



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WAGNER MENNA PEREIRA

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)  
ASSOCIADO AO EXERCÍCIO FÍSICO EM LESÃO  
MUSCULAR E ARTICULAR EM RATOS WISTARS**

WAGNER MENNA PEREIRA

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)  
ASSOCIADO AO EXERCÍCIO FÍSICO EM LESÃO  
MUSCULAR E ARTICULAR EM RATOS WISTARS**

Tese de doutorado apresentada para banca de defesa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pereira, Wagner Menna.

Efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) associado ao exercício físico em lesão muscular e articular em ratos wistars / Wagner Menna Pereira. - Londrina, 2019. 116 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Medicina experimental - Tese. 2. Músculos - Ferimentos e lesões - Tese. 3. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Tese. 4. Rato como animal de laboratório - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

WAGNER MENNA PEREIRA

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) ASSOCIADO AO  
EXERCÍCIO FÍSICO EM LESÃO MUSCULAR E ARTICULAR EM  
RATOS WISTARS**

Tese de doutorado apresentada para banca de defesa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra Eduardo José de Araujo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Sergio Marques Borghi  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

---

Prof. Dr. Ivo Ilvan Kerppers  
Universidade Estadual do Centro-  
Oeste – UNICENTRO

Londrina, 29 de janeiro de 2019.

Dedico este trabalho à Deus,  
e a minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Senhor Jesus Cristo. Que fez e tem feito milagres em minha vida.

A minha esposa amada Caroline Campello Manfredini Menna, por ser meu pilar e minha companheira para todas as horas. E por estar me ajudando em todas as etapas da minha vida. Ao meu filho Lucas Manfredini Menna por entender que o papai esteve ausente, e as vezes que chorei de desânimo, sua existência me motivou. Todo meu esforço, também é por vocês.

A minha mãe que sempre foi minha incentivadora, me mostrando que eu sou capaz de ir mais longe. Você é meu exemplo de superação, eu te amo.

Ao meu orientador Prof. Wander Rogério Pavanelli agradeço profundamente por aceitar-me como seu aluno de doutorado e agradeço por acreditar em mim. Obrigado por ter sido compreensivo nos momentos que pensei em desistir, e por não me deixar fazer apenas o que eu posso, mas sim dar meu melhor, muito além do que eu imaginava ser capaz.

Agradeço aos demais professores e alunos, enfim, colegas do Laboratório de Imunoparasitologia das doenças negligenciadas e Câncer, especialmente a Milena Menegazzo e a Fernanda Tomiotto, pelo auxílio e disposição no desenvolver da pesquisa.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Carolina Panis, docente da UNIOESTE, de Francisco Beltrão, pelo auxílio e realização das técnicas de imunohistoquímica, e toda a disposição na análise, compreensão e discussão dos dados.

À equipe do Laboratório de Neuroanatomia e Neurofisiologia, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ivo Ilvan Kerppers, pela permissão e auxílio prestado durante todo o desenvolver do trabalho, e principalmente a pessoa do Prof. Ivo Ilvan Kerppers, por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. Guilherme Ribas Taques, pelo auxílio na leitura, identificação e fotografias das lâminas de Hematoxilina e Eosina.

Agradeço ao meu grande amigo irmão Luiz Alfredo Braun Ferreira, pelo companheirismo, motivação e ajuda. E a Prof. Luciana Erzinger Alves de Camargo, pelas contribuições ao longo da metodologia do trabalho!

Também aos membros da banca avaliadora por terem dispendido tempo e dedicação na leitura bem como nas correções e no apontamento das sugestões.

E finalizo os agradecimentos, honrando a Faculdade Guairacá (SESG) e a Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), por todo auxílio e compreensão.

“Filho meu, se aceitares as minhas palavras, e  
esconderes contigo os meus mandamentos;  
Para fazeres o teu ouvido atento à sabedoria; e  
inclinares o teu coração ao entendimento;  
Sim, se clamares por discernimento, e por  
entendimento alçares a tua voz;  
Se como a prata o buscares e como a tesouros  
escondidos o procurares;  
Então entenderás o temor do Senhor, e acharás  
o conhecimento de Deus;  
Porque o Senhor dá a sabedoria; da sua boca é  
que vem o conhecimento e o entendimento;  
Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos,  
e escudo para os que caminham na sinceridade;

Provérbios 2:1-7

PEREIRA, W. M. **Efeito do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) associado ao exercício físico em lesões musculares e articular.** 2019. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

**Introdução:** O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é uma técnica altamente utilizada em procedimentos biológicos, por gerar fatores de crescimento que aceleram o processo de reparo tecidual em lesões articulares e musculares. A realização de exercício físico (EXE) atualmente é a técnica mais utilizada na área de reabilitação, para acelerar o processo de reparo das lesões e devolver a capacidade funcional das articulações e dos músculos. O presente estudo, teve como objetivo analisar o efeito biológico da terapia com PRP, Exercício (EXE) ou PRP+EXE em lesão muscular e articular através da análise da presença de polimorfonucleares e mononucleares, caracterizar a deposição de colágeno e avaliar a produção de citocinas nos modelos de lesões induzidas em ratos, nas fases aguda (3 dias) e tardia (14 dias). **Materiais e Métodos:** Foram incluídos 80 ratos wistars, divididos em grupos controle (n=20), PRP (n=20), EXE (n=20) ou PRP+EXE (n=20). O PRP foi obtido por centrifugação do sangue autólogo, e inserido imediatamente no local das lesões articulares e musculares. A lesão articular foi induzida pela aplicação de Adjuvante de Freud, e a lesão muscular foi induzida por mecanismo traumático. A realização do exercício físico se deu em esteira ergométrica adaptada, com duração de 5 minutos, 1 vez por dia, todos os dias em velocidade de 2cm/seg. **Resultados:** Para a lesão muscular na fase aguda (3 dias) houve uma redução de cNOS em todos os grupos tratados, aumento de NFkB e VEGF no tratamento isolado com PRP e no tratamento isolado com EXE. A associação de PRP+EXE reduziu IL-4, IFN e TNFa. Já na fase tardia (14 dias), houve diminuição de VEGF em todos os grupos tratados, mas somente o grupo EXE foi capaz de diminuir cNOS. Os grupos PRP isolado e PRP+EXE aumentaram IL-10 e NFkB e somente o grupo associação de PRP+EXE foi capaz de reduzir IL-4 e TGFb1. Em relação a deposição de colágeno, todos os tratamentos foram efetivos em aumentar a quantidade de fibras de colágeno maduro no 14o dia após a lesão em relação ao controle no 3o dia pós lesão. Na lesão articular na fase aguda (3 dias), houve redução de polimorfonucleares nos grupos EXE e associação entre PRP+EXE. Além disso, todos os grupos tratados na fase aguda reduziram NFkB, TGFb1 e VEGF. Já na fase tardia (14 dias) o tratamento com PRP aumentou VEGF, enquanto que o PRP isolado aumentou NFkB e diminuiu a quantidade de células mononucleares assim como a associação PRP+EXE que induziu o aumento de IL-10. **Conclusão:** Tanto na lesão muscular quanto na lesão articular todos os tratamentos induziram redução de infiltrado inflamatório diminuindo a hemorragia na fase inicial. Já na fase tardia os tratamentos apresentaram melhor resposta cicatricial no músculo do que na articulação. A associação PRP+EXE demonstrou melhores resultados na produção de citocinas em ambas as lesões induzidas.

**Palavras-chave:** Plasma rico em plaquetas. Fatores de crescimento. Reparo articular. Reparo muscular. Exercício físico.

