



Artigo original

O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos[☆]



Marcelo Luiz Quarteiro^{*}, João Ricardo Filgueiras Tognini, Everton Lucas Flores de Oliveira e Izabelli Silveira

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 2 de junho de 2014

Aceito em 12 de setembro de 2014

On-line em 17 de janeiro de 2015

Palavras-chave:

Músculos/lesões

Plasma rico em plaquetas

Ratos

R E S U M O

Objetivo: A necessidade de opções terapêuticas para lesões musculares, cada vez mais frequentes entre os esportistas, fundamentou este estudo experimental, cujo objetivo foi avaliar os efeitos histológicos do plasma rico em plaquetas (PRP) no reparo do tecido muscular de ratos.

Métodos: O PRP foi obtido por dupla centrifugação do sangue de cinco animais. Em 30 ratos, foi produzido um trauma no terço médio do ventre do músculo gastrocnêmio de cada membro traseiro. Essas lesões não receberam tratamento em seis ratos (12 patas). Em 24 ratos, injeções intralesionais de soro fisiológico a 0,9% e de PRP foram aplicadas nas patas esquerdas e direitas, respectivamente. Amostras do tecido tratado e não tratado foram avaliadas histologicamente sete e 21 dias após os procedimentos.

Resultados: A quantidade de colágeno nas lesões tratadas com PRP foi significativamente menor do que a das demais lesões na avaliação feita sete dias após o procedimento, mas se equiparou à dos demais grupos na avaliação feita no 21º dia. Houve aumento significativo ($p < 0,001$) na quantidade de colágeno do sétimo para o 21º dia 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 com as lesões dos outros grupos de tratamento na avaliação feita sete dias após o procedimento; todavia, os aspectos morfológicos dessas lesões se mostraram similares ao das lesões não tratadas 21 dias após o procedimento.

Conclusão: O PRP promoveu completa restituição tecidual entre o sétimo e o 21º dia em lesões musculares experimentais.

© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

[☆] Trabalho feito no Laboratório de Fisiologia Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

^{*} Autor para correspondência.

E-mail: marceloquarteiro@terra.com.br (M.L. Quarteiro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2014.09.002>

0102-3616/© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

The effect of platelet-rich plasma on the repair of muscle injuries in rats

A B S T R A C T

Keywords:

Muscles/injuries
Platelet-rich plasma
Rats

Objective: The need for therapeutic options for muscle injuries, which are increasingly frequent among sports practitioners, was the motivation for this experimental study, which had the aim of evaluating the histological effects of platelet-rich plasma (PRP) on repairs to muscle tissues of rats.

Methods: PRP was obtained by means of double centrifugation of blood from five animals. In 30 rats, an injury was produced in the middle third of the belly of the gastrocnemius muscle of each hind limb. These injuries did not receive any treatment in six rats (12 legs). In 24 rats, 0.9% physiological serum was injected into the injury in the left leg and PRP into the injury in the right leg. Samples from the treated and untreated tissue were evaluated histologically seven and 21 days after the procedures.

Results: The quantity of collagen in the injuries treated with PRP was significantly lower than that in the other injuries, in the evaluation made seven days after the procedure, but it became equal to the other groups in the evaluation done on the 21st day. There was a significant increase ($p < 0.001$) in the quantity of collagen from the 7th to the 21st day in the injuries treated with PRP, but this was not seen in the injuries treated in other manners. The inflammatory process was shown to be more intense in the injuries treated with PRP than in the injuries of the other treatment groups, in the evaluation done seven days after the procedure. However, the morphological aspects of these injuries were seen to be similar to those of the untreated injuries, 21 days after the procedure.

Conclusion: PRP promoted complete tissue restitution between the 7th and 21st days in experimental muscle injuries.

© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Lesões musculares são definidas como alterações, morfológicas ou histoquímicas, que promovem disfunção do aparelho locomotor.¹ Podem ser causadas por dois mecanismos: os traumas diretos, como contusões e lacerações, e os traumas indiretos, como isquemia, denervação e estiramentos.²

Cerca de 30% das lesões diagnosticadas por médicos têm relações com o sistema muscular³ e a lesão muscular é um dos traumas mais comuns ocorridos na prática esportiva, causa de 10% a 55% de todas as lesões.² As lesões desportivas parecem ser resultado de exercícios feitos de maneira extenuante ou, ainda, inadvertida ou inapropriada. A prevalência e a incidência desses episódios são subestimadas devido à ausência de notificação no universo esportivo.⁴ Tem sido relatada incidência de lesões nos músculos isquiotibiais na ordem de 12% em jogadores de futebol,⁵ 50,9% em atletas velocistas⁶ e 42% em nadadores de peito.⁷

A depender da severidade e da localização da lesão, diferentes manejos terapêuticos são usados, desde o tratamento conservador e medicamentoso ao cirúrgico.⁸ Exceto para os casos de rupturas musculares completas, avulsões e miosite ossificante, o tratamento-padrão usado para lesões musculares agudas é repouso, proteção, gelo, compressão e elevação; além desses princípios, não existe consenso claro sobre o tratamento da lesão muscular aguda.⁹ Portanto, ainda permanecem questionamentos especialmente em relação aos efeitos e resultados de vários tratamentos comumente usados para estimular o processo de reparo do músculo.

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.¹⁰ É obtido da centrifugação do sangue periférico e a concentração de plaquetas deve idealmente ser superior a 338% da concentração do sangue periférico.¹¹ O PRP tem propriedades curativas atribuídas a concentrações aumentadas de fatores autólogos de crescimento tecidual e proteínas em nível celular. A expectativa é que esses fatores, quando introduzidos no local da lesão, aumentem o recrutamento, a proliferação e a diferenciação das células envolvidas na reparação tecidual e promovam o reparo acelerado e com melhor diferenciação tecidual.¹²

Diversos usos clínicos do PRP vêm sendo estudados, incluindo reparo de lesões condrais¹³ e tendíneas,¹⁴ reparo de lesões e regeneração óssea,¹⁵ tratamento de fascíte plantar¹⁶ e de úlceras crônicas em pé diabético.¹⁷ 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.¹⁸ Estudos tanto experimentais quanto clínicos vêm revelando os efeitos da injeção intralesional de PRP em lesões musculares e, de modo geral, os achados desses estudos reportam melhor regeneração muscular, aumento de neovascularização e redução de fibrose.¹⁹⁻²⁵

A se levar em conta a crescente incidência de lesões musculares e a necessidade de opções terapêuticas que promovam regeneração muscular mais rápida e eficazmente, este estudo experimental foi feito para verificação do efeito do PRP homólogo no reparo de lesões musculares decorrentes de impacto induzido em ratos, a partir da avaliação da deposição de colágeno e da análise morfológica microscópica

Tabela 1 – Quantificação de plaquetas ($10^3/uL$) 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

qualitativa do processo de reparação tecidual sete e 21 dias após tratamento.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética, sob o protocolo 334/2011. O experimento foi feito no laboratório, de abril a julho de 2012. Foram usados 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 um 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. O ambiente foi climatizado com temperatura de $22 \pm 3^\circ C$, 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.

Foram formados quatro grupos de estudo de maneira aleatória:

- 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.

Protocolo para produção da lesão experimental

Foram usados o mesmo aparelho e a mesma técnica para produção da lesão experimental descritos por Nogueira.²⁶ Para a feitura da lesão muscular, usou-se aparelho desenvolvido por Sene,²⁷ que consiste em duas hastes metálicas telescópicas ajustáveis, pelas quais é possível graduar a altura de 30 cm, e uma base plástica com área de 272,5 cm². 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. 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, para evitar desvios e oscilações do peso.

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

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

Preparo e aplicação do plasma rico em plaquetas

Por meio de punção cardíaca feita com agulha de $0,70 \times 25$ mm, marca BD (22gX1"), acoplada a uma seringa descartável de 20 ml Viet Jet[®] (Labor Import Comércio, Importação e Exportação Ltda., Osasco, SP, Brasil) contendo 1 mL 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. O sangue anticoagulado foi imediatamente submetido à contagem de células em aparelho automatizado Sysmex XE-2100D. Realizada a primeira centrifugação foi separado o plasma do concentrado de hemáceas. Na segunda centrifugação, eliminou-se a porção sobrenadante, de forma que restasse apenas aproximadamente 1 mL do centrifugado de maior peso. Essa fração denominamos de PRP ou concentrado de plaquetas. O PRP homogenizado e o plasma pobre em plaquetas foram submetidos a nova contagem automatizada de células, conforme demonstrado na [tabela 1](#).

