, K.; BORZINI, P. Not every PRP gel is Born equal Evalution og growth factor availability for tissues through four PRP gel preparations: Fibrinet®, Regen PRP - Kit®, Plateltex® and one manual procedure. **Vox Sanguinis**, v.97, n.2, p.110 – 118, 2009.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An . Bras. Dermatolog.,** v.84, n.3, p. 257 – 262, 2006.

MESSORA M, BRAGA L, OLIVEIRA G, OLIVEIRA LF, MILAGRES R, KAWATA L, et al. Healing of Fresh Frozen Bone Allograft with or without Platelet-Rich Plasma: A Histologic and Histometric Study in Rats. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2011 Dec 16. doi: 10.1111/j.1708-820 8.2011.00419.x. [Epub ahead of print]

MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O.M.; THEORET, C.L. Effects of plateled rich plasma on the repairo f wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **Am.J. Vet.Res**. 70: 277 – 282, 2009.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor b stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: imolications for wound healing**. Proc. Natl. Acad. Sci.** USA., v.85, p. 4894-4897, 1988.

MURRAY MM, PALMER M, ABREU E, SPINDLER KP, ZURAKOWSKI D, FLEMING BC. Platelet-rich plasma alone is not sufficient to enhance suture repair of the ACL in skeletally immature animals: an in vivo study. **J Orthop Res.** 2009;27(5):639-645.

MURRAY MM, SPINDLER KP, BALLARD P, WELCH TP, ZURAKOWSKI D, NAN- NEY LB. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold. **J Orthop Res**. 2007:25(8):1007-1017.

NAVARATNA, M.A.; SAHL, H.G.; TAGG, J.R. Identification of genes encoding two component lantibiotic production in Sthaphylococcus aureus CSS anal other phage group II S. aureus strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene. **Infect. Immun.**, 67 (8), 4268 – 4271, 1999.

NETO J.C.L. Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos em 2003. Online. Disponível na internet **http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf**

NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatoty macrophages. **J. Exp. Med**., v. 156, p. 430-442, 1992.

NIKOLIDAKIS D. & JANSES J.A. 2008. The biology of platelet-rich plasma and it application in oral surgery: literature review. **Tissue Eng. B.Rev**. 14(3):249-258.

O'DELL, S.D.; DAY, I.N.M. Molecules in focus: insulin-like growth factor II (IGF-II). Int. J. Biochem. **Cell Biol**., v. 30, p. 767-771, 1998.

OLEZA, I.A., La **Terapia de Lesiones de Tejidos Blandos Y Articulaciones Con Plasma Rico En Plaquetas En Caballos De Deporte: Evidencias Clínicas Y Bioquímicas Que Validan Su Utilización.** 2009. 243p. Dissertação de PhD (Doutorado em Medicina Veterinária). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2009.

OLIVEIRA A.F. 2008. **Avaliação da atividade cicatrizante da Caesalpinia ferrea (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, Rio grande do Norte, 65p.

PAGANELA J.C., RIBAS L.M., SANTOS C.A., FEIJÓ L.S., NOGUEIRA C.E.W. & FERNANDES C.G. 2009. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **RPCV**. 104(569-572):13-18.

PEACOCK JR., E. E. The wound repair. Philadelphia: **W B Saunders**, 1984. p. 76-85.

PETRUNGARO P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. **Dent Implantol Update** 2002b; 12(6):41-6.

PIERCE GF, MUSTOE TA, ALTROCK BW, DEUEL TF, THOMASON A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. **J Cell Biochem** 1991;45(4): 319-26.

PIERCE, G.F., BERG, J.V., RUDOLPH, R., TARPLEY, J., MUSTOE, T.A., 1991. Platelet derived growth factor-BB and transforming growth factor beta-1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofi- broblasts in excisional wounds. **Am. J. Pathol.** 138, 629–646.

POOL, R.R. Pathologic changes in tendinitis of athletic horses. In: RANTANEN N.W.; HAUSER, M.L.; RANTANEN,M.R.(Eds.). DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1., Dubai, 1996. Proceedings... Dubai: **Neyenesch Printer**, 1996. p.109-117.

RAISER, A.G. Regeneração Tecidual. IN: Patologia Clínica Veterinária, 1 ed. Universidade Federal de Santa Maria. **Centro de Ciências Rurais**, v.1, cap. 5, p. 115 – 134, 1995

RAMALHO L.N.Z., SÉRGIO Z., RAMALHO, F.S., CASTRO-E-SILVA JR. O. & CORRÊA F.M.A. Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. **Arq. Gastroenterol**. 40(1). 2003.

RICHES, D. W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F., (Ed.) The molecular and cellular biology of wound repair. 2. ed. New York: **Plenum,** 1996, p. 143-168.

ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; ASSOIAN, R.K.; SMITH, J.M.; ROCHE, N.S.; WAKE-FIELD, L.M.; HEINE, U.I.; LIOTTA, L.A.; FALANGA, V.; KEHRL, J.H.; FAUCI, A.S. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA., v. 83, p. 4167-4171, 1986.

ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Transforming growth factor-b. In: The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. 2 ed. New York: **Plenum**, 1996, p. 275-308.

ROCHA JUNIOR A.M., OLIVEIRA R.G., FARIAS R.E., ANDRADE L.C.F & AERESTRUP F.M. 2006. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An. Bras. Dermatol**. Rio de Janeiro, 81(2):150-156.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Adv. Drug. Deliv. Rev.,** 28:1595 – 1611, 2003.

SALIM,D.P.V. Plasma Rico em Plaquetas: Uso em Lesões Tendíneas de Equinos.Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Porto Alegre, 28 p. 2012. **Tese de Conclusão de Curso.**

SANCHEZ M, AZOFRA J, ANITUA E, ANDÍA I, PADILLA S, SANTISTEBAN J, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. **Med Sci Sports Exerc.** 2003;35:1648-52.

