

MARCELO LUIZ QUARTEIRO

**O EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
REPARO DE LESÕES MUSCULARES EM RATOS**

CAMPO GRANDE
2013

MARCELO LUIZ QUARTEIRO

**O EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
REPARO DE LESÕES MUSCULARES EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção de título de Mestre.

Áreas de Concentração: Tecnologia e Saúde
Linha de Pesquisa: Modelos Animais de Doença

Orientador Prof. Dr. João Ricardo Filgueiras Tognini

CAMPO GRANDE
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELO LUIZ QUARTEIRO

O EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO REPARO DE LESÕES MUSCULARES EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção de título de Mestre.

Resultado _____.

Campo Grande (MS), 11 de Março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ricardo FilgueirasTognini

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Doroty Mesquita Dourado

Instituição: universidade Anhangüera Uniderp

Prof. Dr. Fernando Luiz de Arruda

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

A todos que, como pais, ensinam.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela luz, força e perseverança.

À minha esposa Caroline, pelo apoio e compreensão.

Ao meu Orientador, Professor Doutor João Ricardo FilgueirasTognini, sempre presente, objetivo, extremamente competente.

À todos os colaboradores do Laboratório de Toxicologia e Plantas Medicinais da Universidade Anhanguera – Uniderp, em nome da Professora Doutora Doroty M. Dourado, muito prestativos, extremamente competentes e eficientes, foram fundamentais na análise e interpretação das lâminas histológicas.

Aos colaboradores do Biotério da UFMS, em especial à Professora Doutora landara Schettert Silva.

Aos Funcionários do Laboratório de Bioquímica do Núcleo do Hospital Universitário, por terem possibilitado a realização das análises e o preparo do PRP.

Ao Dr. Maçanori Odashiro, professor aposentado da UFMS e médico patologista do Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia - LAC, pela imensa colaboração na confecção das lâminas histológicas.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação, pelos legados técnicos, éticos e morais.

Ao Professor Doutor Ricardo Dutra Aydos, Coordenador da Pós-graduação, pela sua competência e serenidade na condução do programa.

A todos os que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho, sem os quais seria impossível alcançar esta meta.

RESUMO

Quarteiro ML. O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. Campo Grande; 2013. [Dissertação – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste estudo experimental foi avaliar os efeitos histológicos do plasma rico em plaquetas (PRP) no reparo do tecido muscular de ratos. Para tanto, o PRP foi obtido por dupla centrifugação do sangue de cinco animais. Em outros 30 ratos, foi produzido um único trauma no terço médio do ventre do músculo gastrocnêmio de cada membro traseiro. As lesões assim produzidas não receberam tratamento em seis ratos (12 patas). Nos demais 24 ratos, injeções intralesionais de soro fisiológico a 0,9% foram aplicadas nas patas esquerdas, e de PRP, nas patas direitas. Amostras do tecido muscular lesionado tratado e não tratado foram avaliadas histologicamente sete e 21 dias após os procedimentos. A quantidade de colágeno nas lesões tratadas com PRP foi significativamente menor do que a das demais lesões na avaliação realizada sete dias após o procedimento, mas se equiparou à dos demais grupos na avaliação realizada no 21º dia. Houve aumento significativo ($p = 0,00021$) na quantidade de colágeno do sétimo para o 21º dia após o procedimento nas lesões tratadas com PRP, o que não ocorreu nas lesões tratadas de outra forma. O processo inflamatório se mostrou mais intenso nas lesões tratadas com PRP em comparação às lesões dos outros grupos de tratamento na avaliação realizada sete dias após o procedimento; todavia, os aspectos morfológicos dessas lesões se mostraram similares ao das lesões não tratadas 21 dias após o procedimento.

Palavras-chave: Lesões musculares, Plasma rico em plaquetas, Reparo muscular.

ABSTRACT

Quarteiro ML. The effect of platelet-rich plasma on muscle lesions produced in rats. Campo Grande; 2013.[Monograph – Medicine School of the Federal University of MatoGrosso do Sul].

The histologic effects of platelet-rich plasma (PRP) on the tissue repair of muscle lesions produced in rats were evaluated in this study. PRP was obtained by double centrifugation from the blood of five animals. One unique lesion was produced in the gastrocnemius muscle of each posterior limb of other 30 rats. Six rats (12 limbs) received no treatment. In the other 24 rats, saline solution 0,9% or PRP was injected into the lesions produced in the left and right limbs, respectively. Samples of muscle tissue from treated and not treated lesions were histologically analyzed seven and 21 days after the procedures. The amount of collagen fibers in the lesions treated with PRP was significantly lower than that observed in the other groups on the 7th day, but became similar on the 21th day. Collagen fibers increased significantly ($p = 0,00021$) from the 7th to the 21th day in the samples from lesions treated with PRP, but not in the other groups. Inflammatory process seemed more intense in the lesions treated with PRP compared with those treated with saline solution or not treated on the 7th day; however, histologic aspects of samples from PRP-treated lesions were similar to those from not treated lesion on the 21th day.

Keywords: Muscle lesions, Platelet-rich plasma, Muscle repair.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EGF	Fator de crescimento epitelial
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos
HE	Hematoxilina-Eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IGF1	Fator de crescimento do tipo insulina 1
L-PRF	Fibrina rica em plaquetas pura
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRFM	Matriz de fibrina rica em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RPM	Rotações por minuto
SF	Soro fisiológico
TGFb	Fator transformador de crescimento beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama representativo da classificação das lesões musculares	23
Figura 2	Imagem fotográfica das caixas-padrão para cinco animais, feitas em polipropileno e com tampa metálica galvanizada, mantidas em ambiente devidamente climatizado.....	32
Figura 3	Imagem fotográfica do aparelho proposto por Sene (1985) para realização de lesão muscular em animais.....	33
Figura 4	Imagem fotográfica do posicionamento da carga liberada sobre cada membro dos animais.....	34
Figura 5	Imagens fotográficas da administração de SF e de PRP na região central posterior da pata esquerda e direita, respectivamente, dos animais.....	35
Figura 6	Imagem fotográfica da punção cardíaca realizada para obtenção de quatro amostras contendo 8 ml de sangue dos cinco ratos que compuseram o Grupo 1, para preparo do PRP	36
Figura 7	(A) Preparado apresentando coluna de líquido com duas frações predominantes: o plasma sobrenadante e concentrado de hemácias ao fundo, separadas por creme leucocitário preparado. (B) Após eliminação da porção sobrenadante, preparo contendo apenas aproximadamente 1 ml do centrifugado de maior peso (PRP)	37
Figura 8	Imagem fotográfica de amostra do gastrocnêmio íntegro fixada em superfície sólida e acondicionada em formaldeído a 10% para análise histológica.....	38
Figura 9	Microscópio óptico acoplado a computador em uso do sistema de processamento e análise de imagens <i>Image-Lab</i> TM	39
Figura 10	Representação gráfica das médias e desvios-padrão da quantidade de fibras colágenas sete e 21 dias após as lesões provocadas nos ratos do grupo-controle (A), tratados com PRP (B) e com SF (C).....	42

Figura 11	Representação gráfica das médias e desvios-padrão da quantidade de fibras colágenas sete e 21 dias após as lesões provocadas nos ratos dos três diferentes grupos de estudo	42
Figura 12	Fotomicrografia de amostras do grupo-controle aos sete dias. Observam-se macrófagos (setas), fibra muscular em corte transversal (fm), mioblastos (mi) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x	44
Figura 13	Fotomicrografia de ratos tratados com PRP aos sete dias. Observa-se processo inflamatório por mononucleares (setas grossas), fibra muscular em corte transversal (fm), fibra muscular em corte longitudinal (fml), miotubos (setas finas), vasos sanguíneos (vs), células adiposas (ca) e tecido conjuntivo (tc). HE/200x	45
Figura 14	Fotomicrografia de ratos tratados com SF aos sete dias. Observa-se fibra muscular em corte longitudinal (fml) e transversal (fm), miotubos (setas finas), macrófagos (setas grossas) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x	46
Figura 15	Fotomicrografia de ratos-controle aos 21 dias. Observa-se fibra muscular em corte transversal (fm), núcleos das fibras musculares (setas) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x	47
Figura 16	Fotomicrografia de ratos tratados com PRP aos 21 dias. Observam-se núcleos (n), fibra muscular em corte transversal (fm), fibra muscular em corte longitudinal (fml) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x	48
Figura 17	Fotomicrografia de ratos tratados com SF aos 21 dias. Observa-se processo inflamatório por mononucleares (setas finas), fibra muscular em corte transversal (fm) e em corte longitudinal (fml), vasos sanguíneos (vs), tecido conjuntivo (tc) e miotubos (seta grossa). HE/200x	49
Figura 18	Representação gráfica das concentrações de plaquetas no sangue natural e em PRP em quatro amostras utilizadas para a produção de PRP	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais aplicações clínicas do PRP no campo da Ortopedia	22
Quadro 2	Síntese dos achados morfológicos nos dois momentos de avaliação do estudo	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantificação de plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$) observada nas quatro amostras de sangue extraídas de cinco ratos para o preparo PRP	36
Tabela 2	Médias (e desvios-padrão) da quantificação de fibras colágenas observadas nas patas dos ratos-controle e dos ratos que receberam PRP e SF, sete e 21 dias após a lesão muscular. Campo Grande, MS, 2013	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Plasma rico em plaquetas (PRP)	17
2.2 Lesões musculares	22
2.3 O uso do PRP em lesões musculares	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODO	31
4.1 Procedimentos éticos	31
4.2 Amostra	31
4.3 Divisão dos grupos	32
4.4 Protocolo para produção da lesão experimental	32
4.5 Preparo e aplicação do PRP	35
4.6 Eutanásia	37
4.7 Formas e períodos de avaliação	38
4.8 Análise histológica	39
4.9 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Quantificação de fibras colágenas	41
5.2 Achados morfológicos	42
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O sistema muscular é a maior estrutura que compõe o sistema orgânico do ser humano. O tecido muscular é importante na homeostasia bioenergética, tanto em repouso quanto em exercício. Essa adaptabilidade resulta da capacidade de funcionar com eficiência sob ampla gama de condições, e é de grande importância na sobrevivência das espécies (SENE, 2005).

A combinação de estruturas musculares, que consistem em células musculares, rede de nervos bem organizada, vasos sanguíneos, tecido conectivo e sua matriz extracelular, é organizada e possibilita a locomoção e a estabilização articular (GARRET; BEST, 1994; HUARD *et al.*, 2002).

Segundo Kettunen *et al.* (2001), o aumento da demanda por exercícios competitivos provocou o crescimento no risco de lesões, o que gera preocupações tanto para os praticantes de atividades físicas quanto para treinadores e atletas de todas as esferas de rendimento, pois interrompem o processo evolutivo de adaptações sistêmicas impostas pelo treinamento.

As lesões desportivas, possivelmente, são resultado de exercícios realizados de maneira extenuante e, ainda, inadvertida ou inapropriada. A prevalência e a incidência desses episódios são subestimadas devido à ausência de notificação em todo o universo esportivo. (BENNEL; CROSSLEY, 1996; KETTUNEN *et al.*, 2001).

A lesão muscular é um dos traumas mais comuns ocorridos na prática esportiva, com taxa de incidência entre 10% a 55% de todas as lesões (JÄRVINEN *et al.*, 2005). Rizzi *et al.* (2006) relataram que 30% das lesões diagnosticadas pelos médicos possuem relações com o sistema muscular.

Lesões nos músculos isquiotibiais têm sido relatadas na literatura com incidência de 12% em jogadores de futebol (HAWKINS; METHENY, 2001; ROLLS; GEORGE, 2004). Pastre *et al.* (2005) relataram incidência de lesões musculares de 50,9% em atletas velocistas. Grote *et al.* (2008) observaram que 42% de sua amostra de atletas nadadores de peito ficaram, ao longo do ano anterior à realização do estudo, períodos sem treinar ou competir devido a lesões musculares.

Clebis e Natali (2001) definiram lesão muscular como qualquer alteração que promova uma disfunção do aparelho locomotor decorrente da prática esportiva, seja ela morfológica ou histoquímica. Desse modo, as lesões musculares podem ser causadas por dois mecanismos: os traumas diretos, como contusões e lacerações, e por traumas indiretos, como isquemia, denervação e estiramentos (HUARD *et al.*, 2002; JÄRVINEN *et al.*, 2005).

O incremento de indivíduos na prática de diversas modalidades de atividade física, em nível preventivo, curativo ou esportivo, gera aumento no aparecimento das lesões esportivas musculoesqueléticas (HOOTMAN *et al.*, 2002). Dessa forma, as lesões musculares tornaram-se objeto de estudos com a finalidade de buscar recuperação rápida, com qualidade e eficácia (SENE, 2005).

Entretanto, ainda permanecem alguns questionamentos especialmente em relação aos efeitos e resultados de vários tratamentos comumente utilizados para estimular o processo de reparo do músculo. Dependendo da severidade e localização da lesão, diferentes manejos terapêuticos são utilizados, desde o tratamento conservador e medicamentoso ao cirúrgico (DE CARLI *et al.*, 2009).

Exceto para os casos de rupturas musculares completas, avulsões e miosite-sossificante, o tratamento-padrão utilizado para lesões musculares agudas é o repouso, proteção, gelo, compressão e elevação; além desses princípios, não existe consenso claro sobre o tratamento da lesão muscular aguda (CHAN *et al.*, 2005).

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um produto do sangue autólogo que vem sendo proposto desde 1990, por promover forte estímulo ao reparo tecidual (HAYNESWORTH *et al.*, 2002). É obtido da centrifugação do sangue periférico, e a concentração de plaquetas deve idealmente ser superior à 338% da concentração do sangue periférico (WHITMAN *et al.*, 1997; CAMARGO *et al.*, 2002; LEKOVIC *et al.*, 2002; MARX, 2004) .

O PRP possui proteínas como a fibrina, fibronectina e vitronectina, que promovem a osteocondução por meio de sua ação na adesão celular, além da própria ação dos fatores de crescimento TGF β e do PDGF na estimulação dos osteoclastos, melhorando a qualidade dos resultados obtidos nas enxertias ósseas (KNOX *et al.*, 1986).