Eutanásia

Após a coleta de sangue (Grupo 1) e dos períodos de sete e 21 dias após a lesão adotados 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 100 mg/ml. Após a dissecação e coleta do músculo para análise, o descarte dos animais foi feito por incineração em ambiente apropriado.

Formas 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%, as peças foram enviadas para análise histológica, ocasião em que receberam tratamento rotineiro com desidratação progressiva em álcool, inclusão em blocos de parafina, corte sagital e longitudinal de 5 μ m em micrótomo no terço central do ventre muscular, e as lâminas foram coradas com picrossirius red e hematoxilina eosina (HE). O exame das características histológicas e da quantidade de colágeno foi feito no Laboratório de Toxicologia e Plantas Medicinais da Universidade Anhanguera (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™. Esse sistema foi desenvolvido para análises morfométricas e subtração de imagens e pode ser usado para espécimes de escala macroscópica e microscópica. Existem vários sistemas de conversão de unidades, filtros de correção de imagens, inúmeros formatos de exportação e comunicação com outros programas. 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.

Os principais instrumentos e procedimentos do estudo se encontram representados na [figura 1](#).

Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Office Excel (2010) e a normalidade das amostras foi avaliada com o programa Bioestat 5.0. Os cálculos para comparação dos dados e a elaboração dos gráficos foram feitos com o programa GraphPadPrism 4.0. 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 feitas com análise de variância (Anova) e *post hoc* com o teste de Tukey nas amostras de distribuição normal e com a aplicação do teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* com o teste 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.