PEREIRA, W. M. **Effect of Plaque Rich Plasma (PRP) associated with physical exercise on muscle and joint lesions.** 2019. 116 p. Thesis (Doctorate degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

**Introduction:** Platelet-Rich Plasma (PRP) is a highly used technique for biological procedures it generates growth factors that accelerate the tissue repair process in joint and muscle injury. Physical exercise (EXE) is currently the most used technique in rehabilitation, in order to accelerate the process of injuries repair and restore joints and muscle functional capacity. The purpose of the study was to evaluate the biological effect of PRP therapy, EXE or PRP + EXE in a muscular and joint injury through the analysis of the presence of polymorphonuclear and mononuclear cells, distinguish the collagen deposition and evaluate the cytokines production in rat's induced injuries model, in acute (3 days) and late (14 days) phases. **Materials and Methods:** Were used 80 wistars rats, divided into control groups (n = 20), PRP (n = 20), EXE (n = 20) or PRP+EXE (n = 20). PRP was obtained by centrifugation of autologous blood, and injected immediately at the site of joint and muscle injuries. The joint injury was induced by application of Freud's Adjuvant, and the muscle injury was induced by a traumatic mechanism. Physical exercise was performed in an adapted treadmill for 5 minutes, once a day, every day at a speed of 2cm/sec. **Results:** In acute muscle injury (3 days) there was reduction of cNOS in all treated groups, increase of NFkB and VEGF in isolated treatment with PRP and in isolated treatment with EXE. The association of PRP+EXE reduced IL-4, IFN, and TNF. In the late phase (14 days), there was a decrease in VEGF in all treated groups, but only the EXE group was able to decrease cNOS. The isolated PRP and PRP + EXE groups had an increased in IL-10 and NFkB and only the PRP + EXE association group was able to reduce IL-4 and TGF1. Relating to collagen deposition, all treatments were effective in increasing the amount of mature collagen fibers 14th day after injury compared to the control on the 3rd day after injury In the acute injury phase (3 days), there was reduction of polymorphonuclear cells in EXE and PRP + EXE groups. Futhermore, all groups treated in acute phase reduced NFkB, TGF1 and VEGF. In late phase (14 days) PRP treatment increased VEGF, whereas isolated PRP increased NFkB and decreased the amount of mononuclear cells, as well as the PRP+EXE association induced increase in IL-10. **Conclusion:** In both injury muscle and joint, all treatments induced reduction of inflammatory infiltrate, reducing hemorrhage in the initial phase. In the late phase, the treatments had better cicatricial response in the muscle than in the joint. The association PRP+EXE showed better results in the production of cytokines in both induced lesions.

**Keywords:** Platelet-rich in plasma (PRP). Growth factors. Joint repair. Muscle repair. Physical exercise.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Figura 1.</b>  | Cascata de coagulação .....  | 16  |
| <b>Figura 2.</b>  | Preparo e aplicação do plasma rico em plaquetas (PRP). .....             | 19  |
| <b>Figura 3.</b>  | Organograma das etapas do processo de revisão da literatura .....        | 29  |
| <b>Figura 4.</b>  | Mecanismo de ação das plaquetas .....                                    | 31  |
| <b>Figura 5.</b>  | Fluxograma da alocação de animais para lesão muscular.....               | 52  |
| <b>Figura 6.</b>  | Procedimento de indução de lesão muscular em ratos.....                  | 53  |
| <b>Figura 7.</b>  | Realização de exercício na esteira ergométrica adaptada para ratos ..... | 54  |
| <b>Figura 8.</b>  | Infiltrado polimorfonuclear e mononuclear do músculo de ratos .....      | 60  |
| <b>Figura 9.</b>  | Citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e TGFb1 .....                   | 62  |
| <b>Figura 10.</b> | Citocinas pró-inflamatórias IFNg, IL-1 e TNFa .....                      | 64  |
| <b>Figura 11.</b> | Expressão das proteínas NFkB, VEGF e cNOS no 3o dia.....                 | 65  |
| <b>Figura 12.</b> | Expressão das proteínas NFkB, VEGF e cNOS no 14o dia.....                | 67  |
| <b>Figura 13.</b> | Quantidade de colágeno maduro no músculo.....                            | 68  |
| <b>Figura 14.</b> | Fotografias com coloração picrossírius do músculo .....                  | 69  |
| <b>Figura 15.</b> | Fluxograma da alocação de animais para lesão articula.....               | r84 |
| <b>Figura 16.</b> | Indução da lesão articular em ratos .....                                | 86  |
| <b>Figura 17.</b> | Realização de exercício na esteira adaptada para ratos.....              | 87  |
| <b>Figura 18.</b> | Infiltrado polimorfonucleares e mononucleares da articulação.....        | 93  |
| <b>Figura 19.</b> | Citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 .....                          | 94  |
| <b>Figura 20.</b> | Citocinas pró-inflamatórias IL-1, IFNg e TNF- $\alpha$ .....             | 95  |
| <b>Figura 21.</b> | Expressão das proteínas NFkB, TGFb1, VEGF e cNOS no 3o dia .....         | 97  |
| <b>Figura 22.</b> | Expressão das proteínas NFkB, TGFb1, VEGF e cNOS no 14o dia .....        | 98  |
| <b>Figura 23.</b> | Quantidade de colágeno maduro na articulação.....                        | 99  |
| <b>Figura 24.</b> | Fotografias com coloração picrossírius da articulação.....               | 100 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Quadro 1.</b> | Dados dos trabalhos elegíveis obtidos a partir do levantamento bibliográfico e aspectos relevantes dos trabalhos analisados ..... | 31 |
| <b>Quadro 2.</b> | Leituras microscópicas quantitativa de polimorfonucleares, e mononucleares musculares .....                                       | 58 |
| <b>Quadro 3.</b> | Leituras microscópicas quantitativa de polimorfonucleares e mononucleares articulares .....                                       | 91 |
| <b>Tabela 1.</b> | Fatores de crescimento plaquetários e suas respectivas funções .....  | 37 |
| <b>Tabela 2.</b> | Quantificação do nível inflamatório da articulação lesionada, realizada pelo analisador .....                                     | 55 |
| <b>Tabela 3.</b> | Quantificação do nível inflamatório do músculo lesionado, realizada pelo analisador .....   | 88 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |  |
|---------------|--|
| bFGF          | Fator de crescimento básico de fibroblasto             |
| CEUA          | Comitê de ética no uso de animais                      |
| CONCEA        | Conselho nacional de controle de experimentação animal |
| DAB           | Diaminobenzina   |
| ECGF          | Fator de crescimento celular epitelial                 |
| EXE           | Exercício  |
| FP4           | Fator plaquetário 4                                    |
| H&E           | Hematoxilina e Eosina                                  |
| IFNg          | Interferon gama  |
| IGF           | Fator de crescimento insulínico                        |
| IHC           | Imunohistoquímica                                      |
| IL-10         | Interleucina 10  |
| IL-4          | Interleucina 4   |
| IL1           | Interleucina 1   |
| mg            | Miligrama  |
| ml            | Mililitros   |
| N             | Newton   |
| NF-kB         | Fator nuclear kappa B                                  |
| PBS           | Tampão fosfato salino                                  |
| PDAF          | Fator angiogênico derivado de plaqueta                 |
| PDEGF         | Fator de crescimento epitelial derivado de plaquetas   |
| PDGF          | Fator de crescimento derivado de plaquetas             |
| PRP           | Plasma rico em plaquetas                               |
| RPM           | rotações por minuto                                    |
| TGF $\beta$ 1 | Fator de crescimento tumoral- $\beta$ 1                |
| TNF-a         | Fator de necrose tumoral-a                             |
| VEGF          | Fator de crescimento do endotélio vascular             |
| $\mu$ l       | Microlitros  |
| $\mu$ m       | Micrometros  |
| cNOS          | Óxido nítrico sintase constitutiva                     |