O gel de PRP é obtido pela adição de trombina e ou gluconato de cálcio ao PRP. Essas substâncias ativam o sistema de coagulação, resultando na gelação do PRP, o que facilita sua aplicação em diversas cirurgias, além de ativar as plaquetas (EFEOGLU *et al.*, 2004; KEVY; JACOBSON, 2004).

O PRP possui propriedades curativas atribuídas a concentrações aumentadas de fatores autólogos de crescimento tecidual e proteínas em nível celular. A expectativa é de que esses fatores, quando introduzidos no local da lesão, aumentem o recrutamento, a proliferação e a diferenciação das células envolvidas na reparação tecidual, promovendo reparo acelerado e com melhor diferenciação tecidual (FOSTER *et al.*, 2009).

Atualmente estão sendo estudadas diversas utilizações clínicas do PRP, incluindo reparo de lesões condrais (SUN *et al.*, 2010) e tendíneas (SÁNCHEZ *et al.*, 2010; CERVELLI *et al.*, 2010); reparo de lesões e regeneração óssea (TORRES *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2010; GENTILE *et al.*, 2010); tratamento de fascíte plantar (PEERBOOMS *et al.*, 2010) e de úlceras crônicas em pé diabético (MARGOLIS *et al.*, 2001; VILLELA; SANTOS, 2010).

O reparo das tendinopatias crônicas do tendão de Aquiles com injeção intralesional de PRP tem mostrado resultados promissores na histologia e na morfologia do tecido neoformado (DE VOS *et al.*, 2010).

Em ensaios clínicos randomizados e controlados recentemente publicados (SÁNCHEZ *et al.*, 2012; VAQUERIZO *et al.*, 2013), ficou evidenciada a superioridade do Plasma Rico em Fatores de Crescimento em comparação com o ácido hialurônico (incluindo o ácido hialurônico estabilizado de origem não animal) no alívio da dor, na melhora articular e nas funções físicas de pacientes com osteoartrite de joelho.

Desde 2004, diversos estudos tanto experimentais quanto clínicos (WRIGHT-CARPENTER *et al.*, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2005; HAMMOND *et al.*, 2010; HAMID *et al.*, 2012; HARRIS *et al.*, 2012; GIGANTE *et al.*, 2012; BUBNOV *et al.*, 2013; WATERLAIN *et al.*, 2013) vêm revelando os efeitos da injeção intralesional de PRP em lesões musculares. De modo geral, os achados desses estudos reportam melhor regeneração muscular, aumento de neovascularização e redução de fibrose.

Levando-se em conta a frequência de lesões musculares e a necessidade de

opções terapêuticas, considerou-se a realização deste estudo experimental para a verificação dos efeitos da injeção intralesional de PRP em lesões musculares provocadas em modelo animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas obtido de sangue autólogo, desenvolvido com o intuito de otimizar o processo de cicatrização a partir das moléculas bioativas contidas em grânulos plaquetários. Por se constituir em produto autólogo, tem a vantagem de não desencadear reações imunogênicas ou transmitir doenças pela via sanguínea (ALSOUSOU *et al.*, 2009).

As bases para o desenvolvimento do PRP datam de 1970, quando Matras publicou estudo experimental em que descreveu o preparo de selante alogênico de fibrina, formado pela polimerização de fibrinogênio com trombina e cálcio, utilizado para a cicatrização cutânea de ratos. Duas décadas mais tarde, Gibble e Ness (1990) desenvolveram selante de fibrina autóloga e o apresentaram como material com propriedades adesivas e homeostáticas promissoras para a cicatrização de feridas cirúrgicas.

Ainda em 1990, já se propunha o uso de cicatrizantes derivados de plaquetas humanas autólogas para regular a cicatrização de úlceras cutâneas recalcitrantes a partir da promoção de formação de tecido de granulação em fase ainda precoce do processo de cicatrização (ALSOUSOU *et al.*, 2009). Alguns anos depois, as plaquetas foram de fato introduzidas na clínica cirúrgica como fonte rica de fatores bioativos em cirurgias bucomaxilofaciais (WHITMAN *et al.*, 1997).

O desenvolvimento do PRP, portanto, fundamentou-se nas características das plaquetas, definidas como pequenos fragmentos anucleados e discoides de citoplasma, que derivam de megacariócitos da medula óssea, que medem menos que 3 micrômetros de largura e entre 5 e 7 micrômetros de diâmetro. Várias proteínas, citocinas e fatores bioativos contidos nesses fragmentos citoplasmáticos estão sabidamente envolvidos com a regulação do processo de reparação tecidual e do processo de coagulação sanguínea (MARX, 2001).

As plaquetas possuem grânulos alfa que contêm diferentes fatores de crescimento que, por sua vez, são peptídeos sinalizadores responsáveis pela regulação do metabolismo celular, a partir de sua interação com um complexo organizado de receptores de superfícies celulares, a qual resulta em aumento da transição gênica e produção de proteínas que promovem proliferação e diferenciação celular, e em aumento da produção da matriz extracelular e angiogênese, o que otimiza o processo de regeneração tecidual (SIMMAN *et al.*, 2008; FOSTER *et al.*, 2009).

Já foram identificados pelo menos sete diferentes fatores de crescimento secretados ativamente pelas plaquetas e que atuam na fase inicial da cicatrização, a saber: três isômeros do fator de crescimento plaquetário (PDGF), denominados PDGFaa, PDGFbb e PDGFab; dois fatores de crescimento transformadores (TGF), denominados TGFb1 e TGFb2; o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); e o fator de crescimento epitelial (EGF) (VENDRAMIN *et al.*, 2006).

Os TGF ativam os fibroblastos para a formação de protocógeno, que resulta na deposição de colágeno e cicatrização da ferida. Os PDGF, associados ou não com os TGF, aumentam a vascularização tissular, promovem a proliferação de fibroblastos, aumentam a quantidade de colágeno, estimulam produção de tecido de granulação e melhoram a osteogênese (LIU *et al.*, 2002). O VEGF estimula a angiogênese, a mitogênese e a permeabilidade vascular, e o EGF induz o crescimento de tecido epitelial e promove também a angiogênese. Essas substâncias tornam a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de células de gordura (KNOX *et al.*, 1986).

De toda forma, acredita-se que ainda não haja uma definição exata de PRP, uma vez que produtos derivados do sangue apresentam tal número de variáveis que se torna impossível estabelecer um conceito unívoco e inequívoco para o PRP na prática clínica. Trata-se de produto geralmente referido como um derivado sanguíneo contendo altas concentrações de plaquetas em relação aos níveis plaquetários basais (KON *et al.*, 2011). Sugere-se que a concentração de plaquetas deva ser pelo menos, 200% maior do que a contagem de plaquetas no sangue periférico (MARX, 2001; DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2009), embora haja ampla variação nos estudos relatados, que chegam a mencionar o ideal de até oito vezes os níveis plaquetários basais (TSCHON *et al.*, 2011).

O número de plaquetas é, a princípio, condição ímpar para determinar o volume total de fatores de crescimento administrados à lesão para que de fato haja regulação do processo cicatricial. No entanto, há evidências de bons resultados clínicos mesmo com concentrações mais baixas de plaquetas (KON *et al.*, 2013). Também já foram estabelecidas correlações entre o número de plaquetas contido no PRP e o tipo de resultado observado (TORRICELLI *et al.*, 2011). Portanto, estudos mais amplos devem ser realizados para a compreensão da relação quantidade-qualidade de fatores de crescimento para a regulação do processo cicatricial.

Outras variáveis que dificultam o entendimento mais amplo sobre os resultados da aplicação clínica do PRP incluem as diferentes modalidades de armazenamento do produto, os métodos de ativação do PRP, os diferentes protocolos clínicos para a sua aplicação, a fase da lesão em tratamento e, especialmente, os métodos de preparo do PRP (COLE *et al.*, 2010).

Com relação ao preparo do PRP, que constitui a principal variável, inicialmente era processado em máquinas de plasmaferese, e utilizava-se trombina bovina e cloreto de cálcio para a ativação das plaquetas (WHITMAN *et al.*, 1997; MARX *et al.*, 1998). Com essa técnica, observou-se, em humanos, que a cicatrização de osso e tecidos moles foi potencializada pela aplicação do PRP em concentração de 1.000.000 de plaquetas/ μ L, o que corresponde a 338% a mais do que as plaquetas usualmente encontradas no sangue (WHITMAN *et al.*, 1997; MARX *et al.*, 1998; LEKOVIC *et al.*, 2002; CAMARGO *et al.*, 2002). Além das limitações tecnológicas desse método de separação celular, ainda requer grande quantidade de sangue (450 mL), o que restringe o seu uso a institutos de transfusão sanguínea e a ambientes hospitalares (WEIBRICH *et al.*, 2002b).

Considerando que a utilização de trombina bovina para a ativação das plaquetas traria risco de coagulopatias pela formação de anticorpos contra fatores de coagulação, Landesberger *et al.* (2000) propuseram a obtenção do PRP por meio de centrifugação realizada em duas etapas: inicialmente ocorre a separação das hemácias do plasma e posteriormente a separação do plasma rico em plaquetas e do plasma pobre em plaquetas. Assim, obtiveram concentração de plaquetas 229% maior do que os níveis basais. Ambas as centrifugações eram realizadas a 200g por dez minutos. Com o mesmo protocolo, Sonnleitner *et al.* (2000) também identificaram grande concentração de TGF- β 1 e de PDGF no PRP, enquanto a concentração desses

fatores no plasma se mostrou mínima.

Hanet *et al.* (2009) observaram que o PRP ativado por trombina atuou como inibidor na osteogênese e na condrogênese quando comparado ao PRP sem ativação.

Esse método de dupla centrifugação foi experimentalmente modificado por Efeoglu *et al.* (2004), com o intuito de aumentar as concentrações de plaquetas. Com sangue de coelhos, realizaram a primeira centrifugação a 300g por dez minutos, e a segunda a 5.000g por cinco minutos, e obtiveram quase o dobro de concentrações de plaquetas do que as obtidas na técnica anterior. Desde então, diversos protocolos aplicados a animais e a humanos vêm sendo propostos para a obtenção do PRP por meio de dupla centrifugação (LOZADA *et al.*, 2001; PACIFICI *et al.*, 2002; WEIBRICH *et al.*, 2002a; 2004; VAN DEN DOLDER *et al.*, 2006; MAZZUCCO *et al.*, 2008; MESSORA *et al.*, 2009).

Também já foi descrito o processo de centrifugação única de 55 ml de sangue adicionado a 5 ml de citrato a 3.200 RPM por 12 minutos (EPPLEY *et al.*, 2004) e de 18 ml a 27 ml de sangue venoso distribuído em tubos de 4,5 ml com citrato de sódio a 3,8% centrifugados a 460 g por oito minutos (ANITUA *et al.*, 2005), com o intuito de aumentar a concentração de plaquetas e, consequentemente, os níveis de fatores de crescimento.

O fato é que todos esses protocolos, simplificados pela necessidade de menor quantidade de sangue e pelo uso de centrífugas comuns, representam grandes avanços em relação às técnicas inicialmente propostas para obtenção do PRP, em virtude tanto da redução marcante dos custos de produção quanto da possibilidade de execução em ambiente ambulatorial (MESSORA *et al.*, 2009). Por outro lado, diferentes protocolos aplicados a diferentes espécies e em diferentes leitos receptores do PRP dificultam tanto a avaliação quanto a comparação dos achados dos estudos publicados.

Nesse sentido, Dohan Ehrenfest *et al.* (2009) propuseram um sistema de classificação do PRP, com base no tipo de equipamento utilizado para a sua produção, o volume final obtido e a concentração de plaquetas, a presença de leucócitos e a formação de malha de fibrina. Essa classificação aponta para quatro tipos de PRP, a saber:

- (1) o PRP puro (P-PRP): produtos obtidos por aférese;

- (2) o PRP rico em leucócitos: produtos obtidos por centrifugação dupla;
- (3) a fibrina rica em plaquetas pura (L-PRF);
- (4) e a fibrina rica em plaquetas rica em leucócitos.

Embora a aplicação desses protocolos deva ser realizada com cautela, levando em consideração uma série de detalhes (MESSORA *et al.*, 2009), o fato é que a aplicação do PRP vem sendo realizada, com resultados promissores, ainda que em estudos experimentais, casos anedóticos ou em pequenas amostras humanas, em diferentes campos da Medicina.

A princípio, seu uso estava focado na otimização das cicatrizações ósseas ou da osteogênese ou para potencializar a cicatrização dos tecidos moles nas cirurgias bucomaxilofaciais (TAYAPONGSAK *et al.*, 1994; MARX *et al.*, 1998; MAN *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002). Logo foi ampliado para as cirurgias plásticas estéticas (BHANOT; ALEX, 2002; EPPLEY *et al.*, 2006), para as cirurgias oftalmológicas (MANDEL, 1992; GEHRING *et al.*, 1999), para as cirurgias ortopédicas (SÁNCHEZ *et al.*, 2003; CARREON *et al.*, 2005; EVERTS *et al.*, 2006; GARDNER *et al.*, 2007; GALASSO *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2011), e para a cirurgia geral (DELROSSI *et al.*, 1990; HIRAMATSU *et al.*, 2002; AGHALOO *et al.*, 2005; SERRAINO *et al.*, 2013).

No campo da Ortopedia, que é o interesse central deste estudo, o uso clínico do PRP pode ser agrupado, segundo Foster *et al.* (2009), em quatro categorias distintas, conforme apresentadas e fundamentadas no Quadro 1.

Dentre as categorias postuladas por Foster *et al.* (2009) o interesse do presente estudo recai sobre as lesões musculares, em especial as decorrentes de impacto, atualmente bastante frequentes na prática esportiva, tanto de forma amadora quanto profissional.

Quadro 1 – Principais aplicações clínicas do PRP no campo da Ortopedia.

Categorias / Diagnósticos / Referências

Tendinopatias crônicas

- Epicondilite lateral do cotovelo (EDWARDS; CALANDRUCCIO, 2003; MISHRA; PAVELKO, 2006; TAYLOR; HANNAFIN, 2012).
- Ruptura do tendão calcâneo (ALFREDSON; LORENTZON, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2007; SCHEPULL *et al.*, 2001; FERRERO *et al.*, 2012).
- Tendinopatia patelar (TAYLOR *et al.*, 2002; KAJIKAWA *et al.*, 2008; KAUX *et al.*, 2013).
- Fasceíte plantar (BARRET; ERREDGE, 2004).