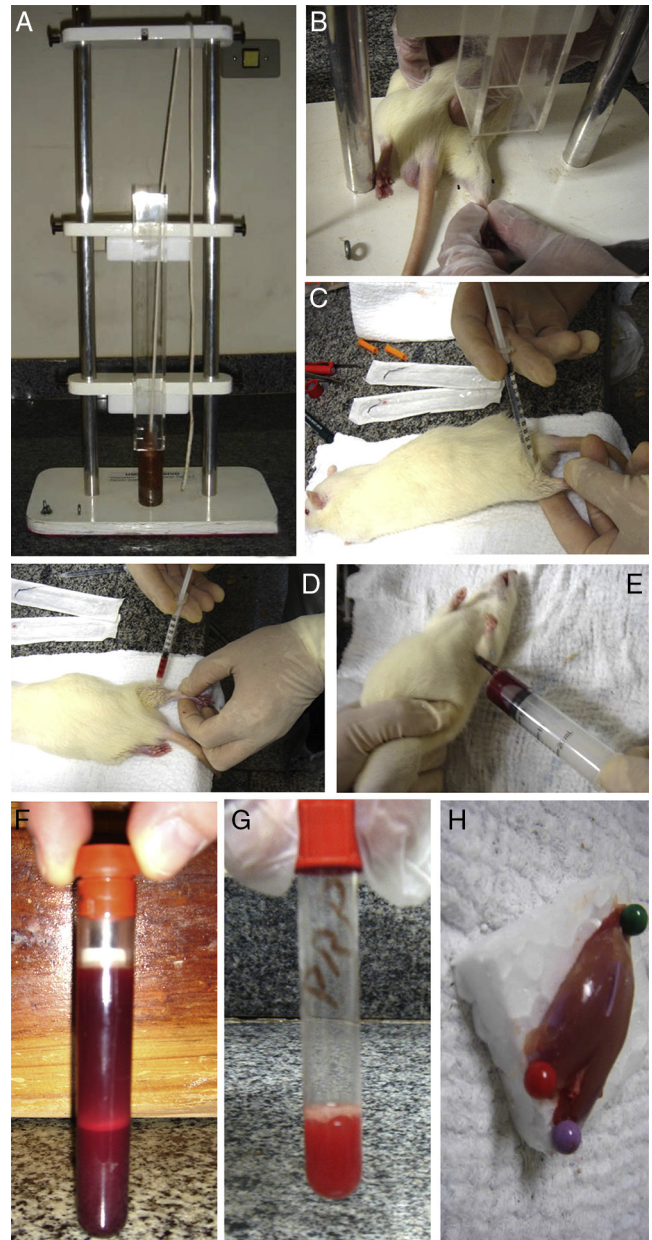


Figura 1 – (A) Aparelho usado para produção de lesão muscular em animais. (B) Posicionamento da carga liberada sobre cada membro dos animais. (C) Administração de SF na região posterior da pata esquerda dos animais. (D) Administração de PRP na região posterior da pata direita dos animais. (E) Punção cardíaca para obtenção de amostras de sangue para preparo do PRP. (F) Preparado que apresenta coluna de líquido com duas frações predominantes: plasma sobrenadante e concentrado de hemácias ao fundo, separadas por um creme leucocitário. (G) Preparado que contém apenas aproximadamente 1 mL do centrifugado de maior peso (PRP), após eliminação da porção sobrenadante. (H) Amostra do gastrocnêmio íntegro fixada em superfície sólida e acondicionada em formaldeído a 10% para análise histológica.

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

	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

Resultados

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 na [tabela 2](#). Na análise intragrupos, quando comparadas as contagens feitas 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 2 A e 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 ([fig. 2B](#)). Na análise intergrupos, na contagem feita 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 com os tratados com SF, mas não em comparação com o grupo controle. Já na contagem feita 21 dias após a lesão, não houve diferença entre os grupos com relação à quantidade média de fibras colágenas ([fig. 3](#)).

Com relação aos achados morfológicos, aos sete dias observou-se presença de macrófagos circunstanciais 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 ([fig. 4](#)). 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 ([fig. 5](#)). Já nos ratos tratados com SF, observaram-se miotubos, macrófagos e hemácias com aspecto normal ([fig. 6](#)). 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 ([figs. 5 e 6](#)). Nos ratos tratados com SF, observaram-se focos de macrófagos e alguma formação de miotubos ([fig. 7](#)).

Discussão

Há evidências de que fatores de crescimento exercem papel fundamental no processo de cicatrização dos tecidos;²⁸ 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, foi proposta técnica para a obtenção de altas concentrações de fatores de crescimento, por meio

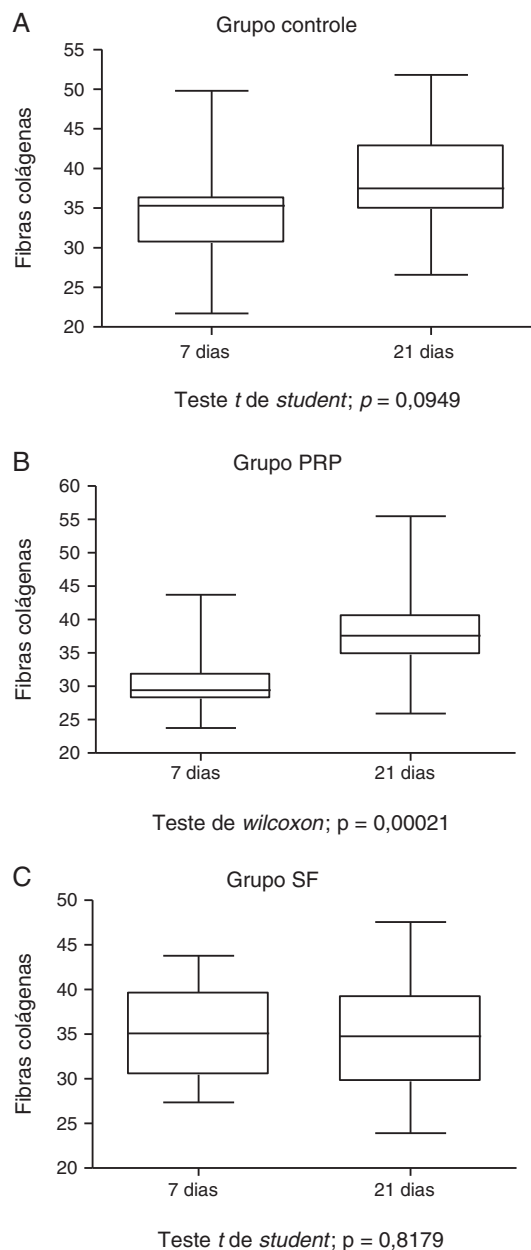


Figura 2 – Representação gráfica das médias e desvios padrão da quantidade de fibras colágenas sete e 21 dias após as lesões provocadas nos ratos do grupo-controle (A), tratados com PRP (B) e com SF (C).