## SUMÁRIO

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>1.</b>  | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>15</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>O Plasma Rico em Plaquetas (PRP)</b> .....  | <b>15</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Fases do processo inflamatório</b> .....  | <b>17</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Obtenção e centrifugação do plasma rico em plaquetas</b> .....  | <b>18</b>  |
| <b>1.4</b> | <b>Tempo de aplicação e de atuação do PRP</b> .....  | <b>20</b>  |
| <b>1.5</b> | <b>Composição e mecanismos de reparo do musculo e da articulação</b> .....   | <b>21</b>  |
| <b>1.6</b> | <b>O Exercício Físico</b> .....  | <b>21</b>  |
| <b>2.</b>  | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>24</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo Geral</b> .....  | <b>24</b>  |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos Específicos</b> .....   | <b>24</b>  |
| <b>3.</b>  | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>25</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>ARTIGO 1: REVISÃO DA LITERATURA – PLASMA RICO EM PLAQUETAS – PRP: PAPEL DO REPARO DAS LESÕES MUSCULARES E ARTICULARES</b> .....                       | <b>26</b>  |
| <b>4.2</b> | <b>ARTIGO 2: EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) ATENUA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM LESÃO MUSCULAR DE RATOS?</b> .....           | <b>47</b>  |
| <b>4.3</b> | <b>ARTIGO 3: PERFIL DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM LESÃO ARTICULAR DE RATOS SOB APLICAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E DO EXERCÍCIO FÍSICO</b> ..... | <b>79</b>  |
| <b>4.</b>  | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>110</b> |
| <b>5.</b>  | <b>REFERENCIAS</b> .....   | <b>111</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto do sangue preferencialmente autólogo responsável por promover forte estímulo ao reparo tecidual na expectativa de acelerar o processo de cicatrização. Trata-se de uma biotecnologia com a proposta de explorar o potencial aumentado de liberação de fatores de crescimento, aplicado de forma direta em tecidos biológicos uma vez que possui uma concentração plaquetária, leucocitária e de fatores associados à coagulação superior em média 338% ao plasma sanguíneo (QUARTEIRO et al., 2015).

A insatisfação das terapias convencionais em promover de forma eficaz e funcional a cicatrização contribuem para impulsionar a utilização do PRP em meio científico. Em clínicas ortopédicas e na medicina esportiva especialmente para as lesões mioarticulares, o objetivo final das intervenções clínicas frente as lesões, tem como objetivo o retorno rápido, seguro e funcional à prática de atividades físicas. Dentro desta expectativa o PRP é utilizado e aplicado como auxiliar no tratamento de diversas estruturas biológicas tais como os tendões, ossos, músculos e articulações (CHANG et al., 2018; WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016).

As plaquetas são fragmentos de megacariócitos originadas da medula óssea e graças à sua função hemostática e ao amplo conteúdo proteico presente em seus grânulos de secreção (grânulos densos, lisossomas e principalmente grânulos  $\alpha$ ), citocinas e fatores de crescimento, são capazes de agir como reguladores da inflamação, angiogênese, migração celular e proliferação (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). Estão relacionadas com a cicatrização de feridas e reparação de vasos sanguíneos, são normalmente conhecidas pelo seu papel fundamental na homeostase inflamatória, pois atuam na adesão da membrana celular, agregação e formação de coágulos. Devido a sua capacidade de liberar inúmeras proteínas, as plaquetas também possuem papel fundamental na cicatrização participando ativamente nos processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação e crescimento de células mesenquimatosas pluripotentes, além de produzir através de mediadores a matriz extracelular as plaquetas começam a secretar ativamente essas substâncias e iniciam a desgranulação, aproximadamente 10 minutos após a



alinhamento celular (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). Dentre as estruturas alvo da utilização do PRP cita-se o tratamento nas lesões ligamentares (CHANG et al., 2018), musculares (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017), articulares e cartilaginosas (PALACIO et al., 2016), epiteliais (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010) e tendinosas (KNOP; DE PAULA; FULLER, 2016a).

## **1.2 Fases do processo inflamatório**

O processo de cicatrização é um processo dinâmico e coordenado de reparo tecidual tipicamente dividido em quatro fases sobrepostas: hemorrágica, inflamatória, proliferativa e fase de remodelação celular, nas quais há o envolvimento de diversas populações de células residentes e migratórias, matriz extracelular e a ação de mediadores solúveis como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que promovem a migração celular, proliferação e diferenciação essenciais para o reparo tecidual (COŞKUN et al., 2011; GREAVES et al., 2013). Dentre as células que fazem parte deste processo, estão neutrófilos, plasmócitos, linfócitos T e principalmente os macrófagos, responsáveis por remover detritos celulares, matriz danificada e combater o agente agressor (TATLER et al., 2011).

Durante a fase hemorrágica e inflamatória, ocorre a ativação da cascata de coagulação que consiste em uma agregação de trombócitos e plaquetas em uma rede de fibrina, contando com a ação de fatores específicos através da ativação e agregação desses elementos formam o tecido de granulação (SCHIPPINGER et al., 2015). Nesta fase, além das plaquetas atuarem no restabelecimento da homeostase e formarem uma barreira contra a invasão de microrganismos, ocorre a degranulação das plaquetas, com liberação de serotonina, histamina e fatores de crescimento que aumentam a permeabilidade capilar tornando a lesão, o local para o ancoramento inicial da chegada de diversos tipos celulares como neutrófilos, leucócitos, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos (GONZALEZ et al., 2016).

No final da fase inflamatória da cicatrização, ocorre uma mudança no perfil imunológico no local da lesão caracterizado pela transição para um estado funcionalmente e fenotipicamente anti-inflamatório, principalmente pela presença de macrófagos alternativamente ativados chamados M2 que secretam citocinas e fatores de crescimento que promovem a síntese e contração da matriz extra celular

(GREAVES et al., 2013; HAMID; YUSOF; MOHAMED ALI, 2014). Esses fatores de crescimento vão estimular o início da fase proliferativa cujo objetivo é diminuir a área do tecido lesionado por contração e fibroplasia, estabelecendo uma barreira epitelial viável para ativar os queratinócitos. Esta etapa é responsável pelo fechamento da própria lesão que inclui angiogênese e reepitelização (GONZALEZ et al., 2016).

Pela produção e ação de VEGF por plaquetas, macrófagos e fibroblastos ocorre o recrutamento de fibroblastos de tecidos não lesados circundantes e a formação de novos vasos sanguíneos devido à migração de células endoteliais (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). Fibroblastos ativados são responsáveis pela secreção de uma matriz extracelular contendo níveis aumentados de colágeno imaturo tipo III (GONZALEZ et al., 2016). Nesta fase, o tampão de fibrina começa a ser substituído por tecido de granulação formado pelo aumento da proliferação fibroblástica, biossíntese colágena e elástica, que cria uma rede extracelular tridimensional de tecido conjuntivo, iniciando o processo de fechamento da lesão (HERMETO et al., 2012; HASAN et al., 2015).

Na última fase do processo de reparo, ocorre a remodelação, cujo objetivo é alcançar a máxima resistência à tração por meio de reorganização, degradação e ressíntese da matriz extracelular (GONZALEZ et al., 2016). Nessa fase final ocorre a formação de ligações cruzadas entre moléculas de colágeno com outras moléculas de proteínas aumentando a resistência à tração da cicatriz madura (DUFFIELD et al. 2013). Além disso, ocorre o amadurecimento dos elementos com profundas alterações na matriz extracelular e resolução da inflamação inicial, convertendo colágeno tipo III imaturo em colágeno tipo I maduro, propiciando maior mobilidade e funcionalidade tecidual, com melhor alinhamento de célula cicatricial, tornando assim a fibra lesada e cicatrizada, o mais semelhante da célula original (WYNN; RAMALINGAM, 2012; CUNHA et al., 2014).