Lesões ligamentares agudas (NIN *et al.*, 2009; FOSTER *et al.*, 2009).

Suporte intra-operatório

- Artroplastia total de joelho (BERGHOFF *et al.*, 2006; GARDNER *et al.*, 2007).
- Reconstrução do ligamento cruzado anterior (MURRAY *et al.*, 2007).
- Reparo do tendão calcâneo (SÁNCHEZ *et al.*, 2007).
- Reparo do manguito rotador (GAMRADT *et al.*, 2007; RANDELLI *et al.*, 2008).
- Reparo da cartilagem articular (BENNETT; SCHULZ, 1993; AKEDA *et al.*, 2006; CUGAT *et al.*, 2006).

Lesões musculares (WRIGHT-CARPENTER *et al.*, 2004; HAMMOND *et al.*, 2010).

2.2 Lesões musculares

Lesão muscular é definida como qualquer alteração morfológica ou histoquímica em tecido mole que acarreta disfunção do aparelho locomotor (CLEBIS; NATALI, 2001). Pode ser atraumática ou traumática e, nesse caso, pode ser causada por trauma direto ou indireto, conforme ilustra a Figura 1.

O estiramento (ou distensão) muscular, causado por trauma indireto, é definido como um rompimento parcial ou completo de fibras ou feixes musculares, ocasionado por esforço extremo realizado por determinado músculo. Também há rompimento dos capilares sanguíneos, com consequente infiltração de sangue no sítio da lesão que, por sua vez, resulta em formação de um coágulo. A contusão muscular, por outro lado, é considerada uma lesão traumática aguda, geralmente ocorrida nos membros inferiores, que resulta de um trauma direto aos tecidos moles, causando dor

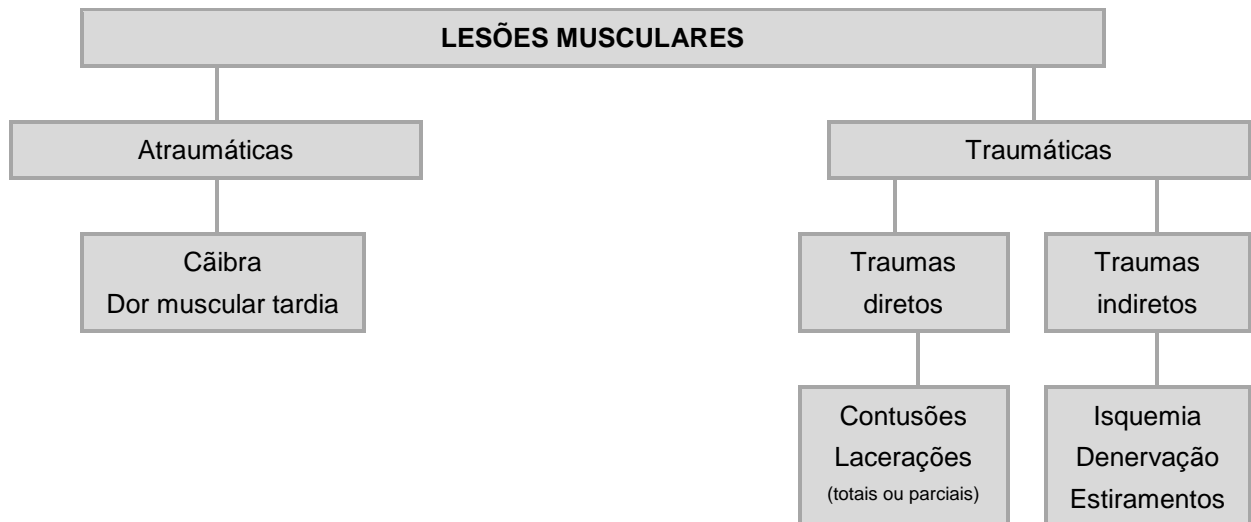


Figura 1 – Diagrama representativo da classificação das lesões musculares (HUAR-*Det al.*, 2002; JÄRVINEN *et al.*, 2005; HAMMOND *et al.*, 2010).

e promovendo a formação de edema. Dependendo do impacto desse trauma, a contusão pode ser leve ou pode estar acompanhada de infiltração de sangue importante nos tecidos circundantes, podendo ocasionar equimose ou, em casos mais graves, a síndrome compartimental (HUAR*Det al.*, 2002; JÄRVINEN *et al.*, 2005).

Nas distensões, a dor decorrente da ruptura dos feixes é imediata e impossibilita a continuidade do movimento, razão pela qual é mais facilmente reconhecida do que as contusões. Já a presença de edema evidente ou de equimose distal à lesão torna o diagnóstico da contusão muscular mais fácil. De toda forma, o diagnóstico da lesão muscular deve considerar história clínica detalhada do trauma, exame físico com a inspeção e palpação dos músculos envolvidos, e testes de função com e sem resistência externa (FERNANDES *et al.*, 2009). O exame ultrassonográfico tem sido recomendado como o método de escolha para a confirmação e a graduação da lesão muscular (ASPELIN *et al.*, 1992). A ressonância magnética possui boa sensibilidade para edemas, tamanho do hematoma e avaliação de desinserções musculotendíneas, embora seja um exame estático (FERNANDES *et al.*, 2009).

As lesões musculares podem ocorrer em qualquer pessoa durante a realização de tarefas motoras, mesmo as mais rotineiras. No entanto, ocorrem mais frequentemente na prática de esportes, atingindo, especialmente, atletas profissionais. Essas lesões representam até 50% de todas as lesões ocorridas em eventos esportivos,

90% delas se caracterizam por estiramentos ou contusões (ORCHARD, 2001; VERRALL *et al.*, 2001), e geralmente afetam a junção miotendínea de músculos superficiais que cruzam duas articulações, como os músculos reto femoral, semitendíneo e gastrocnêmio (JÄRVINEN *et al.*, 2007).

O tratamento dessas lesões se torna, portanto, ponto de relevância, no sentido de acelerar o retorno do atleta ao desempenho de sua profissão. Esse tratamento visa, sobretudo, o reparo ideal dos tecidos moles lesionados, diferentemente do que ocorre com lesões ósseas, em que se deve promover a regeneração do tecido ósseo comprometido (FERNANDES *et al.*, 2009).

Nesse sentido, há que se entender a sequência de eventos envolvidos na cicatrização muscular, que ocorre em três fases já bem estabelecidas, a saber: destruição, reparo e remodelação (KALIMO *et al.*, 1997). A fase de destruição é caracterizada pela formação de hematoma, necrose do tecido muscular (miofibrilas) e proliferação de células inflamatórias; a fase de reparo envolve a fagocitose do tecido necrosado, o reparo do músculo estriado, a produção de tecido cicatricial conectivo, e a neoformação vascular; a fase de regeneração é o período em que há a maturação das miofibrilas regeneradas, a reorganização do tecido cicatricial e a recuperação da capacidade funcional muscular (MENETREY *et al.*, 2000; FERNANDES; PEDRINELLI, 2011).

O reparo das fibras musculares inicia com a ativação das células-satélite, ou seja, as células miogênicas precursoras localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática de cada fibra muscular, que proliferam e se diferenciam em miotúbulos multinucleados e, eventualmente, em miofibrilas. Muitos desses mioblastos têm a capacidade de se fundir com as miofibrilas necróticas existentes e, assim, prevenir a degeneração completas das fibras musculares (HUARD *et al.*, 1994). Os fibroblastos, simultaneamente, invadem o hematoma e começam a produzir matriz extracelular para regenerar a estrutura do tecido conectivo, de modo que o local da lesão incorpore desde logo esse tecido de granulação, o que permite que o membro comprometido possa ser usado antes que o processo de regeneração se complete (LEHTO *et al.*, 1985).

Em lesões musculares mais extensas, eventualmente a proliferação dos fibroblastos pode, rapidamente, resultar em formação excessiva de tecido de cicatrização denso, o que impede o reparo do músculo e, conseqüentemente, a recuperação

completa da lesão (HURME *et al.*, 1991), em qualquer de suas possíveis formas (distensão, contusão ou laceração) (MENETREY *et al.*, 1999).

A restauração do suprimento vascular constitui processo vital para a boa regeneração do músculo lesionado. Também é pré-requisito para a recuperação morfológica e funcional da área comprometida (JÄRVINEN *et al.*, 2007).

Acredita-se que, durante o reparo muscular, as células-satélite sejam ativadas por substâncias tróficas liberadas pelo músculo lesionado, e também tem sido demonstrado que diferentes fatores de crescimento liberados pela ativação imediata das plaquetas no momento do trauma estão envolvidos nas diferentes respostas da lesão muscular (CHAMBERS; McDERMOTT, 1996). Há dados sugestivos de que cada fator de crescimento desempenhe um papel específico no reparo muscular e que, portanto, diferentes fatores de crescimento podem aperfeiçoar a cicatrização muscular (JENNISCHE, 1989; ANDERSON *et al.*, 1991; MENETREY *et al.*, 2000).

O tratamento clínico convencional da fase aguda das lesões musculares inclui proteção e repouso, crioterapia, compressão e elevação, procedimentos conhecidos como o princípio PRICE (sigla em inglês para representar *protection, rest, ice, compression and elevation*). Basicamente, o repouso logo após o trauma direto previne a retração muscular tardia ou a formação de uma falha muscular maior em decorrência de promover a redução do tamanho do hematoma e da quantidade de tecido conectivo cicatricial (JÄRVINEN; LEHTO, 1993).

O uso precoce de gelo, por sua vez, parece estar significativamente associado com hematomas menores, processo de inflamação menos intenso e regeneração mais rápida (HURME *et al.*, 1993). A compressão associada ao uso do gelo reduz tanto a temperatura quanto o fluxo sanguíneo intramuscular (THORSON *et al.*, 1987). Por fim, a elevação do membro lesionado resulta na diminuição da pressão hidrostática e na consequente redução de líquido no espaço intersticial (FERNANDES; PEDRINELLI, 2011).

O uso por curto período de tempo de anti-inflamatórios não hormonais (COPLAND *et al.*, 2009) ou de medicações corticosteroides (KENNEDY; WILLIS, 1976) também tem sido recomendado. Os anti-inflamatórios não hormonais parecem reduzir a reação inflamatória celular em fase precoce da recuperação da lesão, sem interferir no processo de cicatrização (já que não retarda a ativação das células-

satélite nem a formação dos miotúbulos), na força tênsil ou na contração muscular (THORSSON *et al.*, 1998).

Todavia, além de serem procedimentos cujas evidências científicas não são solidamente conclusivas, o tempo mínimo para retorno ao exercício de esportes é de seis semanas, havendo casos em que esse retorno chega a ser, inclusive, impossível (WRIGHT-CARPENTER *et al.*, 2004). Nesse sentido é que se busca por novas modalidades terapêuticas que otimizem o reparo muscular e, conseqüentemente, reduzam o tempo de tratamento para retorno às atividades esportivas.

A partir das evidências sobre o papel positivo de fatores de crescimento na cicatrização muscular, sobre a liberação desses fatores pelas plaquetas, sobre a presença desses fatores de crescimento no PRP, e sobre os efeitos desse produto autólogo no processo de cicatrização, muitos estudos vêm relatando os efeitos do PRP no reparo das lesões musculares.

2.3 O uso do PRP em lesões musculares

Injeção intralesional de soro autólogo em casos de lesões musculares foi relatada pela primeira vez com mais consistência em 2004, por Wright-Carpenter *et al.* Esses autores criaram modelo experimental de contusão no músculo gastrocnêmio de ratos. Injeções de soro autólogo foram administradas a essas lesões duas, 24 ou 48 horas após a lesão, e resultaram em ativação acelerada de células-satélite e em aumento de diâmetro das miofibras em regeneração. Posteriormente, os mesmos autores realizaram estudo-piloto em que trataram lesões musculares de atletas com injeções intralesionais de soro autólogo e observaram redução de 30% (equivalente a seis dias) no tempo de retorno às suas atividades esportivas. Esses efeitos foram decorrentes, segundo os pesquisadores, da presença de níveis aumentados de fatores de crescimento (FGF-2, HGF e TGF-beta1) detectados por ELISA.

Em 2005, Sánchez *et al.* observaram que lesões musculares, também em atletas, tratadas com PRP sob monitoramento ultrassonográfico, mostraram regeneração total na metade do tempo esperado.

A partir dessas observações, Hammond *et al.* (2010) desenvolveram modelo animal (em ratos) de distensão importante em músculo tibial anterior. Os ratos foram

distribuídos em três grupos de tratamento: injeção local de PRP, injeção de plasma pobre em plaquetas como um tratamento placebo, e sem tratamento. O tempo de recuperação para a função contrátil completa foi significativamente menor (14 dias) nas lesões tratadas com PRP do que nos outros dois grupos de tratamento (21 dias).

Também em 2009, Foster *et al.* realizaram ampla revisão sistemática da literatura sobre o uso do PRP em diferentes sítios tratados na área da Ortopedia e, em relação especificamente às lesões musculares, encontraram apenas quatro estudos clínicos não randomizados sobre os efeitos do PRP na cicatrização muscular, o que os levou a recomendar a realização de estudos mais robustos para que se possa compreender melhor os efeitos do PRP no tratamento desse tipo de lesão. Também relataram os efeitos deletérios do PRP nas lesões musculares reportados por outros autores, como a cicatrização fibrótica que pode levar a um aumento na recorrência dessas lesões.

Em 2012, Hamid *et al.* apresentaram protocolo do primeiro estudo clínico randomizado e controlado a ser realizado em 28 atletas que venham a apresentar lesões musculares grau 2 no dorso da coxa e que serão tratados com injeções de PRP associadas com programa de reabilitação ou apenas com programa de reabilitação ao longo de 16 semanas. Os autores esperam que os resultados desse estudo elucidem os efeitos reais do PRP nesse tipo e sítio de lesão.