do preparo de PRP autólogo.¹¹ Essa técnica consiste, basicamente, no sequestro e na concentração de plaquetas do plasma sanguíneo, que resulta em produto a ser aplicado na área da lesão em cicatrização.²⁹

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,^{14,19,24} 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 ser discutidas a partir

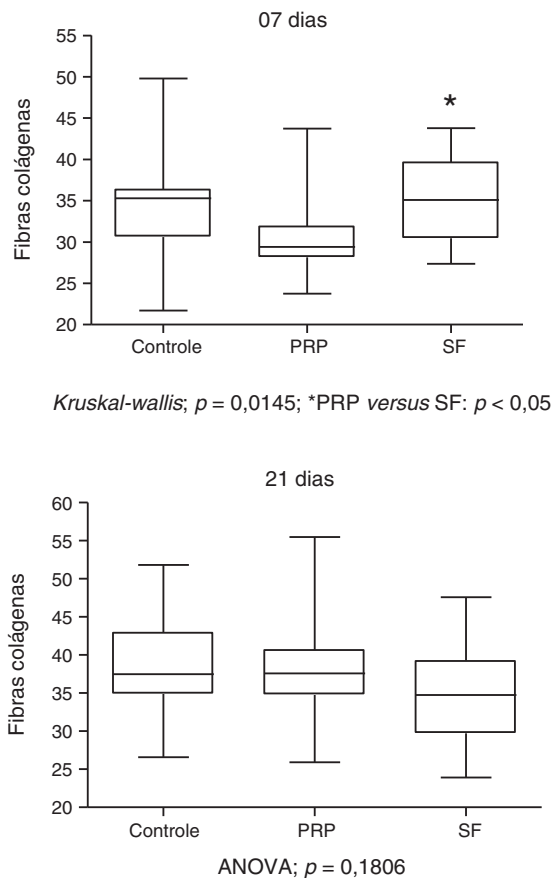


Figura 3 – Representação gráfica das médias e desvios padrão da quantidade de fibras colágenas sete e 21 dias após as lesões provocadas nos ratos dos três diferentes grupos de estudo.

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.¹⁹ observaram ativação acelerada de células-satélite após 30 a 48 horas da lesão e 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.²⁰ observaram tempo de regeneração 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.²² injetaram PRP ou SF em diferentes tecidos musculares de coelhos saudáveis (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 promove, inicialmente, a intensificação de processo inflamatório em lesões musculares.

Por outro lado, Gigante et al.²³ não observaram quaisquer diferenças relativas ao processo inflamatório quando

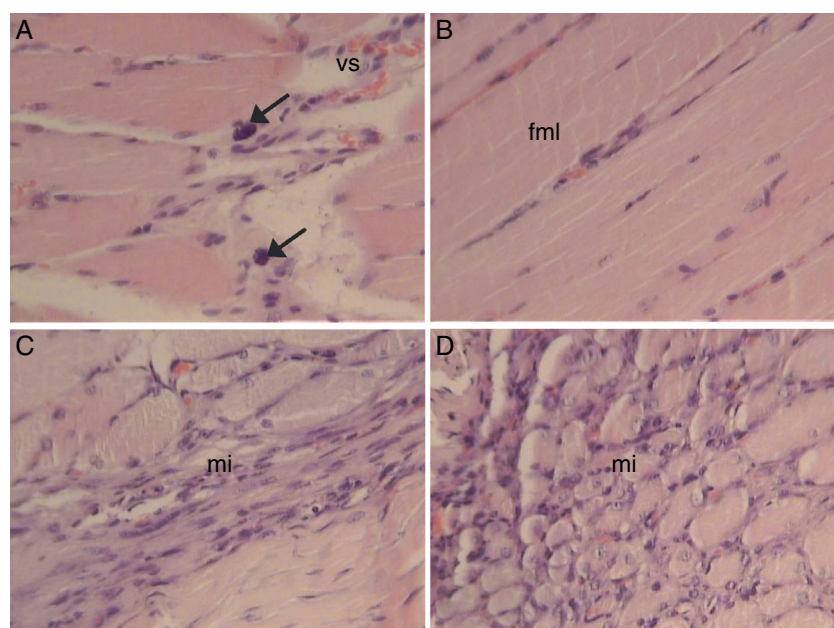


Figura 4 – Fotomicrografia de amostras do grupo controle aos sete dias. Observam-se macrófagos (setas), fibra muscular em corte longitudinal (fml), mioblastos (mi) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x.