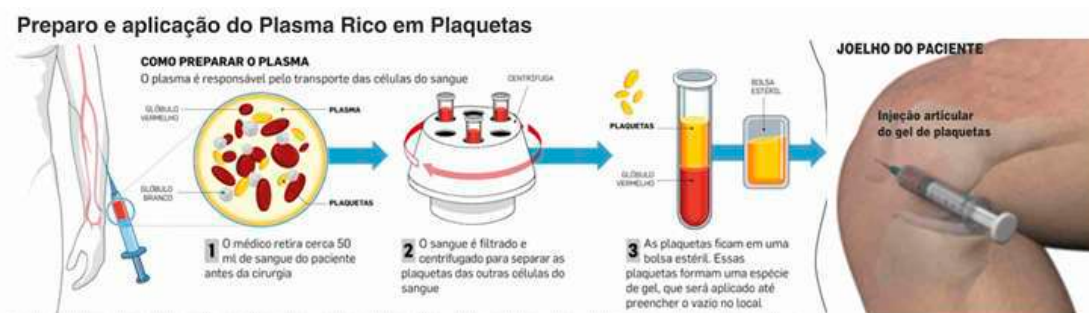
## **1.2 Obtenção e centrifugação do plasma rico em plaquetas**

O método mais utilizado para obtenção do PRP é basicamente obtido através da punção do sangue autólogo, como ilustrado na figura 2. A quantidade de volume puncionado em humanos, é de aproximadamente 10 ml (GUERREIRO et al. 2015), e de aproximadamente 1 ml em ratos (PRESTES et al. 2012). O material coletado é centrifugação em alta velocidade para separação dos seus componentes e concentrar

as plaquetas acima dos níveis basais. Protocolos utilizados atualmente optam por uma centrifugação (KNOP; DE PAULA; FULLER, 2016a), ou repetidas centrifugações (SAUCEDO et al. 2012), para separar o sangue total em 3 camadas: uma camada superior de plasma, uma camada leucocitária média, localizada no intermeio do centrifugado, e a camada inferior de eritrócitos (WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016).

Quarteiro et al. (2015) realizaram dupla centrifugação ao analisarem o efeito do PRP no reparo da lesão do músculo gastrocnêmico em ratos. Os autores observaram que a primeira centrifugação serve para separar o plasma do concentrado de hemácias, e que a segunda elimina a porção sobrenadante, separando apenas o centrifugado de plaquetas mais pesado, denominado pelo autor como concentrado intenso de plaquetas. Segundo os autores supra citados, a justificativa para o uso de uma ou repetidas centrifugações é embasado no potencial do PRP de suprir e liberar quantidades ainda maiores de fatores de crescimento e citocinas, potencializando uma ação regenerativa e de reparo que aumenta a cura e promove a cicatrização.

Outro aspecto primordial é a velocidade de rotação utilizada na centrifugação. Diferentes trabalhos apresentam rotações variando de 1200 a 3200 rpm, porém as rotações médias de 1800 rpm são as mais utilizadas (WASTERLAIN et al., 2013a). Rotações mais baixas notavelmente prejudicam menos a integridade das plaquetas, e rotações em velocidades mais elevadas proporcionam um alto teor concentrado de plaquetas, podendo prejudicar a estrutura plaquetária (QUARTEIRO et al., 2015). O planejamento da velocidade da centrifugação se faz relevante, pois a integridade plaquetária é importante para que os fatores de crescimento sejam liberados com efetividade. De fato, é sabido que a reação de liberação do conteúdo dos grânulos ocorre sem lise celular, com a manutenção íntegra das plaquetas, havendo apenas mudanças nas suas características (COLE et al. 2017).



**Figura 2.** Preparo e aplicação do Plasma Rico em Plaquetas (KNOP; DE PAULA; FULLER, 2016b).

#### 1.4 Tempo de aplicação e de atuação do PRP

A padronização dos prazos para implantação do concentrado plaquetário no local lesionado é divergente na literatura e algumas evidências comprovam a eficácia da aplicação no momento imediato da lesão ou o mais próximo do momento lesivo (GUEDES; MARIA; SERPA, 2011; SILVA; CARMONA; REZENDE, 2012). Porém, há controvérsias em relação ao prazo exato em que o reparo tecidual realmente ocorra e o mecanismo de ação dos fatores de crescimento liberados a partir da aplicação efetivamente se conclua. Sabe-se que o tamanho da área lesionada (KNOP; DE PAULA; FULLER, 2016a), e o tempo de evolução das lesões são fundamentais para o sucesso da terapia (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). Em seres humanos ou em ratos é difícil padronizar o prazo ideal para ocorrência total do reparo e da regeneração dos tecidos (WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016). De fato, diante de um processo inflamatório a atuação do PRP proporciona homeostasia local influenciando diretamente a cascata de inflamação e iniciando mais precocemente a recuperação do tecido lesionado (CUNHA et al., 2014; DENAPOLI et al., 2016)

A maior parte da secreção de fatores de crescimento ocorre na primeira hora pós lesão (GONZALEZ et al., 2016), apesar de ocorrer liberação contínua durante todo o período de viabilidade das plaquetas. Tais processos estariam relacionados com a ação aguda do PRP em evitar maiores danos ao tecido nas primeiras horas e combatendo a hemorragia tecidual local pós lesão (CRÓNICAS, 2016). Portanto, o tempo ideal de aplicação do PRP seria imediatamente após a lesão até o prazo máximo de 24 horas (WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016), nesse período como já citado anteriormente, as plaquetas através dos seus grânulos densos, secretam íons cálcio, histamina, serotonina e dopamina, que terão influencia na inflamação através da indução da síntese de interleucinas e quimiocinas (MANDUCA; STRAUB, 2017).

Por fim, as plaquetas contém grânulos lisossômicos que podem secretar hidrolases ácidas, elastases e provavelmente outras moléculas ainda mal caracterizadas, cujo papel no processo de cicatrização de tecidos lesionados não deve ser subestimado, e que ocorrem em um período mais crônico da ação plaquetária, entre 4 a 12 semanas após a aplicação do concentrado plaquetário (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017; PRESTES et al., 2012).

## **1.5 Composição e mecanismos de reparo do musculo e da articulação.**

As células musculares são denominadas fibras musculares e possuem a capacidade de se contrair e relaxar. A essa propriedade chamamos de contratilidade muscular. Essas células possuem formato alongado e promovem a contração muscular o que permite os diversos movimentos dos segmentos corporais. O tecido muscular pode ser de três tipos: tecido muscular liso, tecido muscular estriado cardíaco ou tecido muscular estriado esquelético (ROBBINS e COTRAN, 2010). A esse último se classificam os músculos periféricos e motores das articulações. O reparo do músculo frente à uma lesão ocorre através de fenômenos como a hemorragia local que permite a migração de células de adesão e contenção, e a sinalização para células inflamatórias sintetizarem tecido cicatricial, propiciando ao tecido neoformação fibrilar e mobilidade progressiva do músculo e de outras estruturas ao entorno, tais como a articulação (PARKER et al. 2017).

A articulação faz parte do sistema locomotor e é responsável por gerar mobilidade e dinamismo conectando os ossos do esqueleto entre si e é composta pela cartilagem que recobre a superfície das articulações como os joelhos, cotovelos, coluna, dentre outras. Os elementos que fazem parte das articulações são basicamente a cartilagem articular, os ligamentos, a capsula articular, a membrana sinovial dentre outros elementos (ROBBINS e COTRAN, 2010). Já o reparo da articulação é diferenciado, lento e possui característica de pouca vascularização principalmente no tecido cartilaginoso, pois o tecido conjuntivo composto por colágeno que permite a formação da cicatriz no tecido e a elastina que permite restaurar a mobilidade, possuem reduzido aporte sanguíneo. Essas características diferenciadas no reparo das lesões articulares torna a cicatrização da articulações mais dificultosa se comparada a outros órgãos e tecidos biológicos (GUERREIRO et al. 2015).