SANTORO, M.M. & GAUDINO G. 2005. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**. 304:274-286.

SARANDY M.M. 2007**. Avaliação do efeito cicatrizante do extrato de repolho (Brassica oleracea var. capitata) em ratos wistar.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 49p.

SEISHIMA, M.; NOJIRI, M.; ESAKI, C.; YONEDA, K.; ETO, Y.; KITAJIMA, Y. Activin A induces terminal differentiation of cultured human keratinocyte. **J. Invest. Dermatol**., v. 112, p. 432-436, 1999.

SCHMIDMAIER, G.; HERRMANN, S.; GREEN, J. et al. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. **Bone** 2006; 39(5):1156–63.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H. Environmental Skin diseases. In: SCOTT,D.N.; MILLER, W.H., editors. Equine Dermatology.2nd ed., St. Louis; Saunders, pg.600-27, 2011.

SLATER M, PATAVA J, KINGHAM K, MASON RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **J Orthop Res** 1995;13(5):655-63.

SPLINDER, K.P.; INRO, A. K.; MAYES, C.E.; DAVIDSON, J.M. Patellar Tendon and Anterior Cruciat Ligament have different mitogenic responses to platelet – derived growth factor and transforming growth factor beta. **J. Orthop. Res.,** p. 542 – 546, 1996.

SHIMIZU T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **Journal of Dermatological Science.** 37:65-73, 2005.

SHIMIZU, A.; KATO, M.; NAKAO, A.; IMAMURA, T.; TEN DIJKE, P.; HELDIN, C.H.; KAWABATA, M. SHIMADA, S.; MIYAZONO, K.; Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signaling in a human epidermal keratinocyte cell line. **Genes Cells**, v. 3, p. 125-134, 1998.

SMITH, S.E.; THOMAS, S.R. Bone and Wound Healing Augmentation with Plateled- Rich Plasma. **Elsiever**. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery. Vol 26, Issue 4, 2009, p. 559-588.

SCHUMACHER, J.; BRUMBAUGH, G.W.; HONNAS, C.M. et al. Kinetics of healing of grafted and nongrafted wounds on the distal portion of the forelimbs of horses. **Am. J. Vet. Res.,** v.53, p.1568-1571, 1992.

TAYLOR, S.E.; VAUGHAN-THOMAS, A.; CLEMENTS, D.N.; PINCHBECK, G.; MACRORY, L.C.; SMITH, R.K.W.; CLEGG, P.D. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 27, 2009.

TEXTOR JA, NORRIS JW, TABLIN F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. **Am J Vet Res**. 2011;72:271-8.

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

TODD, R.; DONOFF, B.R.; CHIANG, T.; CHOU, M.Y.; ELOVIC, A.; GALLAGHER, G.T.; WONG, D.T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **Am. J. Pathol.,** v. 138, p. 1307-1313, 1991.

THOWARTH, M. et al. PRP modulates expression of boné matrix proteins in vivo without long term effects on boné formation. **Bone**, v.38, p. 30 – 40, 2006.

VENDRAMIN, F.S. FRANCO D., NOGUEIRA C.M., PEREIRA M.S. & FRANCO T.R. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; FRANCO, T.R. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Brazilian Journal Plastic Surgery.** 2009; 24(2): 212-8.

VENDRAMIN FS, FRANCO D, NOGUEIRA CM, PEREIRA MS, FRANCO TR. Platelet-rich plasma and growth factors: processing technique and application in plastic surgery. **Rev Col Bras Cir**. 2006;33:24-8.

VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A.M.; MORAES, L.F.; MAIA, L. QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesq. Vet. Bras**., 33(2): 106 – 110, 2012.

VIEIRA C.S.C.A, MAGALHÃES E.S.B. & BAJAI H.M. 2002. **Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas**. Caderno de reabilitação em Hanseníase. 2:52.

XU, P.; JACOBS, A. R.; TAYLOR, S.I.; interaction of insulin receptor substrate 3 with insulin receptor, insulin receptor- related receptor, insulin like growth fator 1 receptor and downsteram signaling proteins. **J. Biol. Chem**., 274: 15262 – 15270, 1999.

WANG H. et al. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: na autoradiographic sthudy on dogs. **J Periodontol** 1994;65(5):429-36.

WANG,X.; CHEANG, Q.; LAILING, Li; WANG, J.; XIA, L.; XU, X.; SUN, Z. Toll-like receptors 2 and 4 mediate the capacity of mesenchymal stromal cells to support the proliferation and differentiation of CD 34^{+} cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.318,n.3, p. 196 – 206, 2013.

WANKELL, M.; KAESLER, S.; ZHANG, Y.Q.; FLORENCE, C.; WERNER, S.; DUAN R. The activin binding proteins follistatin and follistatin-related protein are differentially regulated in vitro and during cutaneous wound repair. **J. Endocrinol**., v. 171, p. 385-395, 2001.

WATANABE N, MORI TAISUKE. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. **Dermatol Sci** 2005; 40:205-8.

WERNER S. & GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, p. 83, 2003.

WILMINK, J.M. et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopical aspects. Equine Vet J, v.31, p.53-60, 1999. Disponível em: **<http://onlinelibrary. wiley.com/doi/10.1111/evj.1999.31.issue-1/issuetoc>.** Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb03791.x.

WOO, S.L.; HILDERBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A.; PAPARGEORGIOU, C.D.; WANG, J.H.C. Tissue engineering of ligament and tendon healing. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, Suppl. S 312 - S323, 1999.

YANG,Y.; LIU,H.; LIU, G.; RAN, X.; **Antibacterial effect of autologous plateled rich gel derived from health volunteers in vitro.** Zhongguo, Xiu, Fu, Chong, Jian, Wai, Ke, Za, Zhi. 24(5): 571 – 6, 2010.