Harris *et al.* (2012) administraram injeções intramusculares de PRP em diferentes tecidos moles saudáveis de coelhos. Na pata direita de cada coelho foi injetado PRP (0,5 mL), e na pata contralateral foi injetado soro fisiológico. Exame histológico das amostras obtidas foi realizado após duas semanas (seis coelhos), seis semanas (seis coelhos) e 12 semanas (seis coelhos que receberam nova injeção após seis semanas). No que tange ao músculo quadríceps, as patas que receberam PRP mostraram, após duas semanas, presença de trombose, necrose e deposição de cálcio; após seis e 12 semanas, os achados histológicos evidenciaram infiltrado inflamatório persistente, embora reduzido. Nas áreas focais de tecido de cicatrização foram observados fibroblastos, formação de colágeno e neovascularização. Os sítios que receberam soro fisiológico não apresentaram qualquer reação em todos os três momentos do estudo. Os autores concluíram que o PRP pode iniciar resposta inflamatória em tecidos moles normais, sem lesão, em coelhos.

Em outro estudo experimental, Gigante *et al.* (2012) produziram lesões bilaterais no músculo longo dorsal de ratos. De um lado, a lesão foi tratada com Matriz de Fibrina Rica em Plaquetas (PRFM); as lesões do lado contralateral não receberam tratamento. Os animais foram avaliados cinco, dez, 40 e 60 dias após os procedimentos. Análises histológica, imuno-histoquímica e histomorfométrica visaram à avaliação da regeneração muscular, neovascularização, fibrose e processo inflamatório, além da presença de zonas metaplásicas, calcificações e ossificação heterotópica. Em comparação com os ratos-controle, aqueles cujas lesões foram tratadas com PRFM apresentaram melhor regeneração muscular, neovascularização aumentada, e leve redução de fibrose. Não foram observadas diferenças no que tange ao processo inflamatório, nem foram identificadas metaplasias, ossificações ou calcificações.

Estudo recente conduzido por Bubnov *et al.* (2013) comparou os efeitos do uso do PRP guiado por ultrassonografia com os resultados do tratamento convencional (PRICE) para lesões musculares agudas. Trinta atletas do sexo masculino, com média de idade de 24 anos, que sofreram lesões musculares locais foram incluídos no estudo consecutivamente, e alocados em dois diferentes grupos: no primeiro grupo, as lesões foram tratadas com injeções locais de PRP associadas com o tratamento convencional; no segundo grupo, os atletas receberam apenas o tratamento convencional. Todos foram avaliados com o mesmo protocolo no momento do primeiro atendimento e, posteriormente, no primeiro dia após o início dos procedimentos terapêuticos e, a partir daí, a cada sete dias, até o 28º dia pós-tratamento. Foram avaliados o nível de dor (por escala visual análoga), a função muscular de acordo com o nível de dor em flexão resistida, força e amplitude do movimento, e a regeneração do músculo lesionado, evidenciada, à ultrassonografia, com o desaparecimento de áreas ecóicas, substituição do hematoma por tecido fibroso e aparecimento de neovascularização.

Neste estudo de Bubnov *et al.* (2013), o alívio da dor foi significativamente maior no grupo que recebeu PRP ao longo das quatro primeiras avaliações. A evolução física dos atletas que receberam PRP foi significativamente melhor no que tange à força e à amplitude do movimento nas avaliações realizadas no sétimo e no 14º dia após o início do tratamento. Na última avaliação, não houve diferenças entre os grupos com relação à flexão resistida e à força, mas a amplitude do movimento se mostrou significativamente melhor também no grupo tratado com PRP. O retorno às ati-

vidades esportivas foi possível em cerca de 10 dias e 22 dias para os pacientes tratados com e sem PRP, respectivamente. Esses resultados ratificaram os efeitos positivos do PRP no tratamento das lesões musculares agudas nas variáveis avaliadas.

Segundo informações publicadas por Wasterlain *et al.* (2013), injeções de PRP eram usadas em cerca de 86 mil atletas norte-americanos para o tratamento de lesões agudas e crônicas em tendões, ligamentos e músculos. Em 2010, a Agência Internacional Anti-Doping (WADA – *World Anti-Doping Agency*) proibiu o uso de injeções intramusculares de PRP para atletas de competição por acreditar que essas injeções aumentariam a liberação de fatores de crescimento que estimulariam o desempenho esportivo. Essa proibição, contudo, foi banida devido à falta de evidências de efeitos ergogênicos sistêmicos do PRP, embora fatores de crescimento acrescidos no PRP continuem proibidos.

Wasterlain *et al.* (2013) realizaram estudo laboratorial descritivo com 25 atletas lesionados tratados com PRP rico em leucócitos com o objetivo de quantificar os efeitos ergogênicos sistêmicos do PRP e de identificar marcadores moleculares para detecção de atletas tratados com o produto. Para tanto, seis diferentes fatores de crescimento monitorados pela WADA foram mensurados nesses atletas antes das injeções e 25 minutos, três horas e diariamente ao longo de quatro dias após o tratamento. Os resultados do estudo evidenciaram possível efeito ergogênico do PRP, uma vez que os níveis séricos de IGF-1, VEGF e bFGF aumentaram significativamente após o tratamento. Foram observados níveis elevados de VEGF em todos os pacientes após o tratamento, e em 88% deles esse aumento se manteve em todas as avaliações, sugerindo esse fator de crescimento como um marcador molecular sensível para a identificação de atletas recém-tratados com injeções de PRP.

O fato é que, apesar do uso indiscriminado do PRP em algumas comunidades esportivas para tratamento clínico de lesões musculares agudas, tanto os estudos experimentais quanto os estudos clínicos ainda são controversos e inconclusivos. Além disso, ainda não estão absolutamente claros os mecanismos de atuação do PRP na cicatrização muscular, o que justifica a realização deste estudo experimental.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) homólogo no reparo de lesões musculares decorrentes de impacto induzido em ratos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a deposição de colágeno no processo de reparação tecidual de lesões musculares contusas em ratos sob ação de concentrado de plaquetas em sete e 21 dias.

Realizar análise morfológica microscópica qualitativa do processo de reparação tecidual de lesões musculares induzidas em ratos sob ação do concentrado de plaquetas em sete e 21 dias.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Procedimentos éticos

A realização deste estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo 334/2011 (Anexo 1).

4.2 Amostra

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal da UFMS, no período de abril a julho de 2012. Foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, isogênicos, com 12 semanas de idade e peso médio de 320 ± 20 gramas, de linhagem EPM-1, originários do Biotério Central da (UFMS).

Inicialmente, ao longo de 30 dias, os animais foram submetidos a período de adaptação e ganho de peso, durante o qual foram mantidos em caixas-padrão para cinco animais, feitas de polipropileno e com tampa metálica galvanizada (Figura 2).

O ambiente foi climatizado com temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, iluminação artificial com ciclos claro/escuro de 12 horas, e umidade do ar de $56 \pm 13\%$. Os animais eram alimentados com ração Nuvilab® CR1 (Nuvital Alimentos e Produtos Veterinários Ltda®, Curitiba, PR, Brasil) e água filtrada à vontade.



Figura 2 – Imagem fotográfica das caixas-padrão para cinco animais, feitas em polipropileno e com tampa metálica galvanizada, mantidas em ambiente devidamente climatizado.

4.3 Divisão dos grupos

Os animais foram alocados aleatoriamente em quatro grupos:

Grupo 1: cinco ratos submetidos à coleta de sangue para o preparo do PRP;

Grupo 2: patas esquerdas de 24 ratos cujas lesões musculares foram tratadas com soro fisiológico (SF) 0,9%.

Grupo 3: patas direitas de 24 ratos cujas lesões musculares foram tratadas com PRP.

Grupo 4: patas direitas e esquerdas (12 patas) de seis ratos cujas lesões musculares não foram tratadas.

4.4 Protocolo para produção da lesão experimental

Foram utilizados o mesmo aparelho e a mesma técnica para produção da lesão experimental descritos por Nogueira (2012), em Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Para a realização da lesão muscular, utilizou-se aparelho desenvolvido por Sene (2005), o qual consiste em duas hastes metálicas telescópicas ajustáveis, pelas quais é possível graduar a altura de 30cm, e uma base plástica com área de 272,5 cm² (Figura 3). Sobre essa base, foi acoplada uma superfície metálica retangular com área de 12,25 cm², que serviu de apoio para a queda do peso e fixação da pata traseira do animal em local demarcado, centrando o peso na região central da pata.

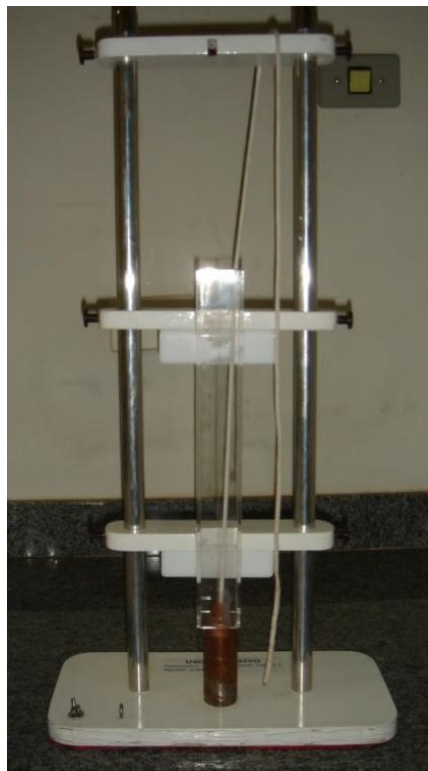


Figura 3 – Imagem fotográfica do aparelho proposto por Sene (2005) para produção de lesão muscular em animais.

Na parte superior final das hastes metálicas, foi fixada uma estrutura metálica que proporciona estabilidade, bem como suporta uma roldana pela qual um fio-guia fixa o peso a ser liberado. Foi confeccionado, em acrílico transparente, um guia entre as hastes para conduzir o peso durante a queda livre de 30 cm de altura, evitando desvios e oscilações do peso.

Os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg).

O aparelho para produção da lesão por impacto foi fixado, por meio de grampos, à mesa cirúrgica, como forma de estabilização, de modo a evitar que ocorresse qualquer oscilação na queda do peso.

Para que a lesão por impacto ocorresse sempre na mesma região, a carga liberada de uma altura de 30 cm foi conduzida pelo guia em acrílico e por um fio fixado diretamente sobre o peso lançado centralmente por meio de uma roldana posicionada nas hastes do equipamento (Figura 4).



Figura 4 – Imagem fotográfica do posicionamento da carga liberada sobre cada membro dos animais.

Os animais foram submetidos a um único trauma em cada membro, no terço médio do ventre muscular do músculo gastrocnêmico, e separados de acordo com o grupo experimental de que fariam parte.

Os 24 animais cujas patas formaram os Grupos 2 e 3 sofreram lesão contusa nas patas traseiras. Na região central posterior das patas esquerdas, foi administrado 0,1 ml de SF a 0,9% e, nas patas direitas, 0,1 ml de PRP (Figura 5).



Figura 5 – Imagens fotográficas da administração de SF e de PRP na região central posterior da pata esquerda e direita, respectivamente, dos animais.

4.5 Preparo e aplicação do PRP

Por meio de punção cardíaca realizada com agulha de 0,70 x 25mm, marca BD (22gX1”), acoplada a uma seringa descartável de 20 ml Viet Jet® (Labor Import Comércio, Importação e Exportação Ltda., Osasco, SP, Brasil) contendo 1mL de citrato de sódio a 10% (Bioclin®, Quibasa Ltda., Lote 0067/2011), foram obtidas quatro amostras contendo 8 ml de sangue com anticoagulante, dos cinco ratos que compuseram o Grupo 1 (Figura 6).

O sangue anticoagulado foi imediatamente submetido à contagem de células em aparelho automatizado Sysmex XE-2100D.

As quantidades médias de plaquetas contadas nas quatro amostras de sangue extraídas dos cinco ratos para preparo do PRP estão apresentadas na Tabela 1, considerando o sangue antes do preparo, o plasma rico em plaquetas e o plasma pobre em plaquetas.



Figura 6 – Imagem fotográfica da punção cardíaca realizada para obtenção de quatro amostras contendo 8 ml de sangue dos cinco ratos que compuseram o Grupo 1, para preparo do PRP.

Tabela 1 – Quantificação de plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$) observada nas quatro amostras de sangue extraídas de cinco ratos para o preparo do PRP.

	Amostras			
	1	2	3	4
Sangue antes do preparo	236	214	250	249
Plasma rico em plaquetas	1.195	808	928	1.145
Plasma pobre em plaquetas	148	141	138	182

Posteriormente, as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação em centrífuga eletrônica com controle de temperatura modelo Sigma 4K15. A centrifugação ocorreu em duas fases: na primeira, com 20 minutos de duração, os quatro tubos foram submetidos à centrifugação de 200g (991 rpm) a 22°C.

O preparado obtido apresentou coluna de líquido com duas frações predominantes: o plasma sobrenadante e concentrado de hemácias ao fundo, separadas por um creme leucocitário (Figura 7A). Com pipeta milimétrica de 500 μL , aspirou-se todo o plasma, que foi separado em quatro novos tubos de ensaio, e submetido à nova centrifugação, agora por 10 minutos a 400g (1.400 rpm) e 22°C.

Do segundo preparado, eliminou-se a porção sobrenadante, de forma que restasse apenas aproximadamente 1mL do centrifugado de maior peso (Figura 7B), sendo essa fração a que denominamos de PRP ou concentrado de plaquetas. O PRP homogeneizado foi submetido a nova contagem automatizada de células.



Figura 7 – (A) Preparado apresentando coluna de líquido com duas frações predominantes: o plasma sobrenadante e concentrado de hemácias ao fundo, separadas por um creme leucocitário. (B) Após eliminação da porção sobrenadante, preparado contendo apenas aproximadamente 1mL do centrifugado de maior peso (PRP).

4.6 Eutanásia

Após a coleta de sangue (Grupo 1) e dos períodos de sete e 21 dias após a lesão escolhidos para avaliação (Grupos 2, 3 e 4), os animais sofreram eutanásia por meio de injeção letal com a associação de solução injetável de cloridrato de S(+) cetamina (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Campinas, SP), tiopental sódico (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Campinas, SP) e

pó estéril diluído em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% em concentração de 100mg/ml.

Após a dissecação e coleta do músculo para análise, o descarte dos animais foi feito por incineração em ambiente apropriado.

4.7 Formas e períodos de avaliação

O gastrocnêmio de cada animal foi retirado por meio de incisão posterior nas patas traseiras dos animais posicionados em decúbito ventral, com dissecação romba de pele e tecidos moles. A integridade do músculo foi preservada mantendo a origem e a inserção (fêmur-músculo-calcâneo). Fixadas com alfinetes em superfície sólida e acondicionadas em formaldeído a 10% (Figura 8), as peças foram enviadas para análise histológica.