## **1.6 O Exercício Físico**

Outra relevante intervenção eficaz no reparo das lesões é a realização de exercícios ativo e controlado pelo segmento lesionado. O colégio Americano de Medicina Esportiva afirma que o “exercício é medicina”, em detalhes, o movimento do segmento lesionado, seja ligamento, osso, músculo ou articulação, diminui a dor por estimular os mecanorreceptores e inibir os nociceptores, diminuindo o edema e a

inflamação local (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017; CHANG et al., 2018; CUNHA et al., 2014).

Tanto para lesões epiteliais, ósseas, musculares e também as articulares, a realização de movimentos no sentido de realinhar as fibras cicatriciais e aumentar a velocidade das células de reparo e a prática de mobilidade precoce (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017) é uma das formas de intervenção mais relevantes e praticadas (CHANG et al., 2018). Algumas pesquisas fortalecem essa visão, enfatizando a capacidade do exercício físico em promover um aumento no fluxo sanguíneo e do metabolismo, e conseqüentemente elevar a taxa de remoção de resíduos nocivos (CUNHA et al., 2014). Além disso, a realização de exercícios promove a ação de substâncias endógenas no sistema imune gerando uma mudança na concentração e nas funções dos leucócitos, células natural killer (NK), linfócitos T e B, assim como alterações nos níveis de imunoglobulinas, citocinas e outros fatores solúveis, auxiliando na deposição de fibroblasto no local da lesão, permitindo que o colágeno sintetizado induza a síntese de proteínas de mobilidade tais como a elastina, e iniba a ação do colágeno aderente, gerando um melhor alinhamento celular pós lesão, propiciando funcionalidade e mobilidade ao tecido cicatrizado (PRESTES et al., 2012).

Outra relevante característica do exercício físico tanto em humanos quanto em ratos é a influencia na produção de algumas citocinas que modulam a resposta inflamatória e possuem capacidade de cicatrização muscular (CUNHA et al. 2014). Hamid; Yusof e Mohamed Ali, (2014) enfatizam que o exercício físico proporciona aumento nos níveis de TGF $\beta$ 1, interleucina 10 (IL-10) e outras citocinas envolvidas no processo inflamatório. Achados destacados por Chang et al., (2018) demonstraram que grupos que não realizam exercício possuem quadros inflamatórios mais intensos com cicatrização lenta e desalinhamento fibrilar do que grupos tratados com exercícios.

Analisando os efeitos, as formas de obtenção e preparo, mecanismo de atuação e suas capacidade biológicas no músculo e na articulação observa-se que a aplicação de PRP, trata-se de uma terapia inovadora e relevante no processo de reparo das lesões (MANDUCA; STRAUB, 2017). Por outro lado, o exercício físico também define-se como uma técnica atualmente utilizada no reparo das lesões musculares e articulares e também apresenta efeitos benéficos no reparo tecidual (HAMID; YUSOF; MOHAMED ALI, 2014). Contudo, a associação das terapias citadas, sugere uma recuperação mais rápida permitindo alinhamento e homeostasia tecidual.

Porém, é importante o planejamento de forma consciente da intensidade, duração e tipo de exercício realizado, evitando-se a fadiga e respeitando o tempo de recuperação dos tecidos (CHANG et al., 2018; CUNHA et al., 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar uma revisão da literatura acerca do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no reparo das lesões articulares e musculares, e analisar o efeito biológico da terapia com PRP, Exercício (EXE) ou PRP+EXE em lesão muscular e articular de ratos wistar.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Identificar e quantificar as células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares no músculo e na capsula articular após as terapias, por meio de análise histológica de coloração hematoxilina e eosina.

Caracterizar a deposição de colágeno no músculo e na cápsula articular após as terapias, por meio de coloração de picrosíus.

Avaliar a produção das citocinas IL-1, IL-4, IL-10,  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e  $TGF\beta 1$  no tecido muscular e articular após as terapias, por meio de ensaio imunoenzimático ELISA. E através da imunohistoquímica as marcações de NFkB,  $TGF\beta 1$ , VEGF e cNOS.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente tese deu origem a três artigos, um de revisão da literatura intitulado **“Plasma Rico em Plaquetas-PRP: Papel no reparo das lesões musculares e articulares”** um artigo de resultados relacionado à lesão muscular intitulado **“Exercício físico associado ao Plasma Rico em Plaquetas (PRP) atenua a resposta inflamatória em lesão muscular de ratos?”** e outro de resultados referente à lesão articular **“Perfil da resposta inflamatória em lesão articular de ratos sob aplicação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e do exercício físico.”**

#### 4.1 ARTIGO 1: REVISÃO DA LITERATURA – PLASMA RICO EM PLAQUETAS – PRP: PAPEL DO REPARO DAS LESÕES MUSCULARES E ARTICULARES

*Plasma Rich in Platelets-PRP: Role in the muscle and joint repair*

Wagner Menna Pereira

Milena Menegazzo Miranda Sapla

Fernanda Tomiotto

Wander Rogério Pavanelli

#### RESUMO

**Objetivo:** Realizar uma revisão bibliográfica da literatura científica sobre a utilização do plasma rico em plaquetas (PRP), no reparo de lesões musculares e articulares. **Métodos:** Foram pesquisadas as bases de dados Medline, LILACS, Bireme, PubMed, Cochrane e Scielo. Foram incluídos artigos originais sobre a utilização do PRP no reparo de lesões musculares e articulares, estudo com grupo controle e aleatorizados; estudos clínicos e experimentais e publicado de 2012 à 2018. Foram consideradas além das características gerais dos estudos, o tipo de tecido lesionado, a forma de tratamento utilizada e os principais resultados. **Resultados:** Foram levantados 3.082 trabalhos e após eliminação dos trabalhos duplicados, e de acordo com os critérios de inclusão, restaram 15 estudos elegíveis. **Conclusões:** O PRP, promove aceleração da migração celular em tecidos musculares, aumenta a quimiotaxia de fatores de crescimento e estimula níveis elevados de TGF $\beta$ 1 e VEGF, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 e outras citocinas pró e anti-inflamatórias objetivando o reparo e a cicatrização do local lesionado. A Associação do PRP ao exercício físico, demonstrou potencializar as ações cicatriciais e de reparo inflamatório.

**Palavras-Chave:** Plasma Rico em Plaquetas-PRP; Reparo muscular; Reparo articular.

#### ABSTRACT

**Objective:** To perform a literature review about the use of platelet rich plasma (PRP) in the repair of muscle and joint injuries. **Methods:** The databases Medline, LILACS, Bireme, PubMed, Cochrane and Scielo were searched. We included original articles on the use of PRP in repair of muscle and joint injuries, study with control group and randomized; clinical and experimental studies and published from 2012 to 2018. In addition to the general characteristics of the studies, the type of tissue involved, the type of treatment used and the main results were considered. **Results:** A total of 3,082 studies were performed and after elimination of the duplicate papers, and according to the inclusion criteria, 15 eligible studies remained. **Conclusions:** PRP promotes

acceleration of cell migration in muscle tissues, enhances chemotaxis of growth factors, and stimulates elevated levels of TGF $\beta$ -1, VEGF, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 and other pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines repair and healing of the injured site. The Association of PRP with physical exercise, demonstrated potentiate scarring and inflammatory repair actions.

**Key-Words:** Platelet rich plasma-PRP; Muscle repair; Joint repair.

## Introdução

Terapias que desencadeiam a ativação dos fatores de crescimento, tem demonstrado papel relevante no processo de reparo das lesões acelerando o processo cicatricial. Dentre essas terapias, cita-se o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), trata-se de um produto derivado do processamento laboratorial centrifugado do sangue autólogo com elevada concentração de plaquetas, rico em fatores de crescimento oriundos dos grânulos  $\alpha$ -plaquetários, com uma grande concentração em proteínas. O aumento de sua concentração, resulta em proliferação e diferenciação celular, e aumento da matriz extracelular, auxiliando também na coagulação sanguínea (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). O potencial do PRP em acelerar a cicatrização está relacionado com suas propriedades mitogênicas, angiogênicas, quimiotáticas e a capacidade de reduzir a quantidade de colágeno no local da lesão, além de conduzir um formato mais uniforme e melhor orientado à cicatriz (QUARTEIRO et al., 2015).