ZAMBRUNO, G.; MARCHISIO, P.C.; MARCONI, A.; MELCHIORI, A.; GIANNTTI, A.; DE LUCA, M. Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. **J. Cell Biol**., v. 129, p. 853-865, 1995.

Zandim BM, de Souza MV, Magalhães PC, et al. ultra structure and morphometry in the platelet-rich plasma of horses. **J Pesq veterinary Brasil.** 2012;32(1):83-92.

ARTIGOS

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os **artigos científicos**, **revisões** e **notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem**.

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão**. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão**. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão**. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível

em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de ***Sitophilus oryzae*** (L.), ***Cryptolestes ferrugineus*** (Stephens) e ***Oryzaephilus surinamensis*** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural** , Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas caracterísitcas digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Artroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings…** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: http://www.zh.com.br/especial/index.htm

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

"Trabalho a ser enviado para a Revista Ciência Rural."

PRP e Fatores de Crescimento: Importância no tratamento de feridas equinas?

PRP and Growth Factors: Importance in the treatment of equine wounds?

Vanessa Justiniano Bermejo [1] , Ana Lúcia Miluzzi Yamada [1] , Karoline Rodrigues[1] , Mirian Rodrigues[1], Mariana Lopes Conceição [2], Gustavo Parisi [2] , Celso Antônio Rodrigues [3], Carlos Alberto Hussni [3], Marcos Jun Watanabe [3], Ana Liz Garcia Alves [3] .

[1] Pós Graduandos/Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, UNESP/Botucatu,SP – Brasil.

[2] Alunos de Iniciação Científica e Graduação do Curso de Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, UNESP/Botucatu – SP – Brasil.

[3] Docentes Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, UNESP/Botucatu – SP – Brasil.

Autor para Correspondência: Vanessa Justiniano Bermejo, Hospital Veterinário, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior, sem número. CEP: 18.618-000, Botucatu – SP – BRASIL. Telefone: (14) 3811-2022. E-mail: vanessa.bermejo2011@gmail.com

RESUMO

A cicatrização da pele é o objetivo de estudos e pesquisas, devido ao seu interesse clínico, científico e econômico, principalmente devido à grande freqüência de feridas causadas por lesões em cavalos. A cura da ferida é um fenômeno fisiológico que se inicia a partir da perda da integridade da pele, gerando uma solução de continuidade que atinge as camadas subjacentes em diversos graus e depende de uma série de reações químicas (SCOTT, 2011). Vários fatores influenciam a cicatrização após lesão traumática ou cirúrgica. Feridas abaixo do jarrete ou joelho nos eqüinos são um problema, mesmo em animais sadios. Contudo esta dificuldade não ocorre na parte superior do corpo, o que pode ser explicado devido ao baixo suprimento sanguíneo,

baixa oxigenação, temperaturas mais baixas e um desequilíbrio de fatores de crescimento (DYSON, 1997). É essencial na reparação tecidual uma fonte rica em fatores de crescimento. As plaquetas atuam na hemostase, cicatrização de feridas, reepitelização, liberadora de diversos fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, promotores de crescimento e proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporciona um aumento na síntese de colágeno, sendo o PRP uma fonte natural e segura, pois é plasma do próprio animal (DYSON, 1997). Esse trabalho teve como objetivo a avaliação de eqüinos induzidos com uma solução de continuidade, ferida, na face dorsal da região metacarpiana dos membros torácicos, onde foram utilizados 6 animais da espécie eqüina, SRD, tendo como tratamento o uso de plasma rico em plaqueta (PRP) centrifugado e solução fisiológica. Os animais foram avaliados por parâmetros clínicos, morfométricos, avaliações histopatológicas e imunoistoquímicas durante 30 dias .

Palavras-chave: Equino; Ferida; Plasma Rico em Plaquetas; terapia.

ABSTRACT

The healing of the skin is the purpose of study and research, due to its clinical, scientific and economic interest, mainly due to the high frequency of wounds caused by injuries in horses. The wound healing is a physiological phenomenon which starts from the loss of skin integrity, generating a continuous flow that reaches the underlying layers to different degrees and depends on a series of chemical reactions (Bertone, 1989). Several factors influence healing after traumatic or surgical injury. Wounds below the knee or hock in horses are a problem, even in healthy animals. However, this difficulty does not occur in the upper part of the body, this can be explained by low blood supply low oxygenation, lower temperatures and an imbalance of growth (DYSON, 1997) factors. It is essential in tissue repair a rich source of growth factors. Platelets act in hemostasis, wound healing, re-epithelialization, releasing several growth factors that stimulate angiogenesis, growth promoters and proliferation of fibroblasts which in turn provides an increase in collagen synthesis, the PRP being a natural source and secure because it is the animal's own plasma (DYSON, 1997). This study aims to evaluate horses induced with a solution of continuity, wound on the dorsal surface of the metacarpal region of the forelimb, where 6 animals of the equine species, SRD were used, with treatment as

the use of platelet rich plasma (PRP) saline and centrifuged. The animals will be evaluated by clinical, morphometric, histopathological and immunohistochemical reviews for 30 days.

Keywords: Equine; Wound, Platelet Rich Plasm; therapy.

INTRODUÇÃO

Feridas resultantes de traumatismos são causas comuns de substanciais perdas econômicas em medicina veterinária eqüina (SCOTT, 2011). O reparo pode ocorrer de duas formas, pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização, com o restabelecimento da hemostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO, 2005).

Danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam de imediato uma série de eventos, que se traduzem como rubor, tumor, calor e dor. Estes sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química feita por compostos celulares rompidos, fragmentos teciduais inertes (colágeno, fibronectinas, elastinas) e proteínas séricas que extravasam pelos vasos e por ação de mediadores inflamatórios pré formados, liberados por plaquetas, mastócitos e neossintetizados (eicosanóides e PAF) (CONTRAN, 2001 apud BALBINO, 2005; KUMAR et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2012).