Figura 8 – Imagem fotográfica de amostra do gastrocnêmio íntegro fixada em superfície sólida e acondicionada em formaldeído a 10% para análise histológica.

4.8 Análise histológica

Os segmentos enviados à análise histológica receberam tratamento rotineiro com desidratação progressiva em álcool, inclusão em blocos de parafina, corte sagital e longitudinal de 5µm em micrótomo no terço central do ventre muscular, e as lâminas foram coradas com *Picrosirius Red* e Hematoxilina-Eosina (HE).

O exame das características histológicas e da quantidade de colágeno foi realizado no Laboratório de Toxicologia e Plantas Medicinais da Universidade Anhangueira – Uniderp.

Com o uso de microscópio óptico acoplado a computador, as imagens das lâminas foram digitalizadas e capturadas pelo sistema de processamento e análise de imagens *ImageLab*TM (Figura 9). Esse sistema foi desenvolvido para análises morfo-métricas e subtração de imagens, e pode ser utilizado para espécimes de escala macroscópica e microscópica. Possui vários sistemas de conversão de unidades, filtros de correção de imagens, inúmeros formatos de exportação e comunicação com outros programas.



Figura 9 – Microscópio óptico acoplado a computador em uso do sistema de processamento e análise de imagens *ImageLab*TM.

O sistema apresenta, na tela do computador, a imagem original digitalizada a

partir da lâmina histológica e, ao lado, três histogramas de frequência das intensidades R (vermelho), G (verde) e B (azul) da imagem. A partir da representação desses histogramas, o sistema calcula as quantificações desejadas, e todos os dados relativos a esses cálculos são apresentados em planilha própria do programa, a qual pode ser convertida para planilha do *Microsoft Office Excel 4.0*.

4.9 Análise estatística

As medidas das variáveis numéricas foram expressas em médias \pm desvios-padrão. As comparações intragrupos foram feitas com a aplicação do Teste *t* de *Student* nas amostras de distribuição normal e do Teste de *Wilcoxon* nas distribuições não normais. As análises intergrupos foram realizadas com Análise de Variância (ANOVA) e *post hoc* Test de *Tukey* nas amostras de distribuição normal, e com a aplicação do teste de *Kruskal-Wallis post hoc Test* de *Dunns* nas amostras de distribuição não normal. A normalidade dos grupos foi avaliada com a aplicação do Teste de *Shapiro-Wilk*. Adotou-se valor de $p \leq 0,05$ para determinação do nível de significância das diferenças encontradas.

Os dados foram tabulados em planilhas do programa *Microsoft Office Excel* (2010), e a normalidade das amostras foram avaliadas com o programa *Bioestat 5.0*. Os cálculos para comparação dos dados e a elaboração dos gráficos foram realizados com o programa *GraphPad Prism 4.0*.

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação de fibras colágenas

Os valores médios (e desvios-padrão) da quantidade de fibras colágenas de cada grupo em cada período de avaliação (sete e 21 dias), totalizando 60 patas avaliadas, encontram-se calculados na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias (e desvios-padrão) da quantificação de fibras colágenas observadas nas patas dos ratos-controle e dos ratos que receberam PRP e SF, sete e 21 dias após a lesão muscular. Campo Grande, MS, 2013.

	Grupo-controle n = 12	PRP n = 24	SF n = 24
sete dias	34,44±6,65	30,69±4,99	35,35±5,19
21 dias	38,29±6,58	38,52±6,47	35,02±6,73

Na análise intragrupos, quando comparadas as contagens realizadas no sétimo e no 21º dia após a lesão, não houve diferença nas quantidades médias de fibras colágenas no grupo-controle ($p = 0,094$) nem no grupo de ratos que recebeu SF ($p = 0,817$), conforme ilustra a Figura 10-A,C. Por outro lado, a quantidade de colágeno observada 21 dias após a lesão foi significativamente maior ($p = 0,00021$) do que aquela observada sete dias após a lesão no grupo de ratos que recebeu PRP (Figura 10-B).

Na análise intergrupos, na contagem realizada sete dias após a lesão, a quantidade média de fibras colágenas se mostrou significativamente menor ($p = 0,014$) nos ratos tratados com PRP em comparação aos tratados com SF, mas não em comparação ao grupo-controle. Já na contagem realizada 21 dias após a lesão, não houve diferença entre os grupos com relação à quantidade média de fibras colágenas (Figura 11).

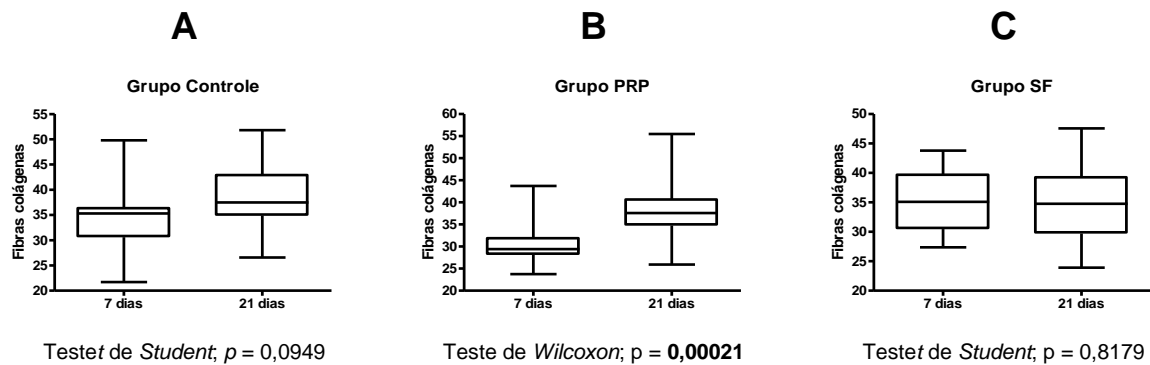


Figura10 – Representação gráfica das médias e desvios-padrão da quantidade de fibras colágenas sete e 21 dias após as lesões provocadas nos ratos do grupo-controle (A), tratados com PRP (B) e com SF (C).

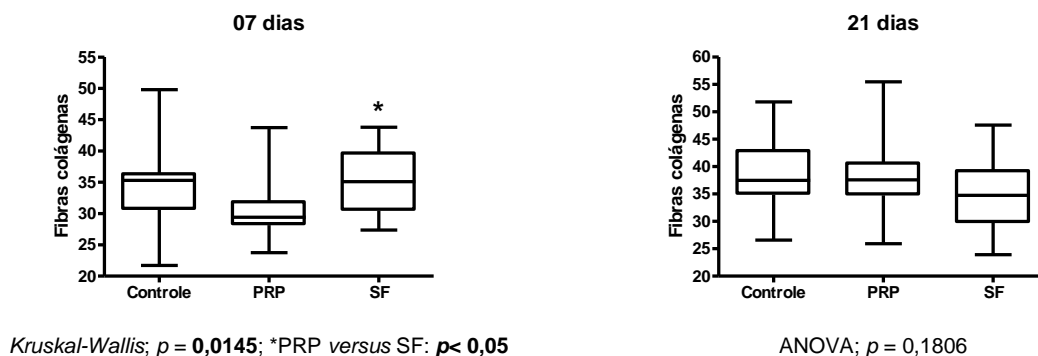


Figura11 – Representação gráfica das médias e desvios-padrão da quantidade de fibras colágenas sete e 21 dias após as lesões provocadas nos ratos dos três diferentes grupos de estudo.

5.2 Achados morfológicos

Uma síntese dos achados morfológicos nos dois momentos de avaliação do estudo se encontra no Quadro 2.

Aos sete dias, observou-se presença de macrófagos pontuais no tecido intersticial do músculo esquelético no grupo-controle. As fibras musculares nesse período se mostravam com aspecto normal. Observou-se, ainda, aparecimento de

mioblastos entre as fibras musculares (Figura 12). No mesmo período de sete dias, observou-se, no grupo de ratos tratados com PRP, evidente processo inflamatório por mononucleares, hemácias com aspecto normal e aparecimento de miotubos entre as fibras musculares (Figura 13). Já nos ratos tratados com SF, observaram-se miotubos, macrófagos e hemácias com aspecto normal (Figura 14).

Aos 21 dias, as fibras musculares e os vasos sanguíneos já apresentaram aspecto normal do tecido em ratos-controle e em ratos tratados com PRP (Figuras 15 e 16). Nos ratos tratados com SF, observaram-se focos de macrófagos e alguma formação de miotubos (Figura 17).

Quadro 2 – Síntese dos achados morfológicos nos dois momentos de avaliação do estudo.

Lesões	Sete dias	21 dias
Controle	<ul style="list-style-type: none"> - Macrófagos pontuais - Fibras musculares com aspecto normal - Mioblastos entre fibras musculares 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibras musculares com aspecto normal - Vasos sanguíneos
Tratadas com PRP	<ul style="list-style-type: none"> - Evidente processo inflamatório por mononucleares - Hemácias com aspecto normal - Miotubos entre fibras musculares 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibras musculares com aspecto normal - Vasos sanguíneos
Tratadas com SF	<ul style="list-style-type: none"> - Miotubos - Macrófagos - Hemácias com aspecto normal 	<ul style="list-style-type: none"> - Focos de macrófagos - Alguma formação de miotubos

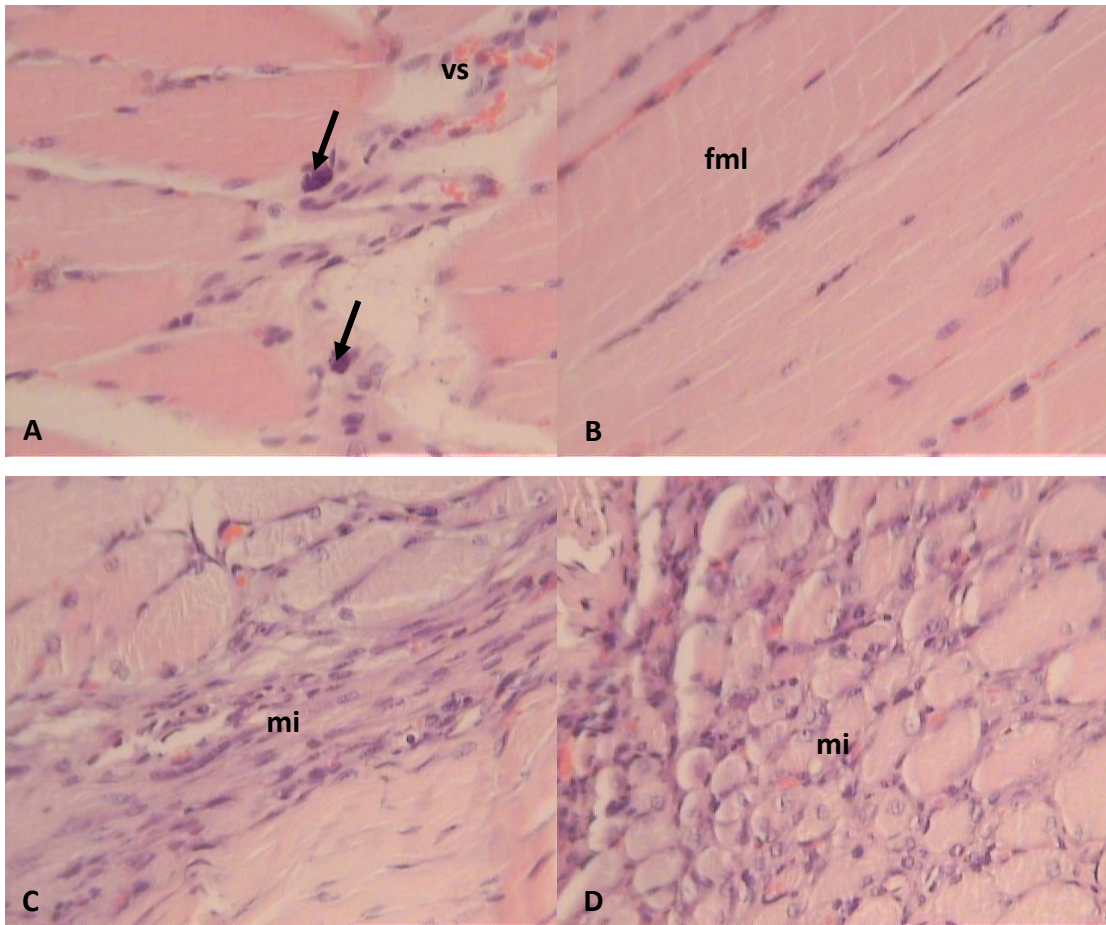


Figura 12 – Fotomicrografia de amostras do grupo-controle aos sete dias. Observam-se macrófagos (setas), fibra muscular em corte longitudinal (fml), mioblastos (mi) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x.