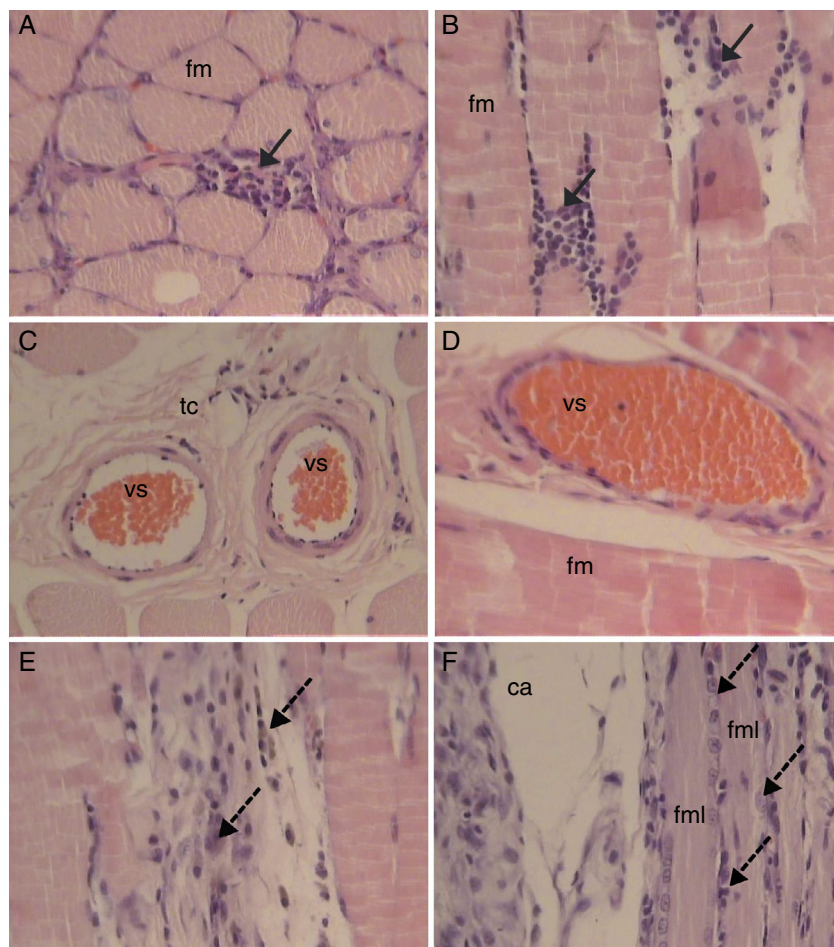


Figura 5 – Fotomicrografia de ratos tratados com PRP aos sete dias. Observam-se processo inflamatório por mononucleares (setas contínuas), fibra muscular em corte transversal (fm), fibra muscular em corte longitudinal (fml), miotubos (setas serrilhadas), vasos sanguíneos (vs), células adiposas (ca) e tecido conjuntivo (tc). HE/200x.

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.³⁰ 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. 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. Os protocolos

aparentemente mais seguros e eficazes se referem às técnicas de dupla centrifugação adotada para a feitura do presente estudo.²⁹

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.¹¹ Outros autores defendem a tese de 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.

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 feita no sétimo dia após a lesão, mas que houve aumento significativo