É essencial na reparação tecidual uma fonte rica em fatores de crescimento. As plaquetas atuam na hemostasia, cicatrização de feridas, epitelização e liberação de diversos fatores de crescimento estimulando a angiogênese e proliferação de fibroblastos que por sua vez proporciona um aumento na síntese de colágeno. Assim o emprego de plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte natural e segura de fatores de cerscimento para tratamento de feridas, pois é plasma do próprio animal (DYSON, 1997). Acelerando a diferenciação epitelial, crescimento e remodelamento do tecido em questão, além de aumentar os mediadores e fatores de crescimento no local lesado, pode ser de grande importância, gerando um potencial sinérgico no tratamento de feridas em equinos (DYSON, 1997).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o benefício do tratamento de PRP em feridas metacarpianas de equinos, por meio de acompanhamentos macroscópicos, morfométricos, histológicos e imunoistoquímicos .

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados cinco animais da espécie eqüina, sem raça definida, clinicamente saudáveis de ambos os sexos, e examinados clinicamente observando sinais de desconforto e que foram submetidos a aprovação pelo Comitê de Ética. Os animais foram tranquilizados por via intravenosa (IV) com administração de acepromazina 1% (0,03 – 0,07 mg/Kg) e xilazina 10% (0,5 – 1,1 mg/Kg) e no local foi administrado através da via subcutânea anestésico local Cloridrato de Lidocaína 0,2% (1 – 7 mg/Kg), o local cirúrgico foi preparado através de tricotomia do local, lavagem com clorexidine e a assepsia com álcool iodado e/ou clorexidine alcoólico, uma forma retangular(6X4 centímetros) de material descartável (plástico) foi estabelecido como molde para as realizações das feridas, padronizando-as de largura, comprimento e espessura semelhantes objetivando o equivalente a uma ferida de 6 X 4 X 1 cm^2 , na face dorsal dos membros torácicos direito e esquerdo (n= 12), sendo 2 feridas por animal. As lesões dos membros foram aleatoriamente sorteadas entre grupos tratados com PRP e o grupos controle, sem tratamento com PRP.

Os animais foram mantidos na Fazenda de Rubião Junior da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Antes do experimento, os equinos foram pesados, vermifugados com Ivermectina na dose de 200μg/Kg via oral, e confinados em baias individuais, recebendo água, alimento balanceado e feno de “coast-cross”.

Foram utilizados 6 animais, divididos em dois grupos, G0 (grupo tratado com PRP centrifugado), G1 (grupo controle). Para induzir a lesão, os animais foram submetidos a corte e antissepsia com clorexidine 0.5%, seguido de sedação com xylazine 10% (0.5 – 0.7 mg/Kg) e acepromazina 1% (0.03 – 0.05 mg/Kg) e anestésico local, no volume de 5-7 mL de Cloridrato de Lidocaína 2% . Durante o procedimento cirúrgico, a incisão foi realizada na pele com lâmina de bisturi (número 24), seguindo-se a dissecção do tecido subcutâneo e conseguinte seguido de remoção do fragmento tissular. A ferida foi limitada à pele e subcutâneo.Após a incisão foi realizado a aplicação de 8 – 10mL de PRP na região subcutânea, próximo aos bordos da lesão. No décimo quinto dia aplicou-se a segunda dose de 8-10 mL de PRP nos bordos das feridas.

Após a cirurgia, foi realizado bandagens em todos os membros como forma de tamponamento com gazes e compressas fixadas com bandagens não elástica e fita

adesivas em suas extremidades, sendo retirada 48 horas pós cirurgia. Em cada animal foi administrado 5.000UI de soro antitetânico e 20.000UI/Kg de antibiótico penicilina G. As feridas foram limpas diariamente com solução fisiológica e gaze. Os animais foram mantidos em baias durante 15 dias e após soltos em piquetes. A cicatrização foi monitorada, observando-se a força de contração, crescimento epitelial, presença de secreção e crostas, presença de edema, dor e aumento de temperatura .

Para produzir o PRP, diversos protocolos foram testados com o objetivo de concentrar o maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma (MARX, 2004; VENDRAMIN et al, 2006; CARMONA, 2006; MAIA, 2008; VENDRAMIN et al, 2009). A ativação do PRP foi obtido com a adição de Cloreto de Cálcio 10%.

Foram coletados 40 ml de sangue através da punção venosa jugular por vacuteiner 20 G diretamente ao tubo de ensaio, acondicionados e armazenados para repouso em uma membros foram aleatoriamente sorteadas entre grupos tratados com PRP e o grupo controle sem tratamento com PRP.caixa térmica (isopor) durante 30 minutos. Esse volume de 40mL de sangue, produz o equivalente a 25 – 30 mL de plasma, sendo este constituído de aproximadamente 75% de plasma pobre em plaqueta(PPP) e 25% de plasma rico em plaqueta(PRP). O PPP também é resultado da dupla centrifugação, localizado na parte superior do tubo, quando descartado, resta apenas o plasma rico em plaqueta e a região de *buffy coat*, que contém células inflamatórias e plaquetas.

O processamento foi realizado através da dupla centrifugação, com velocidades constantes (1º - 300G/5’ e 2º - 700G/15’), evitando-se freadas bruscas, e mantendo-se as amostras climatizadas em temperatura ambiente. As plaquetas da espécie equina são muito sensíveis a diversos fatores externos, incidência luminosa ou temperaturas extremas. A manipulação deve ser cuidadosa, por apresentarem uma característica de degranulação, ao esbarrarem nas paredes dos tubos ou entre si.

TABELA 1. Valores Hematológicos obtidos no hemograma dos animais mostrando o valor basal plaquetário e a contagem plaquetária resultando na concentração de plaquetas de 4 – 5 vezes comparado ao valor basal.