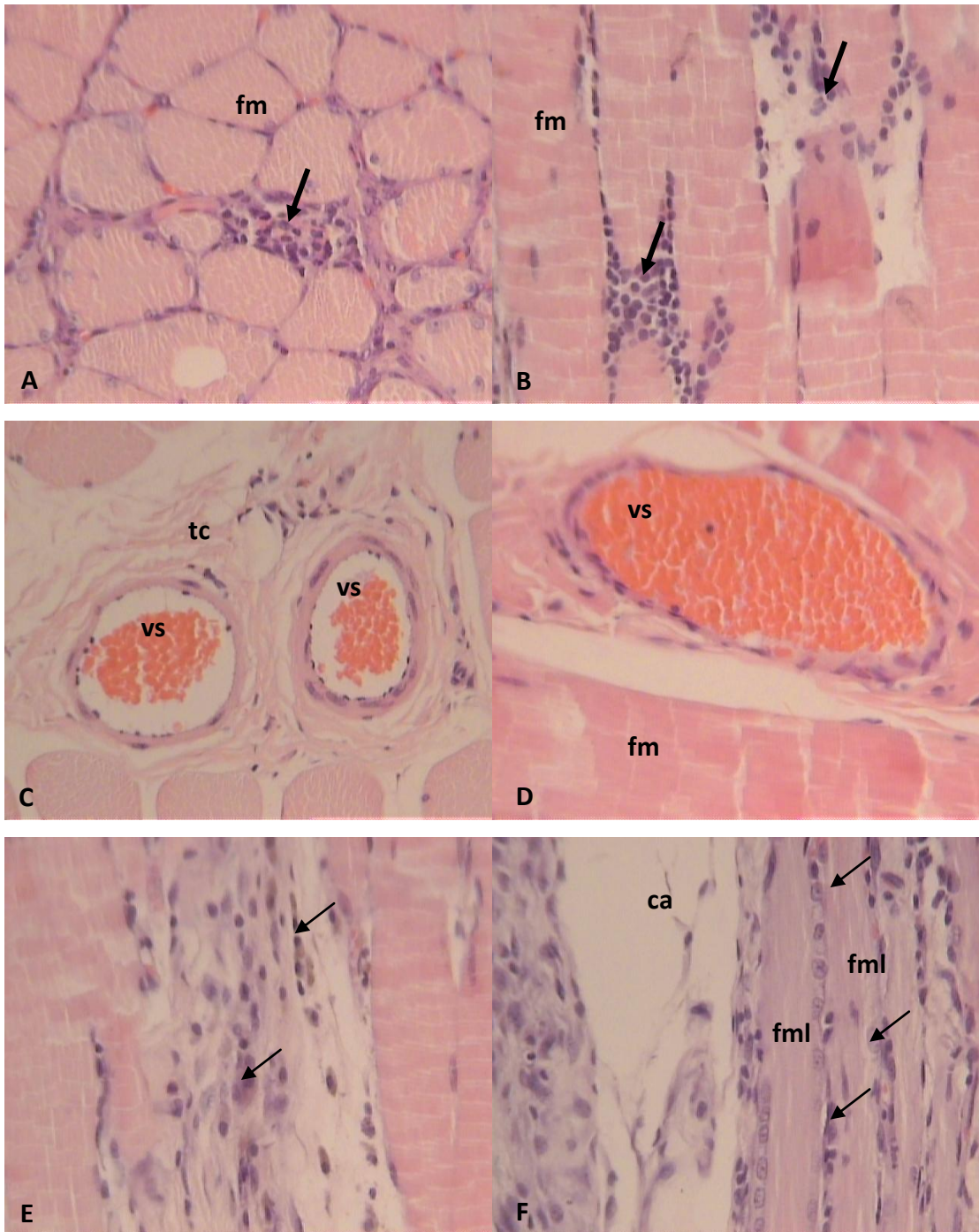


Figura 13 – Fotomicrografia de ratos tratados com PRP aos sete dias. Observa-se processo inflamatório por mononucleares (setas grossas), fibra muscular em corte transversal (fm), fibra muscular em corte longitudinal (fml), miotubos (setas finas), vasos sanguíneos (vs), células adiposas (ca) e tecido conjuntivo (tc). HE/200x.

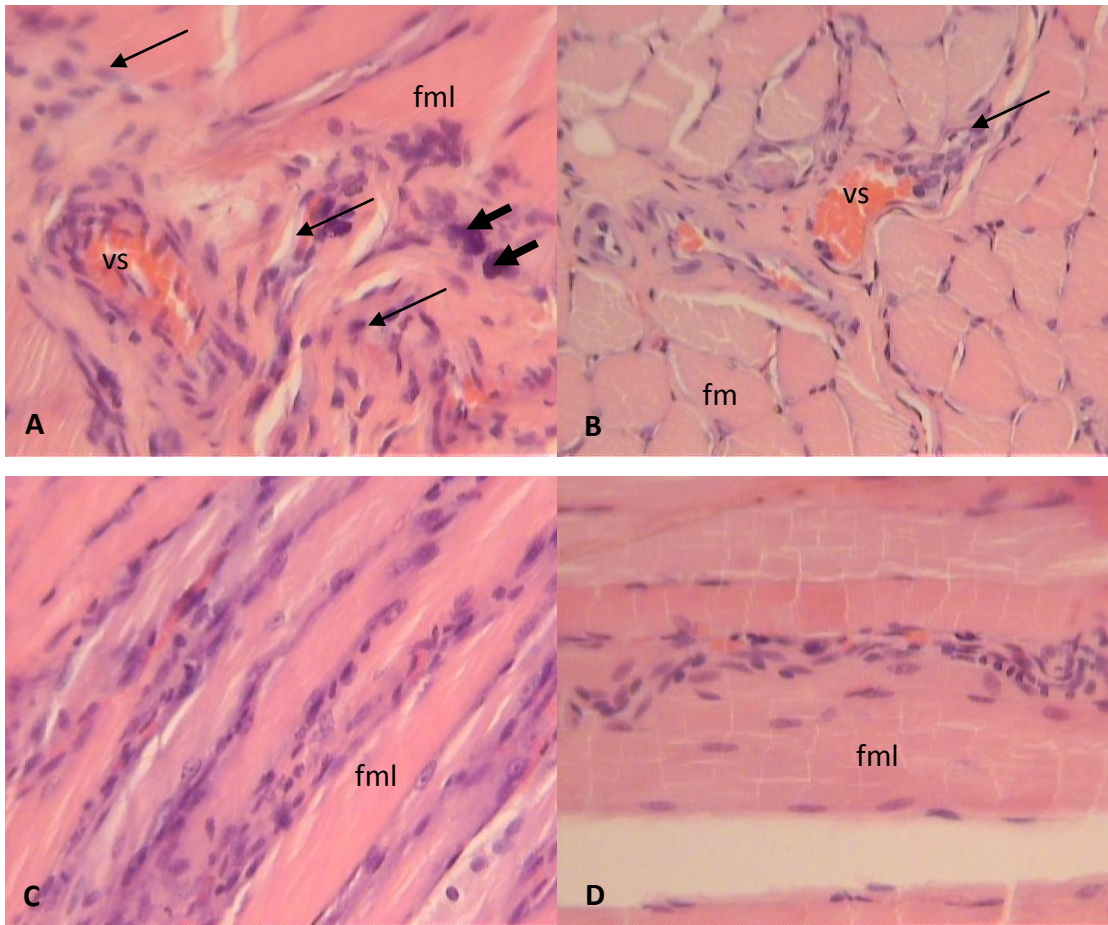


Figura 14 – Fotomicrografia de ratos tratados com SF aos sete dias. Observa-se fibra muscular em corte longitudinal (fml) e transversal (fm), miotubos (setas finas), macrófagos (seta grossa) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x.

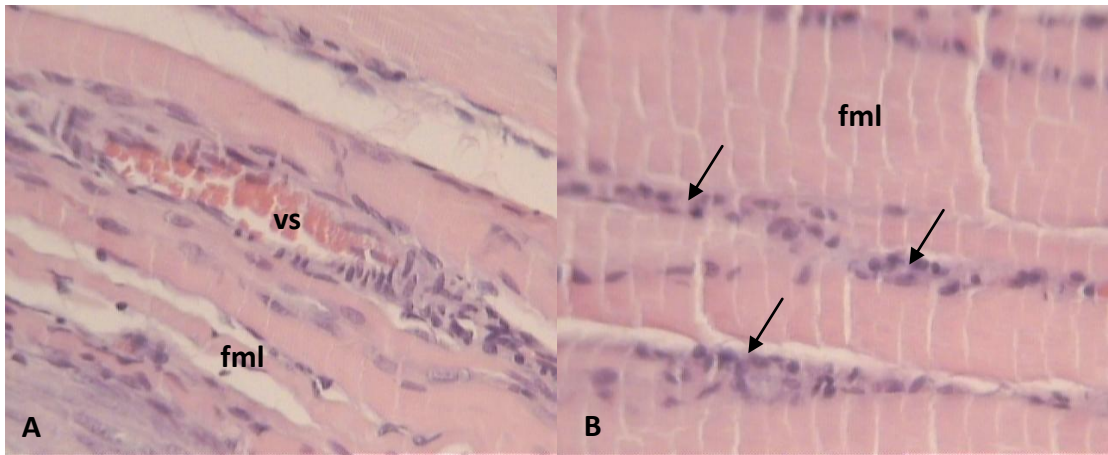


Figura 15 – Fotomicrografia de ratos-controle aos 21 dias. Observa-se fibra muscular em corte longitudinal (fml), núcleos das fibras musculares (setas) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x.

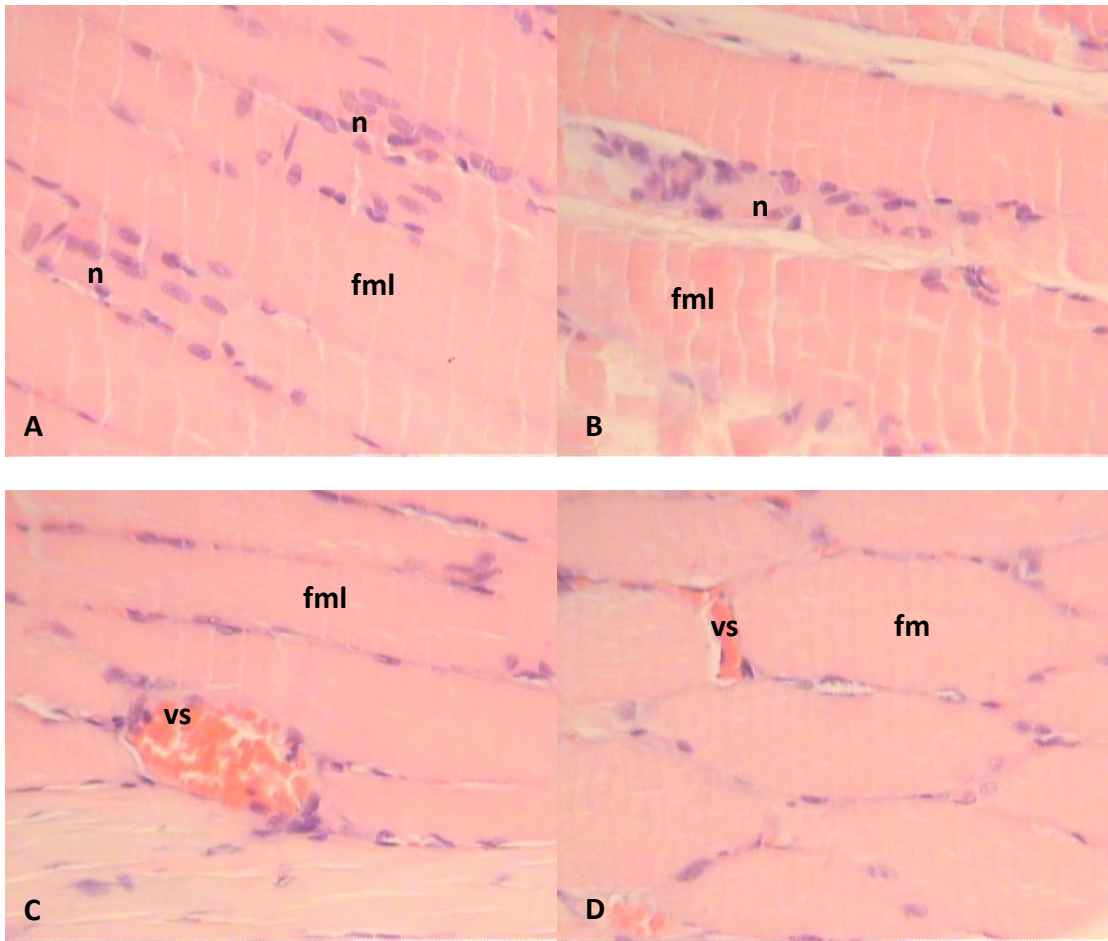


Figura 16 –Fotomicrografia de ratos tratados com PRP aos 21 dias. Observam-se núcleos (n), fibra muscular em corte transversal (fm), fibra muscular em corte longitudinal (fml) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x.

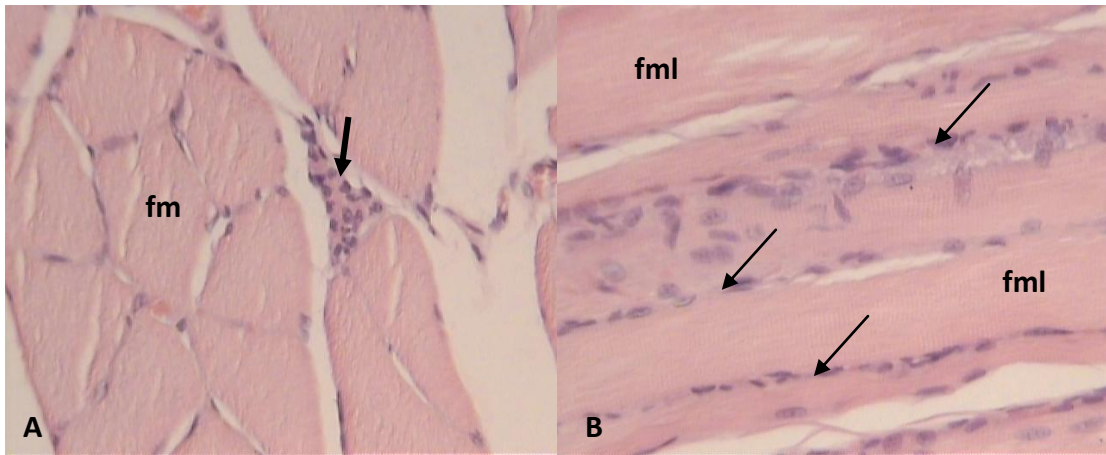


Figura 17 – Fotomicrografia de ratos tratados com SF aos 21 dias. Observa-se processo inflamatório por mononucleares (setas finas), fibra muscular em corte transversal (fm) e em corte longitudinal (fml), vasos sanguíneos (vs), tecido conjuntivo (tc) e miotubos (setas grossas). HE/200x.

6 DISCUSSÃO

Há evidências de que fatores de crescimento exercem papel fundamental no processo de cicatrização dos tecidos (LYNCH *et al.*, 1991); no entanto, além do uso isolado de muitos fatores de crescimento ainda ser impossível na prática clínica, não estão completamente esclarecidos os mecanismos de ação de todos os diferentes fatores nesse processo. A partir do conhecimento de que os grânulos-alfa das plaquetas concentram grande quantidade de fatores de crescimento específicos, como o PDGF e o TGF-beta, Marx *et al.* (1998) propuseram técnica para a obtenção de altas concentrações de fatores de crescimento, por meio do preparo de PRP autólogo. Essa técnica consiste, basicamente, no sequestro e na concentração de plaquetas do plasma sanguíneo, resultando em produto a ser aplicado na área da lesão em cicatrização (MESSORA *et al.*, 2009).