A aplicação de concentrado de plaquetas é utilizada em situações clínicas variadas, tais como lesões relacionadas a déficits circulatórios (AMAR et al., 2015), como ulcerações e neuropatias periféricas (HASAN et al., 2015), aplicações odontológicas (LENZA et al., 2013) e em cirurgias estéticas (MALAVOLTA et al., 2012; PATEL et al., 2013). Na área da ortopedia é utilizado em casos de restauração óssea, lesões musculares, lesões articulares, tendíneas e ligamentares (ZHANG et al., 2017), tendo grande importância para reabilitação de atletas profissionais e amadores, devido à diminuição do tempo de tratamento causada pelos fatores de crescimento contidos no PRP (HOTFIEL et al., 2018; MAZZOCCA et al., 2012). O músculo possui bom aporte sanguíneo, o que propicia aos miofilamentos uma capacidade vascular e nutritiva potente no reparo de lesões desse tecido. (GARCIA et al., 2017). Já as articulações, mais especificamente a cartilagem articular, não possui a mesma

capacidade vascular, o que traduz em danos maiores ao tecido cartilaginoso, menor marginação celular, diminuição da permeabilidade celular, e conseqüentemente menos aderência plaquetária e cicatricial (MANDUCA; STRAUB, 2017; ZHANG et al., 2017)

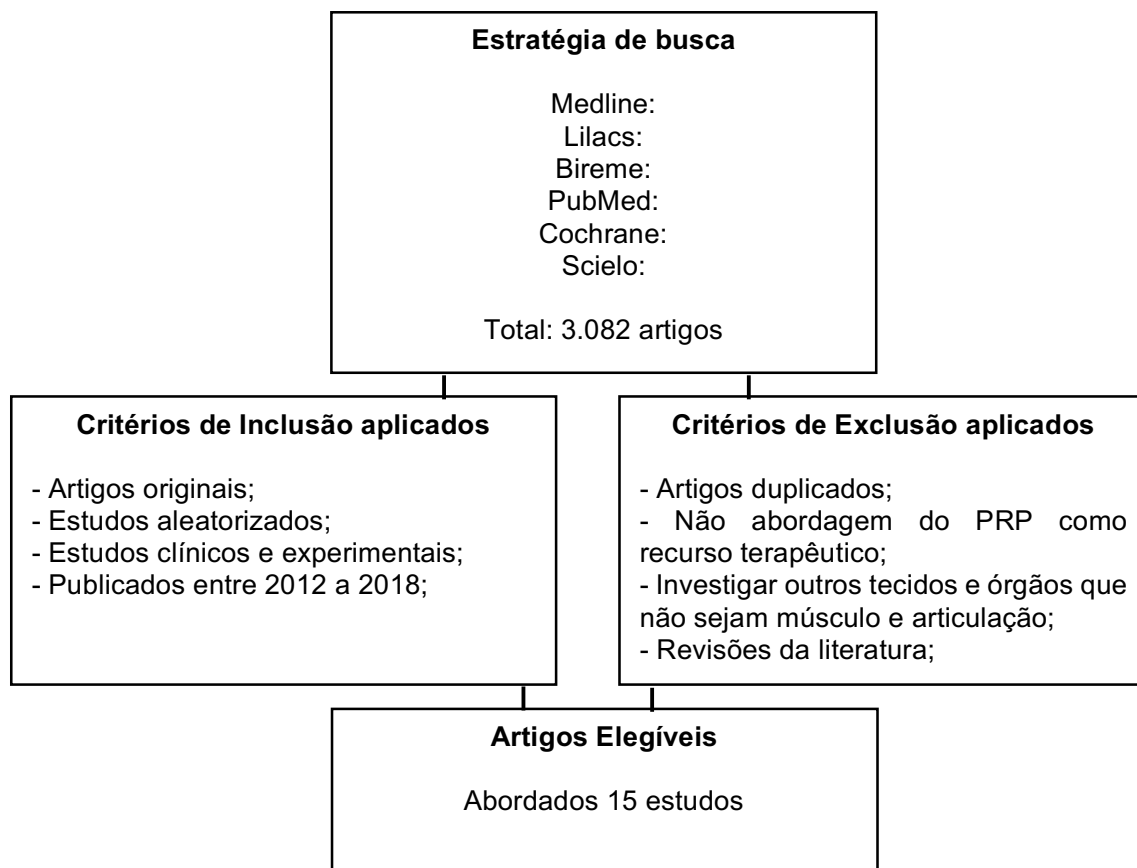
As lesões musculares e articulares são a causa mais frequente de incapacidade física na prática esportiva recreacional e profissional. Estima-se que 10 a 55% de todas as lesões do esporte estão associadas com lesões de tecidos moles (GRANDE et al., 2013) e aproximadamente 44% por lesões articulares, que causam considerável morbidade músculo esquelética podendo ocasionar dores articulares debilitantes, comprometimento funcional e artrite degenerativa, resultando em implicações econômicas e sociais significativas (HAMID; YUSOF; MOHAMED ALI, 2014; HOTFIEL et al., 2018; KNOP; DE PAULA; FULLER, 2016a).

Sabendo da importância da técnica de aplicação do PRP como uma alternativa terapêutica para o tratamento de várias patologias, realizou-se uma revisão da literatura sobre a utilização do PRP no reparo de lesões musculares e articulares, visando verificar as características dos protocolos utilizados para obtenção e utilização do PRP, além de investigar as divergências metodológicas e quais as células apresentam-se em maior quantidade e em qual fase de lesão o PRP se faz mais efetivo.

## **MATERIAS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo de revisão bibliográfica, em que foram pesquisadas as bases de dados Medline, LILACS, Bireme, PubMed, Cochrane e Scielo. Foram incluídos artigos originais sobre a utilização do PRP no reparo de lesões musculares e osteoarticulares, estudos com grupo controle e aleatorizados, estudos clínicos e experimentais publicado de 2012 a 2018. Foram excluídos artigos em duplicidade, artigos sem descrição dos dados metodológicos, e estudos que não se enquadrassem nos critérios de inclusão. Foram consideradas além das características gerais dos estudos, o tipo de tecido lesionado podendo ser músculos e articulações, a forma de tratamento utilizada podendo ser o uso isolado do PRP ou as associações comparadas ou não com grupo controle, o perfil da análise dos dados e os principais resultados de cada estudo.

As palavras-chave utilizadas foram: “Plasma Rico em Plaquetas” (*Platelet rich plasma*); “Reparo muscular” (*Muscle repair*) e “Reparo articular” (*Joint repair*). Inicialmente, foram selecionados os estudos com base nos títulos, excluindo aqueles claramente não relacionados com o tema da revisão. A seguir, todos os títulos selecionados tiveram seus resumos analisados para identificar aqueles que atendessem aos critérios de inclusão. Ao final da busca, restaram 15 trabalhos elegíveis. O organograma das etapas, segue descrito na figura 1.