ANIMAL	PLAQUETAS/ μ L	PRP	LEUCÓCITOS	HEMÁCIAS/μ L
ANIMAL 1	221.000	726.800	10.200	6.980.000
ANIMAL 2	169.000	697.600	11.600	8.100.000
ANIMAL 3	190.000	841.250	7.600	6.730.000
ANIMAL 4	139.000	625.800	9.900	7.970.000
ANIMAL 5	185.000	730.300	8.900	6.680.000
MÉDIA	180.800	724.350	9.640	7.292.000

Os animais foram tratados após a lesão de pele, com infusão de PRP em pontos espalhados pela lesão, próximos aos bordos da ferida. O membro não selecionado foi denominado de grupo controle, e recebeu solução fisiológica NaCl 0,9%, seguindo os mesmos tratamentos do membro tratado com PRP. As biópsias das lesões foram realizadas no dia 30, após o procedimento cirúrgico, um fragmento de 1,0 a 1,5 cm foi removido a partir do bordo da ferida, onde continha a zona de transição de epitelização e granulação ou cicatricial. A aplicação de PRP na ferida foi realizada no dia 0 e, a segunda aplicação foi realizada no dia 15 pós-lesão. Após a administração do plasma rico em plaqueta, os animais foram acompanhados durante 30 dias.

Durante o período completo de observações (30 dias), avaliou-se o aspecto físico da ferida, como a presença de exsudações, o grau de epitelização, formação de granulação, presença de edema, aumenta de temperatura e volume, a sensibilidade dolorosa, o crescimento epitelial e suas características físicas e morfométricas, através de uma régua em centrímetros. Nas semanas seguintes foi mantida a avaliação morfométrica até completa cicatrização.

A avaliação histopatológica e imunoistoquímica foi realizado através de programa de software Image J que avalia as marcações por pixels/área coradas pelos anticorpos marcadores (VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular/IGF – Fator de Crescimento derivado da Insulina/TGFβ – Fator de Crescimento Transformante e PDGF – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas), e a estatística pelos testes: Teste T Pareado e Regressão Linear.

RESULTADOS

A avaliação clínica, que foi realizada diariamente durante 4 semanas, verificando o processo cicatricial e suas fases, demonstrou que na primeira semana pós lesão o aumento de volume, sensibilidade dolorosa a palpação foram presentes desde a indução da lesão até a segunda semana, variando quanto a intensidade entre os animais. Não se observou a presença de claudicação entre os animais, tanto nos membros tratados quanto nos membros controle. A melhora de cada animal era evidenciada gradativamente, sendo a diminuição de temperatura próximo à lesão, o primeiro sinal a desaparecer ao redor de 15 dias.

O aumento de volume estava presente em três tempos, no início (dia 3 pós lesão), pós reaplicação de PRP (segunda aplicação – dia 15) e pós biópsia (dia 30), alguns animais apresentaram exacerbação de sinais exsudativos do tipo seroso, alguns dias após a lesão (dia 2) tanto no membro tratado quanto no controle. Sendo possível que o animal 1 tenha apresentado uma contaminação bacteriana que foi controlada apenas com a limpeza diária, condizendo com os resultados morfométricos e imunoistoquímicos, observados no quadro 2.

Nas primeiras semanas, os membros controle e tratado não mostraram modificações significativas relacionada ao aspecto macroscópico da lesão. Foi observado a presença de edema local, aumento de temperatura e sensibilidade dolorosa, presença de exsudação serosa e/ou purulenta nas duas primeiras semanas. Após 15 dias houve uma redução no tamanho da lesão, devido à força de contração, e maior movimentação do animal auxiliando na reorganização das fibras de colágeno.

Não foram observadas alterações nas características histopatológicas, em ambos os grupos (tratado e controle) representadas por hipercelularidade, deposição de colágeno e presença de fibroblastos, havendo marcante presença de células adiposas e glandulares.

Não foi possível observar o alinhamento e organização das fibras colágenas devido ao curto período avaliado (30 dias), tendo os dois grupos avaliações semelhantes quanto a disposição e organização das células. Houve presença de neoformações, angiogênese que se apresentaram de forma irregular devido à sua formação ser

comprometida com a reestruturação da matriz extracelular, tendendo a uma fragilidade da parede vascular, visível à microscopia observando sua espessura através da migração celular evidente no local onde será formado o novo vaso. Outra observação foi a de que os neovasos sempre estavam acompanhados de uma vênula e uma arteríola, próxima uma da outra.

Os resultados histopatológicos e imunoistoquímicos revelam que a escolha do tratamento demonstrou eficácia através dos resultados obtidos da observação de maturação celular, deposição de fibroblastos e colágeno e expressão de fatores de crescimento no local.

Não foi observado nas lâminas de controle negativo características durante a fase aguda, como a presença de tecidos necróticos, edemas e hemorragias. Foi encontrado grande quantidade de células da matriz extraercelular que compõe o tecido conjuntivo propriamente dito, quantidade significativa de células de colágeno e fibroblastos espalhadas pelo tecido conjuntivo localizado na região dérmica acompanhados de neoformações vasculares e células adiposas e sudoríparas.Os dois grupos, tratado e controle apresentaram uma hipercelularidade caracterizando uma aceleração no processo de cicatrização.