Apesar do uso disseminado de PRP no tratamento de lesões musculares de atletas e de alguns estudos terem demonstrado que o PRP pode abreviar o tempo de retorno às atividades esportistas após a lesão (WRIGHT-CARPENTER *et al.*, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2005; BUBNOV *et al.*, 2013), o fato é que ainda há poucos estudos experimentais voltados para a padronização do que é o PRP e para a compreensão dos mecanismos envolvidos no uso do PRP, especificamente em lesões musculares, motivo pelo qual poucas são as evidências passíveis de serem discutidas a partir dos resultados deste trabalho. De toda forma, em modelo experimental de contusão também no músculo gastrocnêmio de ratos, em cujas lesões foi injetado soro autólogo rico em plaquetas, Wright-Carpenter *et al.* (2004) observaram a ativação acelerada de células-satélite após 30 a 48 horas da lesão e o aumento de diâmetro das miofibras em regeneração na primeira semana após a lesão. Os autores observaram, ainda, concentrações aumentadas de FGF-2 (460%) e de TGF-beta1 (82%) ao ELISA, e sugeriram que poderiam, pelo menos parcialmente, ter sido responsáveis pela regeneração acelerada, devido às suas características proliferativas e quimiotáticas.

Em distensões importantes produzidas em músculo tibial anterior de ratos e tratadas com PRP ou placebo, Hammond *et al.* (2009) observaram tempo de regenera-

ção muscular significativamente menor no grupo tratado com PRP, e sugeriram que a aceleração da miogênese provavelmente seja o mecanismo responsável por esse efeito do PRP, devido às concentrações mais altas de diferentes fatores de crescimento contidas no produto.

Harris *et al.* (2009) injetaram PRP ou SF em diferentes tecidos musculares de coelhos sadios (sem lesões), cujas amostras foram histologicamente avaliadas duas, seis e 12 semanas após o procedimento. Observaram, após seis e 12 semanas, infiltrado inflamatório persistente, embora decrescente nos sítios que receberam PRP, mas não nos que receberam SF. Do mesmo modo, apenas nas áreas focais de tecido de cicatrização das patas que receberam PRP, observaram fibroblastos, formação de colágeno e neovascularização, o que não foi observado em nenhum sítio em que se aplicou SF. Os autores concluíram que o PRP promoveu resposta inflamatória em tecidos moles normais de coelho, assertiva que sustenta a tese defendida neste estudo de que o PRP promova, inicialmente, a intensificação de processo inflamatório em lesões musculares.

Por outro lado, Gigante *et al.* (2012) não observaram quaisquer diferenças relativas ao processo inflamatório quando comparadas lesões produzidas no músculo longo de ratos tratadas com PRP e não tratadas, embora, nas lesões tratadas, tenha se observado melhor regeneração muscular, neovascularização aumentada e leve redução de fibrose.

Deve-se ressaltar que as concentrações de diferentes fatores de crescimento no PRP obtido de diferentes espécies (ratos, coelhos, ovelhas e humanos) apresentam variação significativa, o que influencia diretamente tanto estudos experimentais quanto ensaios clínicos (van den Dolder *et al.*, 2006). Daí a necessidade de protocolos padronizados para que se amplie, de fato, o conhecimento sobre os efeitos do PRP no tratamento de lesões musculares.

O uso do PRP para a regeneração de ossos e tecidos moles vem sendo foco da atenção de clínicos e pesquisadores, assim como vem sendo relatada a sua aplicação em diferentes especialidades cirúrgicas. A facilidade de uso na prática clínica associada tanto com resultados aparentemente benéficos no que tange à regeneração óssea, à redução de sangramento e à rápida cicatrização do tecido, quanto ao fato de ser um produto autólogo faz do PRP alvo de amplo interesse. Neste estudo, o interesse foi focado no uso do PRP em lesões musculares.

Desde a técnica inicialmente proposta para produção de PRP autólogo, cujo método de separação celular descontínua exigia grande quantidade de sangue, diversos protocolos propostos vêm contribuindo para a evolução da técnica original, incluindo necessidade de menor quantidade de sangue, uso de centrífugas de bancada, baixo custo e menor tempo de produção, facilidade de aplicação em ambiente ambulatorial, e menor estresse sobre o sistema cardiovascular do paciente (MESSORA *et al.*, 2009). Os protocolos aparentemente mais seguros e eficazes se referem às técnicas de dupla centrifugação (SONNLEITNER *et al.*, 2000), adotada para a realização do presente estudo.

Alguns estudos demonstraram que concentrações de plaquetas 338% maiores do que as normalmente encontradas no sangue potencializam a cicatrização de osso e de tecidos moles em seres humanos (WHITMAN *et al.*, 1997; CAMARGO *et al.*, 2002; LEKOVIC *et al.*, 2002; MARX, 2004). Outros autores defendem que os efeitos esperados do PRP só serão alcançados quando as concentrações de plaquetas forem oito vezes maiores do que as concentrações do sangue circulante. Neste estudo experimental, nas quatro amostras de sangue extraído de cinco ratos para a produção de PRP, obtivemos concentrações médias de plaquetas cerca de quatro a cinco vezes maiores do que as concentrações observadas no sangue, conforme ilustra a Figura 18.

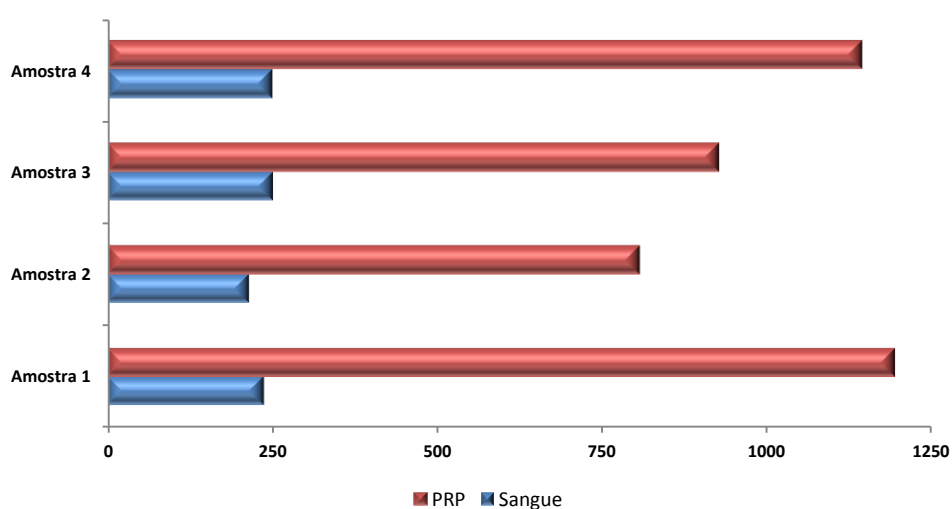


Figura 18 – Representação gráfica das concentrações de plaquetas no sangue circulante e no PRP das quatro amostras utilizadas para a produção do PRP.

PRP assim produzido foi injetado em lesões traumáticas (contusões) produzidas no terço médio do ventre muscular do gastrocnêmio das patas traseiras direitas de 24 ratos, enquanto as mesmas lesões nas patas esquerdas foram tratadas com SF a 0,9%. Os achados evidenciaram que, no grupo de lesões tratadas com PRP, a quantidade média de colágeno se mostrou significativamente menor do que a dos demais grupos (controle e tratamento com SF) na avaliação realizada no sétimo dia após a lesão, mas que houve aumento significativo nessa quantidade de colágeno do sétimo para o 21º dia após a lesão apenas no grupo de lesões tratadas com PRP que, nessa última avaliação, mostraram quantidade média de colágeno similar à dos demais grupos.

Sabe-se que a degradação do colágeno inicia precocemente e tem atividade intensa no processo inflamatório, evento que ocorre na primeira fase da cicatrização (ROBSON *et al.*, 2001). De fato, exceto nas lesões tratadas com SF, foi observada menor quantidade média de colágeno na avaliação realizada no sétimo dia após a lesão do que naquela realizada no 21º dia. No entanto, na primeira avaliação (sete dias), a quantidade média de colágeno foi significativamente menor nas lesões tratadas com PRP do que nas lesões-controle e nas tratadas com SF. Esse achado parece ratificar a tese levantada por Hammond *et al.* (2009), segundo a qual o processo inflamatório seja provavelmente alterado na presença de PRP, ora reduzindo o período de inflamação da lesão, ora alterando a liberação de citocinas. Os resultados, então, permitem agregar nova hipótese a ser testada, sugerindo prolongamento ou maior intensidade da fase inflamatória e, por isso, degradação mais intensa do colágeno na primeira fase da cicatrização muscular. Todas essas hipóteses, porém, carecem de estudos que as testem mais rigorosamente.

Por outro lado, nas fases de reparo e de remodelação, a deposição de colágeno de maneira organizada e graduada é a característica mais importante para que haja equilíbrio entre a lise da matriz celular antiga e a síntese da nova matriz, condição imprescindível para o sucesso da regeneração do tecido muscular lesionado (ROBSON *et al.*, 2001). Além disso, o colágeno inicialmente produzido é mais fino do que o colágeno do tecido saudável; esse colágeno inicial é, então, reabsorvido, e um colágeno mais espesso é produzido ao longo das linhas de tensão, o qual se correlaciona positivamente com o aumento da resistência tênsil (WITTE; BARBUL, 1997). Neste estudo, pode-se observar que a quantidade média de colágeno aumen-

tou significativamente do sétimo para o 21º dia após a injeção de PRP, o que não ocorreu nas lesões não tratadas nem naquelas tratadas com SF. O aumento do colágeno do sétimo ao 21º dia nos animais que receberam o PRP parece ter auxiliado no equilíbrio degradação-deposição de colágeno, por mecanismos que precisam ser elucidados.

Para facilitar a compreensão dos resultados observados neste estudo, no Quadro 2 estão sintetizados os achados morfológicos. Nas lesões tratadas com PRP, o processo inflamatório se mostrou mais evidente do que nos demais grupos do estudo na avaliação realizada sete dias após o procedimento. Essa observação parece ratificar que o PRP pode intensificar o processo inflamatório.

Na avaliação final com 21 dias, os achados morfológicos das lesões-controle e das lesões tratadas com PRP foram semelhantes, indicando boa regeneração do músculo lesionado em ambos os grupos. A administração de PRP parece não ter demonstrado diferenças nos aspectos morfológicos com 21 dias, no final do processo de reparo da lesão muscular, quando comparada ao grupo-controle, já que as mesmas características foram observadas nas lesões não tratadas. Por outro lado, nas lesões tratadas com SF, o tecido ainda não mostrava plena regeneração, com fibras musculares ainda em formação e com ausência de vascularização.

Essa análise descritiva morfológica corrobora os achados quantitativos da deposição de fibras colágenas nas cicatrizes musculares, pois mostra que no grupo em que fora aplicado soro fisiológico apenas, ainda em 21 dias havia reação inflamatória, enquanto nos outros dois grupos o tecido já havia se recomposto totalmente, sugerindo, talvez, uma melhor organização do processo de reparo muscular no grupo em que fora utilizado o PRP.

Neste estudo, a contribuição se limita à observação de que o PRP ativou significativamente o processo inflamatório sete dias após ser injetado em lesões contusas produzidas no músculo gastrocnêmio de ratos, razão pela qual parece ter havido maior degradação de colágeno nesse período. Por outro lado, resultou em aumento significativo de colágeno entre o sétimo e o 21º dia após o procedimento, sugerindo uma completa restituição tecidual.

7 CONCLUSÕES

A quantidade de colágeno nas lesões tratadas com PRP foi significativamente menor do que a das demais lesões na avaliação realizada sete dias após o procedimento, mas se equiparou à dos demais grupos na avaliação realizada no 21º dia.

Houve aumento significativo na quantidade de colágeno do sétimo para o 21º dia após o procedimento nas lesões tratadas com PRP, o que não ocorreu nas lesões tratadas de outra forma.

O processo inflamatório se mostrou mais intenso nas lesões tratadas com PRP em comparação às lesões dos outros grupos de tratamento na avaliação realizada sete dias após o procedimento; todavia, os aspectos morfológicos dessas lesões se mostraram similares aos das lesões não tratadas 21 dias após o procedimento.

REFERÊNCIAS

- Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(2):250-7.
- Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(12):1272-80.
- Alfredson H, Lorentzon R. Chronic Achilles tendinosis: recommendations for treatment and prevention. *Sports Med*. 2000; 29(2):135-46.
- Almeida AM. Plasma rico em plaquetas na regeneração do terço central do ligamento da patela: estudo prospectivo randomizado [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.
- Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br*. 2009; 91(8):987-96.
- Anderson JE, Liu L, Kardami E. Distinctive patterns of basic fibroblast growth factor (bFGF) distribution in degenerating and regenerating areas of dystrophic (mdx) striated muscles. *Dev Biol*. 1991; 147(1):96-109.
- Anitua E, Andía I, Sánchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*. 2005;23(2):281-6.
- Aspelin P, Ekberg O, Thorsson O, Wilhelmsson M, Westlin N. Ultrasound examination of soft tissue injury of the lower limb in athletes. *Am J Sports Med*. 1992;20(5):601-3.

Barrett SL, Erredge SE. Growth factors for chronic plantar fasciitis? Podiatry Today. 2004; 17:37-42.

Bennell KL, Crossley K. Musculoskeletal injuries in track and field: incidence, distribution and risk factors. Aust J Sci Med Sport. 1996;28(3):69-75.

Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. Am J Surg. 1993;165(6):728-37.

Berghoff WJ, Pietrzak WS, Rhodes RD. Platelet-rich plasma application during closure following total knee arthroplasty. Orthopedics. 2006;29(7):590-8.

Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. Facial Plast Surg. 2002;18(1):27-33.

Bubnov R, Yevseenko V, Semenov I. Ultrasound guided injections of Platelets Rich Plasma for muscle injury in professional athletes: comparative study. Med Ultrason. 2013;15(2):101-5.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. J Periodontal Res. 2002;37(4):300-6.

Carreon LY, Glassman SD, Anekstein Y, Puno RM. Platelet gel (AGF) fails to increase fusion rates in instrumented posterolateral fusions. Spine (Phila Pa 1976). 2005;30(9):E243-6.