**Figura 1.** Organograma, das etapas do processo de revisão da literatura.

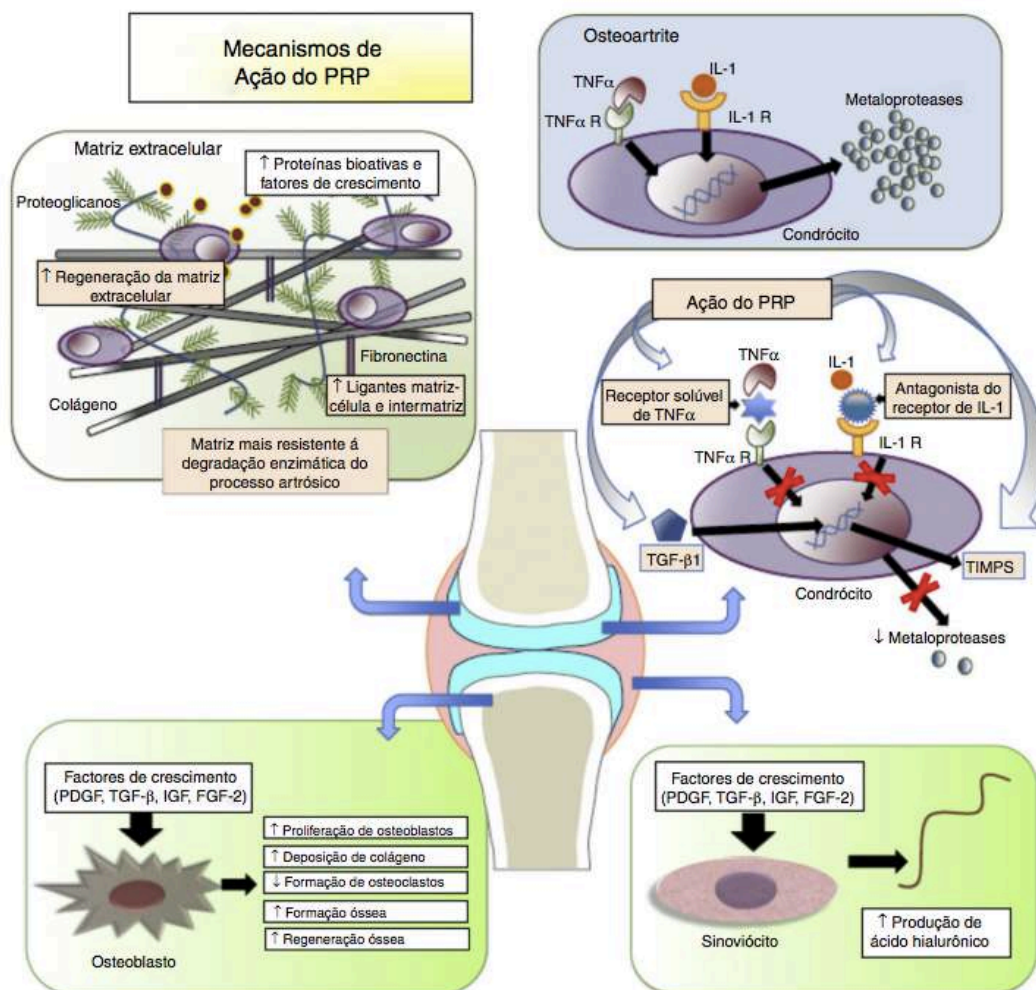
Os textos completos dos artigos relevantes foram recuperados para avaliação e suas listas de referências foram checadas com objetivo de identificar estudos com potencial relevância não encontrados na busca eletrônica. Foram selecionados os artigos a serem incluídos na revisão usando um formulário de tabulação das informações relevantes dos estudos. Não foi possível realizar uma meta-análise, pois alguns estudos divergiam em relação aos dados estatísticos e às diferentes formas de mensuração dos resultados, portanto o que se segue é, um estudo descritivo e a uma análise comparativa dos trabalhos encontrados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando o PRP é injetado no tecido lesionado as plaquetas são ativadas pela trombina endógena e/ou colágeno intra-articular. Após essa ativação, inicia a degranulação dos grânulos alfa que secretam alguns fatores de crescimento: Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1RA), receptores solúveis do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-RI), fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator plaquetário 4 (PF4), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fibrinogênio, fibronectina dentre outras substâncias.

Alguns mediadores agem de forma anti-inflamatória. O antagonista do receptor da IL-1 inibe a ativação do gene do NF $\kappa$ B, citocina envolvida no processo de apoptose e inflamação. Além desse, os receptores solúveis do fator de necrose tumoral ligam-se ao TNF- $\alpha$  e impedem a sua interação com os receptores celulares e sua sinalização pró-inflamatória. O TGF- $\beta$ 1 também atua como um fator inibidor da degradação da cartilagem, regula e aumenta a expressão dos genes dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP-1).

Na articulação especificamente, alguns fatores como PDGF e TGF- $\beta$ 1, favorecem a estabilização da cartilagem por meio da regulação das funções metabólicas dos condrócitos, equilibrando a síntese e a degradação dos proteoglicanos e estimulam a proliferação dos condrócitos. Abaixo ilustrado na figura 2 a descrição esquemática do mecanismo de ação do PRP na articulação.



**Figura 2.** Mecanismo de ação das plaquetas no tecido articular.

Os resultados acerca das características dos estudos investigados, com o tipo de amostra, o número de participantes em cada estudo, o tecido alvo, o tratamento abordado, a forma de avaliação das variáveis e os principais resultados, seguem descritos no quadro 1.

**Quadro 1.** Dados dos trabalhos elegíveis obtidos a partir do levantamento bibliográfico e aspectos relevantes dos trabalhos analisados, considerando os critérios de inclusão supra citados.

| Autor/Ano                | Amostra  | Tecido Alvo | Tratamento    | Análise                          | Principais Resultados  |
|--------------------------|----------|-------------|---------------|----------------------------------|--|
| QUARTEIRO et al., (2015) | 30 Ratos | Músculo     | PRP; Controle | Picrosírius; Hematoxilina Eosina | Menor quantidade de Mononucleares e colágeno no grupo tratado com PRP. |

|                                |            |             |   |   |   |
|--------------------------------|------------|-------------|---|---|---|
| BECK et al., (2012)            | 344 Ratos  | Músculo     | PRP; Controle                             | Picrosírius; Hematoxilina e Eosina      | PRP aumentou a quantidade de fibroblastos, neoformação e proliferação vascular;                                       |
| DENAPOLI et al., (2016)        | 30 Ratos   | Músculo     | PRP; Controle                             | ELISA; Picrosírius; HE                  | Aumento de VEGF; Menos fibras de colágeno e Menor infiltrado Polimorfo no grupo tratado com PRP.                      |
| CUNHA et al., (2014)           | 20 Ratos   | Músculo     | PRP; PRP + Exercício                      | Picrosírius                             | Associação de PRP + Exercício menos fibras de colágeno.   |
| GARCIA et al., (2017)          | 35 Ratos   | Músculo     | Controle; PRP; Laser isolado; Laser+ PRP  | Picrosírius; Hematoxilina Eosina        | Associação Laser + PRP menor quantidade de polimorfo, menos fibras de colágeno.                                       |
| YANG; LU; GUO, (2016)          | 3 Ratos    | Articulação | Controle; PRP+IL-1                        | Citometria de Fluxo                     | PRP atenuou a apoptose celular em condrócitos tratados com IL-1B e reduziu a produção de metaloproteínas e de matriz. |
| MEADOWS et al., (2017)         | 48 Ratos   | Músculo     | PRP; Medicação AINH                       | Força de Tração do músculo              | PRP apresenta melhor resistência à força de tração;   |
| CONTRERAS-MUÑOZ et al., (2017) | 40 Ratos   | Músculo     | Controle; PRP; EXE; PRP+EXE;              | Força muscular; Histologia              | PRP+EXE redução de polimorfo e melhor resistência força de tração do músculo.   |
| GUERREIRO et al., (2015)       | 40 humanos | Articulação | Controle; PRP                             | Dor; Questionário WOMAC; Movimento      | PRP melhora a dor; Mas, não melhora movimento.  |
| FILGUEIRAS et al., (2014)      | 27 coelhos | Articulação | Controle; PRP; PRP congelado por 6 meses; | Histologia (Microscopia de condrócitos) | PRP fresco e PRP congelado melhores no reparo da cartilagem.  |

|  |            |             |   |  |   |
|--|------------|-------------|---|--|---|
| PATEL et al., (2013)                       | 78 humanos | Articulação | PRP; duplo PRP; Controle                  | Questionário de dor e Função do joelho | PRP duplo melhor que PRP único e melhor que Controle. |
| CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, (2013a) | 10 ovelhas | Articulação | PRP; Controle                             | Histologia                             | PRP apresenta propriedades reparativas da cartilagem; |
| VETRANO et al., (2013)                     | 46 humanos | Articulação | PRP; Terapia por ondas de choque (TOC);   | Questionário de dor e função do joelho | PRP melhor nas variáveis estudadas do que grupo TOC.  |
| PRESTES et al., (2012)                     | 24 ratos   | Músculo     | Controle; PRP + EXE                       | Análise histológica                    | PRP + EXE diminuição de polimorfonuclear.             |
| CHANG, et al., (2018)                      | 26 coelhos | Articulação | PRP; PRP + Implante; PRP + Implante + EXE | Imunohistoquímica (IHC)                | PRP + Implante + EXE aumento de TNF e IL-6.           |