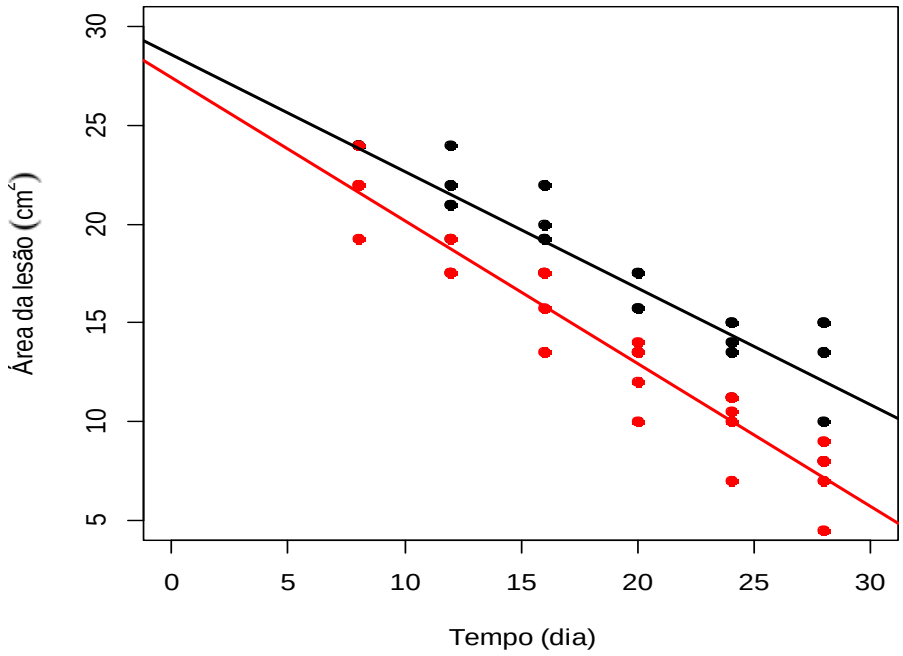
Figura 1 Visualização das Feridas Metacarpianas, observando a ferida tratada (figura esquerda) e a ferida controle (figura direita), apresentando sinais de inflamação no membro controle e no membro tratado uma aceleração do processo proliferativo.



QUADRO 1 Resultados diferenciais das áreas entre os animais do grupos tratados e controles, excluindo o animal número 1 da estatística.

	ÁREA CONTROLE (cm^2)	ÁREA TRATADO (cm^2)	DIFERENÇA (cm^2)
ANIMAL 1	10	9	1
ANIMAL 2	8	7	1
ANIMAL 3	15	8	7
ANIMAL 4	15	8	7
ANIMAL 5	13,5	4,5	9
Média	12,3	7,3	5
		MÉDIA	5
		DESVIO PADRÃO	3,74165739
		ERRO PADRÃO	1,67332005
		ESTATÍSTICA T	2,98807152
		PROB.SIGNIFICÂNCIA	**0,04041504**

Figura 2. Reta estimada para ambos os grupos tratado e controle, excluindo o animal 1 no grupo.



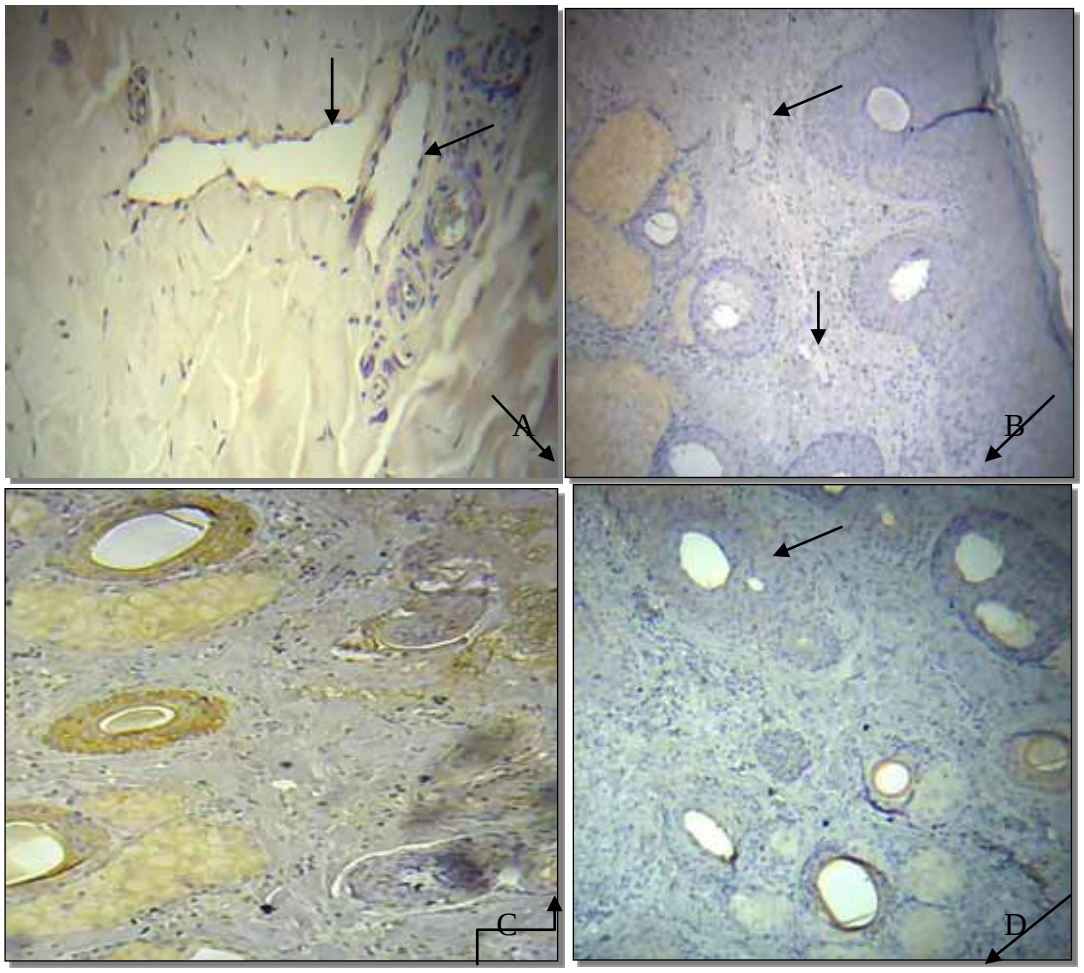


Figura 3. Visualização de arteríolas e vênulas em formação, marcados pelo VEGF em membros tratados e na figura A e B, a imunorreatividade para neovasos é pouco significativa em membros controle apresentados pelas setas pretas. da marcação de IGF em membros tratados, evidenciando com setas pretas as glândulas sebáceas e sudoríparas ao redor do folículo piloso C, e na figura D marcação do IGF é menos expressiva em membros controle. Na figura C, a visualização **Aumento: 20X**