Cervelli V, Lucarini L, Spallone D, Brinci L, De Angelis B. Use of platelet rich plasma and hyaluronic acid on exposed tendons of the foot and ankle. J Wound Care. 2010; 19(5):186,188-90.

Chambers RL, McDermott JC. Molecular basis of skeletal muscle regeneration. Can J Appl Physiol. 1996;21(3):155-84.

Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. Am J Sports Med. 2005; 33:43-51.

Clebis NK, Natali MRM. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. *Rev Bras CiênMov.* 2001;9(4):47-53.

Cole BJ, Seroyer ST, Fllardo G, Bajaj S, Fortier A. Platelet-rich plasma where are we now and where are we going? *Sports Health.* 2010; 2(3):203-10.

Copland ST, Tipton JS, Fields KB. Evidence-based treatment of hamstring tears. *Curr Sports Med Rep.* 2009;8(6):308-14.

Cugat R, Carrillo JM, Serra I, Soler C. Articular cartilage defects reconstruction by plasmarich growth factors. In: Zansi S, Brittberg M, Marcacci M. Basic science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status and prospects. Bologna: Timeo Editore; 2006. p. 801-7.

De Carli A, Volpi P, Pelosini I, Ferretti A, Melegati G, Mossa L et al. New therapeutic approaches for management of sport-induced muscle strains. *Adv Ther.* 2009; 26(12):1072-83.

de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010; 303(2):144-9.

Del Rossi AJ, Cernaianu AC, Vertrees RA, Wacker CJ, Fuller SJ, Cilley Jr JH et al. Platelet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;100(2):281-6.

Dohan Ehrenfest D, Rasmuson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (LPRF). *Trends Biotechnol.* 2009; 27(3):158-67.

Edwards SG, Calandruccio JH. Autologous blood injection for refractory lateral epicondylitis. *J Hand Surg (Am).* 2003; 28(2):272-8.

Efeoglu C, Akcay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(11):1403-7.

Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118(6):147e-159e.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(6):1502-8.

Everts PA, Devilee RJ, Brown Mahoney C, Eeftinck-Schattenkerk M, Box HA, Knappe JT et al. Platelet gel and fibrin sealant reduce allogeneic blood transfusions in total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50(5):593-9.

Feng Y, Sun Y, Jia W, Zhang C. Platelet-rich plasma and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 2010; 32(5):635-42.

Fernandes TL, Pedrinelli A. Entendendo as bases da lesão muscular. *RBM*. 2011;68(3):17-23.

Fernandes TL, Pedrinelli A, Hernandez AJ. Dor na coxa e na perna. In: Nobrega A, editor. *Manual de medicina do esporte*. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 140-1.

Ferrero G, Fabbro E, Orlandi D, Martini C, Lacelli F, Serafini G, Silvestri E, Sconfienza LM. Ultrasound-guided injection of platelet-rich plasma in chronic Achilles and patellar tendinopathy. *J Ultrasound*. 2012; 15(4):260-6.

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(11):2259-71.

Galasso O, Mariconda M, Romano G, Capuano N, Romano L, Iannò B et al. Expandable intramedullary nailing and platelet rich plasma to treat long bone non-unions. *J Orthop Traumatol*. 2008; 9(3):129-34.

Gamradt SC, Rodeo SA, Warren RF. Platelet rich plasma in rotator cuff repair. *Tech Orthop*. 2007; 22:26-33.

Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty: an analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range of motion. *Int Orthop*. 2007;31(3):309-13.

Garrett WE Jr, Best TM. Anatomy, physiology, and mechanics of skeletal muscle. In: Simon SR, editor. Orthopaedic basic science. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994. p. 89-125.

Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*. 1999; 39(2):144-8.

Gentile P, Bottini DJ, Spallone D, Curcio BC, Cervelli V. Application of platelet-rich plasma in maxillofacial surgery: clinical evaluation. *J Craniofac Surg*. 2010;21(3):900-4.

Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion*. 1990;30(8):741-7.

Gigante A, Del Torto M, Manzotti S, Cianforlini M, Busilacchi A, Davidson PA et al. Platelet rich fibrin matrix effects on skeletal muscle lesions: an experimental study. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26(3):475-84.

Grote K, Lincoln TL, Gamble JG. Hip adductor injury in competitive swimmers. *Am J Sports Med*. 2008; 32(1):104-8.

Hamid MS, Mohamed Ali MR, Yusof A, George J. Platelet-rich plasma (PRP): an adjuvant to hasten hamstring muscle recovery. A randomized controlled trial protocol (ISRCTN66528592). *BMC Musculoskelet Disord*. 2012;13:138.

Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med*. 2010; 37(6):1135-42.

Han B, Woodell-May J, Ponticciello M, Yang Z, Nimni M. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *J Bone Joint Surg Am*. 2009; 91(6):1459-70.

Harris NL, Huffer WE, von Stade E, Larson AI, Phinney S, Purnell ML. The effect of platelet-rich plasma on normal soft tissues in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*. 2012; 94(9):786-93.

Hawkins D, Metheny J. Overuse injuries in youth sports: biomechanical considera-

tions. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(10):1701-7.

Haynesworth SE, Kadiyala S, Liang L, Thomas T, Bruder SP et al. Chemotactic and mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet rich plasma suggests a mechanism for enhancement of bone repair. In: 48th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society; 2002 feb 10-13; Dallas, Texas; 2002.

Hiramatsu T, Okamura T, Imai Y, Kurosawa H, Aoki M, Shin'oka T et al. Effects of autologous platelet concentrate reinfusion after open heart surgery in patients with congenital heart disease. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(4):1282-5.

Hootman M, Macera CA, Ainsworth BE, Martin M, Addy CL, Blair SN. Predictors of lower extremity injury among recreationally active adults. *Clin J Sport Med.* 2002; 12(2):99-106.

Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84(5):822-32.

Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest.* 1994; 93(2):586-99.

Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23(7):801-10.

Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Effects of early cryotherapy in experimental skeletal muscle injury. *Scand Med Sci Sports.* 1993;3:46-51.

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Aärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H et al. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21(2):317-31.

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005; 33:745-64.

Järvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med.* 1993;15(2):78-89.

Jennische E. Sequential immunohistochemical expression of IGF-I and the transferin receptor in regenerating rat muscle in vivo. *Acta Endocrinol Copenh.* 1989;121(5):733-8.

Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A et al. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol.* 2008;215(3):837-45.

Kalimo H, Rantanen J, Jarvinen M. Soft tissue injuries in sport. In: Jarvinen M. *Balliere's Clinical Orthopaedics.* London: Saunders; 1997:1-4.

Kaux JF, Croisier JL, Bruyère O, Rodriguez C, Daniel C, Godon B et al. Platelet-rich plasma (PRP) to treat chronic upper patellar tendinopathies. *Br J Sports Med.* 2013;47(10):e3.

Kennedy JC, Willis RB. The effects of local steroid injections on tendons: a biomechanical and microscopic correlative study. *Am J Sports Med.* 1976; 4(1):11-21.

Kettunen JA, Kujala UM, Kaprio J, Koskenvuo M, Sarna S. Lower-limb function among former elite male athletes. *Am J Sports Med.* 2001; 29:2-8.

Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol.* 2004;36(1):28-35.

J Cell Biol. 1986; 102(6):2318-23.

Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(1):86-94.

Knox P, Crooks S, Rimmer CS. Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots.

Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011; 19:516-27.

Kon E, Filardo G, Di Matteo B, Marcacci M. PRP for the treatment of cartilage pathology. *Open Orthop J.* 2013;7:120-8.

Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(3):297-300.

Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol.* 2002;73(2):198-205.

Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury: an immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* 1985;67(5):820-8.

Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.* 2002;10(5):336-40.

Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: part I-background and processing techniques. *J Oral Implantol.* 2001;27(1):38-42.

Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH et al. Effects of the platelet-derived growth factor / insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991; 62:710-6.

Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(1):229-37.

- Mandel MA. Minimal suture blepharoplasty: closure of incisions with autologous fibrin glue. *Aesthetic Plast Surg.* 1992;16(3):269-72.
- Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2001; 24(3):483-8.
- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10:225-8.
- Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J oral maxillofac surg.* 2004;62(4):489-96.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638-46.
- Matras H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. *Osterr Z Stomatol.* 1970;67(9):338-59.
- Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltext. *Vox Sang.* 2008; 94(3):202-8.
- Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82(1):131-7.
- Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration: a morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med.* 1999; 27(2):222-9.
- Messora MR, Nagata MJH, Furlaneto FAC, Deliberador TM, Melo LGN, Garcia VG. Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP): estudo experimental em coelhos. *RSBO.* 2009; 6(3):291-6.
- Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006;34(11):1774-8.

Murray MM, Spindler KP, Abreu E, Muller JA, Nedder A, Kelly M et al. Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*. 2007;25(1):81-91.

Nin JR, Gasque GM, Azcárate AV, Beola JD, Gonzalez MH. Has platelet-rich plasma any role in anterior cruciate ligament allograft healing? *Arthroscopy*. 2009; 25(11):1206-13.

Nogueira GB. Efeito do meloxicam e laser de baixa intensidade na terapêutica de lesões musculares induzidas em ratos. Campo Grande; 2012. [Dissertação - Mestrado – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

Orchard JW. Intrinsic and extrinsic risk factors for muscle strains in Australian football. *Am J Sports Med*. 2001;29(3):300-3.

Pacifici L, Casella F, Maggiore C. Plasma arricchito di piastrine (prp): metodi di estrazione e potenzialità d'uso. *Minerva Stomatol*. 2002; 51(7-8):341-50.

Pastre CM, Carvalho Filho G, Monteiro HL, Netto Jr J, Padovani CR. Lesões desportivas na elite do atletismo brasileiro: estudo a partir de morbidade referida. *Rev Bras Med Esporte*. 2005; 11(1):43-7.

Peerbooms JC, van Laar W, Faber F, Schuller HM, van der Hoeven H, Gosens T. Use of platelet rich plasma to treat plantar fasciitis: design of a multi centre randomized controlled trial. *BMC MusculoskeletDisord*. 2010; 11:69.

Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair: a pilot study. *DisabilRehabil*. 2008;30(20-22):1584-9.

Rizzi CF, Mauriz JL, Correa DSF, Moreira AJ, Zettler CG, Fillipin LI, Marroni NP et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers SurgMed*. 2006;38:704-13.

Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Surg*. 2001; 38(2):73-94.

Rolls A, George K. The relationship between hamstring muscle injuries and hamstring muscle length in young elite footballers. *PhysTherSport*. 2004; 5:179-87.

Sánchez M, Anitua E, Andia I. Application of autologous growth factors on skeletal muscle healing. In: 2nd World Congress on Regenerative Medicine. 2005 May 18-20; Leipzig, Germany; 2005.

Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007; 35(2):245-51.

Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Prado R, Muruzabal F, Andia I. Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology. *Arthroscopy*; 2010; 26(4):470-80.

Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35(10):1648-52.

Sánchez M, Fiz N, Azofra J, Usabiaga J, Aduriz Recalde E, Garcia Gutierrez A et al. a randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthroscopy*. 2012; 28:1070-8.

Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med*. 2011; 39(1):38-47.

Sene GL. Influência do laser de baixa intensidade nas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio submetido à lesão muscular por mecanismo de impacto [Dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2005.

Serraino GF, Dominijanni A, Jiritano F, Rossi M, Cuda A, Caroleo S et al. Platelet-rich plasma inside the sternotomy wound reduces the incidence of sternal wound infections. *Int Wound J*. 2013; May 21. doi: 10.1111/iwj.12087.

Simman R, Hoffmann A, Bohinc RJ, Peterson WC, Russ AJ. Role of platelet-rich

plasma in acceleration of bone fracture healing. *Ann Plast Surg.* 2008; 61:337-44.

Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(6):879-82.

Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop.* 2010; 34(4): 589-97.

Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994 Feb;52(2):161-5; discussion 166.

Taylor MA, Norman TL, Clovis NB, Blaha JD. The response of rabbit patellar tendons after autologous blood injection. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(1):70-3.

Taylor SA, Hannafin JA. Evaluation and management of elbow tendinopathy. *Sports Health.* 2012; 4(5):384-93.

Torres J, Tamimi F, Tresguerres IF, Alkhraisat MH, Khraisat A, Blanco L et al. Effect of combining platelet-rich plasma with anorganic bovine bone on vertical bone regeneration: early healing assessment in rabbit calvariae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010; 25(1):123-9.

Torricelli P, Fini M, Filardo G, Tschon M, Pischedda M, Pacorini A et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop.* 2011;35(10):1569-76.

Thorsson O, Hemdal B, Lilja B, Westlin N. The effect of external pressure on intramuscular blood flow at rest and after running. *Med Sci Sports Exerc.* 1987;19(5):469-73.

Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *Am J Sports Med.* 1998;26(2):172-6.

Tschon M, Fini M, Giardino R, Filardo G, Dallari D, Torricelli P et al. Lights and shadows concerning platelet products for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci*. 2011; 3:96-107.

van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *TissueEng*. 2006;12(11):3067-73.

Vaquerizo V, Plasencia MA, Arribas I, Seijas R, Padilla S, Orive G et al. Comparison of intra-articular injections of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus Durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *J Arthroscopic Related Surg*. 2013; 29(10):1635-43.

Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Rev Col Bras Cir*. 2006; 33(1):24-28.

Verrall GM, Slavotinek JP, Barnes PG, Fon GT, Spriggins AJ. Clinical risk factors for hamstring muscle strain injury: a prospective study with correlation of injury by magnetic resonance imaging. *Br J Sports Med*. 2001;35(6):435-9.

Villela DL, Santos VL. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors*. 2010; 28(2):111-6.

Wasterlain AS, Braun HJ, Harris AH, Kim HJ, Dragoo JL. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. *Am J Sports Med*. 2013;41(1):186-93.

Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004;34(4):665-71.

Weibrich G, Kleis WK. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res*. 2002a;13(4):437-43.

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002b;30(2):97-102.

Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(11):1294-9.

Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77(3):509-28.

Wright-Carpenter T, Klein P, Schäferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med.* 2004;25(8):588-93.

Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *Int J Sports Med.* 2004; 25(8):582-7.

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 334 do Pesquisador Marcelo Luiz Quarteiro referente ao projeto de pesquisa, **“O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 11 de agosto de 2011.


Dr^a Joice Stein
Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 6 de outubro de 2011

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187