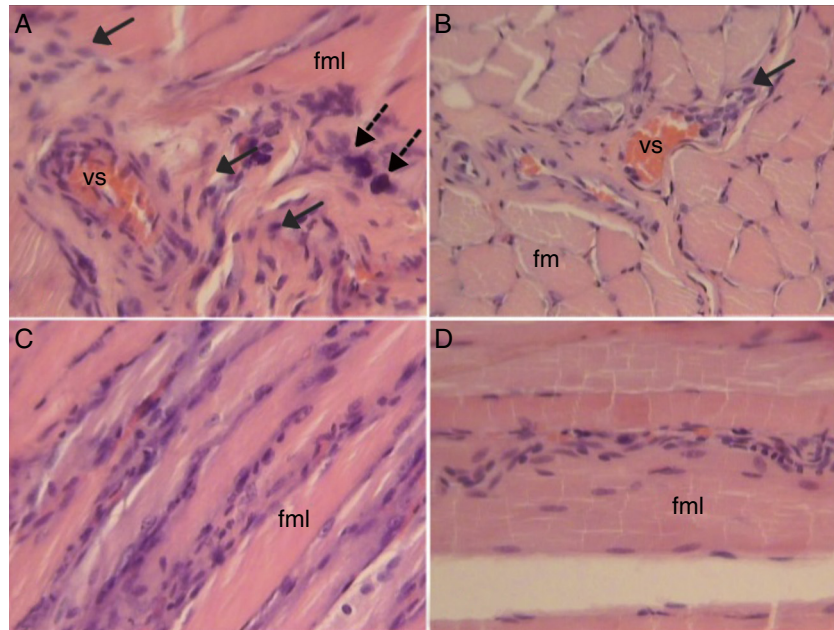


Figura 6 – Fotomicrografia de ratos tratados com SF aos sete dias. Observam-se fibra muscular em corte longitudinal (fml) e transversal (fm), miotubos (setas contínuas), macrófagos (setas serrilhadas) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x.

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. De fato, exceto nas lesões tratadas com SF, foi observada menor quantidade média de colágeno na avaliação feita no sétimo dia após a lesão do que naquela feita 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 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.²⁰ Os resultados, então, permitem agregar nova hipótese a ser testada, sugerem 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. 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. Neste estudo, pôde-se observar que a quantidade média de colágeno aumentou 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.

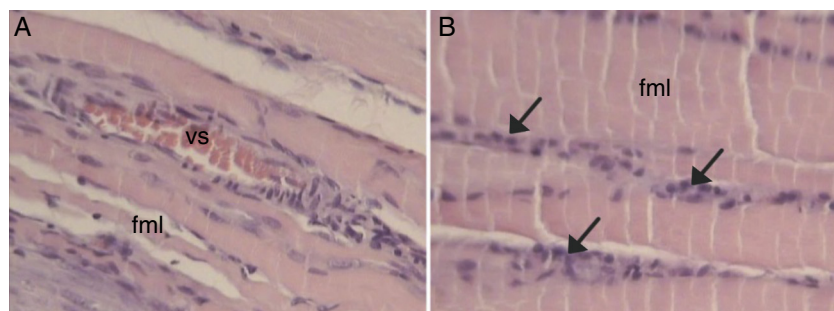


Figura 7 – Fotomicrografia de ratos controle aos 21 dias. Observam-se fibra muscular em corte longitudinal (fml), núcleos das fibras musculares (setas) e vasos sanguíneos (vs). HE/200x.

Nas lesões tratadas com PRP, o processo inflamatório se mostrou mais evidente do que nos demais grupos do estudo na avaliação feita 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, o que indica 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 fim do processo de reparo da lesão muscular, quando comparada com o 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.

Esta 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, o que sugere, talvez, melhor organização do processo de reparo muscular no grupo em que fora usado 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, o que sugere uma completa restituição tecidual.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Clebis NK, Natali MRM. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. *Rev Bras Ciên Mov.* 2001;9(4):47-53.
- Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745-64.
- Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006;38(7):704-13.
- Kettunen JA, Kujala UM, Kaprio J, Koskenvuo M, Sarna S. Lower-limb function among former elite male athletes. *Am J Sports Med.* 2001;29(1):2-8.
- Rolls A, George K. The relationship between hamstring muscle injuries and hamstring muscle length in young elite footballers. *Phys Ther Sport.* 2004;5(4):179-87.
- Pastre CM, Carvalho Filho G, Monteiro HL, Netto Junior 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.
- Grote K, Lincoln TL, Gamble JG. Hip adductor injury in competitive swimmers. *Am J Sports Med.* 2008;32(1):104-8.
- 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.
- 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(1):43-51.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Musculoskelet Disord.* 2010;11:69.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Waterlain 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.

26. Nogueira GB. Efeito do meloxicam e laser de baixa intensidade na terapêutica de lesões musculares induzidas em ratos. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2012, dissertação.
27. Sene GL. Influência do laser de baixa intensidade nas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio submetido à lesão muscular por mecanismo de impacto. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2005, dissertação.
28. 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(11):710-6.
29. 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.
30. 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. *Tissue Eng.* 2006;12(11):3067-73.