DISCUSSÃO

O experimento buscou avaliar os efeitos da utilização do plasma rico em plaquetas na reparação tecidual de feridas induzidas na região metacarpiana de equinos por meio de avaliações macroscópicas, morfométricas, histológicas e imunoistoquímicas. A anatomo fisiologia do equino torna desfavorável a reparação rápida em membros e por muitas vezes de forma indequada e irregular, sendo observada por Cochrane (1997) que relata terem as feridas em membros de equinos tem

semelhança com úlceras em pernas de humanos e que resistem à cura, todo este confirmado por Theoret e colaboradores (2013) sugerindo que a cicatrização de uma ferida depende de vários fatores dentre eles a extensão, localização anatômica da lesão e infecção local.

A escolha do protocolo de Vendruscolo (2012) e colaboradores que foi modificado objetivando a obtenção de um maior número de plaquetas concentradas correlacionando ao valor basal de cada animal. No experimento a lesão foi avaliada durante 30 dias em ambos os grupos (controle e tratado), sendo necessário um tempo máximo de 60 dias para completa cicatrização. Todos os animais apresentaram cicatrização.

Após a indução cirúrgica das feridas, seguido de dois dias, não evidenciou qualquer característica marcante ou ressalva entre as duas feridas realizadas, sendo uma tratada com PRP, a primeira semana foi possível caracterizar por um processo intenso de inflamação, evidenciando os sinais clássicos de dor, rubor, calor, tumor, sem a perda da função, apenas alguns animais apresentaram claudicação de grau leve.

Após, e durante a primeira quinzena houve uma súbita diferenciação entre as feridas, sendo a tratada, caracterizada por apresentar organização celular, diminuição nos sinais de inflamação como exsudação, edema e dor e apresentava mais reavivada com granulação ativa. Durante a terceira semana os animais receberam uma segunda aplicação de PRP, mas não ficaram contidos em baias como estavam sendo alojados, foram soltos em piquetes. Nos primeiros dias seguidos da aplicação, as feridas se mostraram levemente inflamadas, entretanto observou que com a fisioterapia natural, seguida de trotes e galopes no local que se encontravam, propiciou um auxílio na retração das feridas e acelerou o processo de diminuição do tamanho da ferida, além de diminuir a contaminação secundária, já que as feridas permaneciam abertas durante todo o processo de avaliação, sugere-se que a exposição ao sol e ao exercício contínuo e diário tenha contribuído consideravelmente para o crescimento epitelial e formação de um novo tecido no local.

Durante a quarta semana o grupo tratado com PRP destacou-se pela diminuição do tamanho da ferida, apresentando resultados diferenciados de acordo com cada animal, mas em geral expressivos quando correlacionados ao grupo controle, que não

foi tratado com PRP, alcançando até 80% de diminuição comparado a ferida original. Contudo não foi possível avaliar o fechamento total das feridas, pois o experimento tinha como objetivo apenas a avaliação durante 30 dias corridos, mas foi possível identificar a importância de uma higienização adequada e diária nas feridas. Foram fundamentais na ausência de sujidades, miíases e outras adversidades na ferida, demonstrando o pouco uso de tratamentos, o trabalho foi enriquecido que apenas com "água e sabão", e cuidados simples, se obtém boas práticas para uma limpeza de qualidade.

Feridas tratadas com PRP foram maiores do que as feridas não tratadas, sugerindo que a terapia com PRP tem efeitos melhores na fase inicial, estas alterações não foram observadas no experimento, podendo observar macroscopicamente a redução significativa das feridas do grupo tratado na figura 1 , confirmados também através do quadro 1 que demonstra as medições por área lesada de cada animal individualmente.

Segundo Maciel (2012), o processo de cicatrização de feridas tratadas com PRP apresenta microscopicamente melhor organização de fibras colágenas quando comparadas com feridas não tratadas com PRP. Entretanto não observamos diferenças na organização , densidade de fibras colágena e presença de fibroblastos em função do tempo de evolução.

Os animais foram soltos em piquetes após 15 dias e permaneceram até o final das avaliações (dia 30) , tornou sustentável a idéia, segundo algumas literaturas, que os movimentos (fisioterapia) geram uma força de contração auxiliando na reeorganização das fibras colágenas que a priori se depositam na camada dérmica de forma desorganizada e irregular, formando uma malha e podendo desenvolver uma região fibrotíca denominada cicatriz, não efetuando a reparação adequada das fibras de forma a sintetizar um tecido igual ou semelhante ao que foi retirado ou perdido, os animais do experimento pode-se observar que houve uma rápida reparação e a síntese e organização das fibras de colágeno aceleram uma formação de uma nova pele semelhante ao que foi extraído pela indução cirúrgica.

A forma simplificada e realista da utilização do PRP (plasma rico em plaqueta) injetável nos bordos de feridas comprovou macroscopicamente e estaticamente que há uma redução significativa no tamanho da ferida, sendo visualizado através do

acompanhamento clínico e morfométrico realizado durante todo o processo e estatisticamente pelo Teste T Pareado resultando em significância dos grupos tratados e pelo Teste de Regressão Linear que demonstrou diminuição da extensão da lesão, mensurada a cada 4 dias, evidenciando na figura 2 a estimativa entre os grupos tratado e controle.

De acordo com Maciel (2012), a dupla aplicação de PRP desfavorece o processo de cicatrização, já que ao aplicar novamente o produto resulta em uma nova estimulação inflamatória, reestimulando os fatores de crescimento. Nosso trabalho foi realizado com duas aplicações onde também observamos após a segunda aplicação uma irritabilidade e o aparecimento de alguns sinais inflamatórios que já haviam desaparecido no tecido. Entretanto após a segunda aplicação de PRP notamos uma aceleração do processo cicatrical nos últimos dias, confirmados em alguns animais que apresentaram uma redução significativa na extensão da ferida, alcançando uma diferença significativa na redução da lesão de até 9 cm^2 , onde a média foi de 3 cm^2 .

CONCLUSÃO

A analíse dos resultados macroscópicos e morfométricos evidenciou que a utilização de plasma rico em plaquetas resultou na efetividade do tratamento de feridas metacarpianas de equinos, expressados através dos resultados de retração da área de lesão), aceleração do processo de cicatrização e diminuição dos sinais inflamatórios durante o período de avaliação (30 dias).

As avaliações histopatológicas e imunoistoquímicas demonstraram que os marcadores de escolha (IGF, PDGF, VEGF e TGFβ), foram importantes para visualizar o processo cicatricial.

REFERÊNCIAS

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURL, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **RBCF - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol 41, n. 1, Jan/ Mar, 2005.

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. **Arch. Med. Vet**., v.41, 2009. p.175-179.

COCHRANE, C.A.; FREEMAN, K.L.; KNOTTENBELT, D.C. Effect of growth factors on the caracteristics of cells associated with equine wound healing and sarcoid formation. **Wound Repair and Regeneration**, 4, 58-65, 1997.

CONTRAN RS, KUMAR V, COLLINST , ROBBINS: Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001: 44-100.

CAVALCANTE, L.C.; MOREIRA, M.C.; LIMA MOTA, O.M.; TURATTI, E.; VIANA, F.A.C.; PEREIRA, S.L.S. Efeito da Pedra Umes no Processo de Cicatrização Tecidual. Estudo Histológico em Dorso de Ratos. **Braz. J. Periodontal**, v.22, n.1, 2012.

DYSON, S.J. Diagnosis and Prognosis of suspensory desmitis. In: Dubai Equine International Symposium: The Equine Athlete: Tendon, Ligament and soft Tissue Injuries, 1996.Dubai. Proceedings…Dubai: Neyenesch Printers, p. 207 – 225, 1996.
DYSON, S.J. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). **Equine Veterinary Journal**, vol.36, n. 5, p. 415-419, 2004.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. 2005. Robbins e Cotran – Patologia: bases patologicas das doencas. 7a ed. **Elsevier**, Rio de Janeiro.

MACIEL,F.B.; DeROSSI, R.; MODOLO, T.J.C.; PAGLIOSA, R.C.; LEAL, C.R.J.; DELBEN, A.A.S.T. Scanning electron microscopy and microbiological evalution of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel tratament. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. **ELSIEVER**, v. 38, p. 1058 – 1065, 2012.

MAIA L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg** 2004;62(4):489–96.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H. Environmental Skin diseases. In: SCOTT,D.N.; MILLER, W.H., editors. Equine Dermatology.2nd ed., St. Louis; Saunders, pg.600-27, 2011.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; FRANCO, T.R. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Brazilian Journal Plastic Surgery.** 2009; 24(2): 212-8.

VENDRAMIN FS, FRANCO D, NOGUEIRA CM, PEREIRA MS, FRANCO TR. Platelet-rich plasma and growth factors: processing technique and application in plastic surgery. **Rev Col Bras Cir**. 2006;33:24-8.

VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A.M.; MORAES, L.F.; MAIA, L. QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesq. Vet. Bras**., 33(2): 106 – 110, 2012.

ANEXOS

Animal 1 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local, com presença de edema e sensibilidade dolorosa, e moderada exsudação serosa. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios com presença de pouca exsudação serosa. A cada semana houve crescimento epitelial de aproximadamente 0.1- 0.15 mm, 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete e nas semanas seguintes observou retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 4 x 2 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 2 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação seropurulenta. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 5 x 2 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 3 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação serosa. Na segunda semana permaneceu o edema local e exsudação serosa e não houve diminuição dos sintomas inflamatórios. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração

da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 4 x 2 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 4 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação purulenta. Na segunda semana não houve diminuição dos sintomas inflamatórios e permaneceu a exsudação purulenta e presença moderada de crostas. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 5 x 3 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 5 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação serosa. Na segunda semana não houve diminuição dos sintomas inflamatórios e permaneceu a exsudação serosa e presença moderada de crostas. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 5 x 3 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 6 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação serosa. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-

lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 4,5 x 3 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

5.2.1.2 GRUPO TRATADO

Animal 1 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação serosa. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios e pouca presença de crostas. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 5 x 3 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 2 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação serosa. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios e pouca presença de crostas. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 4,5 x 2 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 3 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação serosa. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios e presença de crostas e edema local. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 3,5 x 2 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 4 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e moderada exsudação seropurulenta. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios e pouca presença de crostas e exsudação serosa. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 4 x 2 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 5 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação seropurulenta. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios e pouca presença de crostas e exsudação serosa. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração

da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 4 x 2 x 1 cm^2(centímetro quadrado).

Animal 6 : Na primeira semana houve aumento de temperatura local com presença de edema, sensibilidade dolorosa e pouca exsudação serosa. Na segunda semana houve diminuição dos sintomas inflamatórios e pouca presença de crostas e exsudação serosa. Nas semanas seguintes observou crescimento epitelial de aproximadamente 0.1 – 0.15 mm, e 15 dias pós-lesão o animal foi solto no piquete, nas semanas seguintes foi observado retração dos bordos devido a força de contração da ferida, obtendo uma redução dos bordos e do tamanho inicial da lesão após 30 dias, apresentando um valor de 3 x 1,5 x 1 cm^2(centímetro quadrado).