Os resultados obtidos durante a busca apresentaram diversidade em relação a estrutura biológica alvo, alguns estudos optam por analisar tendões, ossos e epitélio dérmico porém, o quadro 1 ilustrou os trabalhos que abordaram como alvo o músculo e a articulação. Outro aspecto relevante trata do delineamento experimental, variando desde análise com grupo controle como também multigrupos de comparação. Em relação às formas de tratamentos utilizados observou-se que a utilização do PRP de forma isolada foi bastante comum (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013a). Porém alguns autores utilizam de outras técnicas para realizar a comparação entre outros grupos experimentais (VETRANO et al., 2013; MEADOWS et al., 2017). Algumas associações do PRP com outras terapias concomitantes, são comuns tais como laserterapia, medicamentos e realização de exercícios para análise dos efeitos e potenciais das terapias combinadas (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017).

Por outro lado, houve um consenso quanto às técnicas empregadas para análise dos resultados, ou seja, a maioria dos estudos abordaram a análise histológica, com o uso da coloração para Hematoxilina e Eosina utilizada para analisar e qualificar a inflamação local, e também quantificar o número de células presentes nas lesões provocadas (PRESTES et al., 2012; CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013a; DENAPOLI et al., 2016). E o uso da coloração de picrossírius, técnica

utilizada com o objetivo de avaliar a presença de colágeno no tecido lesionado(GARCIA et al., 2017; CUNHA et al., 2014).

De acordo com os resultados obtidos, um relevante aspecto abordado pelos autores e relacionado com a eficácia do tratamento refere-se ao processo de centrifugação do PRP(MANDUCA; STRAUB, 2017). O número de centrifugações pode influenciar diretamente o processo de resolução e/ou cicatrização das lesões, devido à maior separação das plaquetas e hemácias, com o objetivo de obter um plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras (SAUCEDO et al., 2012).

Quarteiro et al. (2015) realizaram dupla centrifugação analisaram o efeito do PRP no reparo da lesão muscular do músculo gastrocnêmico. Os autores observaram que a primeira centrifugação serve apenas para separar o plasma do concentrado de hemácias, e que a segunda elimina a porção sobrenadante, separando apenas o centrifugado de plaquetas mais pesado, denominado pelo autor como concentrado intenso de plaquetas. Porém a realização de duas ou mais centrifugações foi alertado por Crónicas (2016), ao descrever que as plaquetas ao serem centrifugadas sofrem constantes processos de filtração, o que pode ocasionar em perdas das propriedades biológicas de agregação, desgranulação ou até mesmo de liberação dos fatores de crescimento;

Outro aspecto primordial é a velocidade de rotação utilizada na centrifugação. Diferentes trabalhos apresentam rotações variando de 1200 a 3200 rpm, porém as rotações médias de 1800 rpm são as mais utilizadas (PRESTES et al., 2012). Rotações mais baixas notavelmente prejudicam menos a integridade das plaquetas, no entanto, rotações mais elevadas proporcionam um alto teor concentrado de plaquetas (HAMID; YUSOF; MOHAMED ALI, 2014; WASTERLAIN et al., 2013a). De fato, a integridade plaquetária é importante para que os fatores de crescimento sejam liberados com efetividade, pois a reação de liberação do conteúdo dos grânulos ocorre sem lise celular, com a manutenção íntegra das plaquetas, havendo apenas mudanças nas suas características (SCHIPPINGER et al., 2015).

Essa integridade plaquetária foi testada por Monteiro et al. (2012) e os autores compararam o efeito da aplicação do PRP com a aplicação de células-tronco mesenquimais na cicatrização do tecido ósseo. Os autores sugerem que diferentes formas de tratamento autólogo potencializariam o reparo tecidual no osso. Como resultado ressaltam que em comparação ao grupo controle não tratado a associação

das duas formas autólogas de células potencializa os efeitos de angiogênese e reparação do tecido lesionado.

No trabalho de Beck et al., (2012), as características de angiogênese e reparo do tecido foram investigadas, analisaram ainda, as características histológicas em lesão no músculo supra espinhal do manguito rotador no ombro de ratos. Os autores mencionam que o PRP é eficaz no reparo deste músculo, e que os grupos tratados com PRP apresentaram efeitos positivos sobre as propriedades biomecânicas do supra espinhoso do manguito rotador, já o grupo controle, sem tratamento, obteve rigidez e fibrose mais intensas que o grupo tratado. Os autores comentam ainda que as fibras de colágeno do grupo tratado com PRP obtiveram um aspecto mais uniforme e bem orientado, devido ao poder potencializador das plaquetas na ação dos fibroblastos de síntese do colágeno tipo I, responsável por modelar o sentido e formato das fibras musculares.

Essas fibras musculares, compõem os principais componentes do tecido muscular e estão relacionadas com as rupturas por lesões traumáticas do músculo ou por lesões por estiramento desses músculos (PRESTES et al., 2012). Porém outros tecidos, além do músculo e da articulação também podem ser beneficiados com a aplicação do PRP, tais como em feridas cutâneas (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018) e no tecido ósseo (MAZZOCCA et al., 2012).

A aplicação do PRP e PRP associado ao cimento cirúrgico, foi utilizada em lesão óssea no fêmur de ratos, no trabalho de Sebben et al., (2012), para avaliar a capacidade do PRP de acelerar e potencializar o efeito de cicatrização óssea. Os autores observaram em seus resultados, que a aplicação do PRP associado ao cimento cirúrgico, não apresentou diferença significativa quando comparado ao PRP isolado. Esses autores utilizaram a técnica de picrossírius para mensurar a quantidade de colágeno no local da lesão, e pontuaram após quatro semanas, a formação de tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea que preenchem as cavidades cirúrgicas. Após oito semanas realizaram outra análise, onde perceberam as dimensões da lesão reduzidas com uma discreta área de tecido conjuntivo organizado permeando as áreas de neoformação óssea, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento, assim os autores sugerem o efeito precoce sobre a regeneração óssea quando os dois biomateriais são aplicados em conjunto.

Outro estudo que também quantificou a deposição de colágeno foi o de Cunha et al., (2014), no qual induziram lesão muscular e submeteu os ratos experimentais,

ao exercício físico em meio aquático. Os autores demonstram que a aplicação do PRP no local da lesão muscular associado com a realização de exercício aquático, acelera a cicatrização do muscular, com menor quantidade de fibras de colágeno tipo I e maior número de fibras de colágeno tipo III no grupo treinado em meio aquático e submetido ao PRP do que em comparação com os grupos que receberam os tratamentos isolados ou que não receberam tratamento nenhum. Segundo Parker et al. (2017) quantidade significativamente elevada de fibras de colágeno pode sugerir excesso de cicatriz e diminuição da mobilidade do local cicatrizado, enquanto que a diminuição significativa de colágeno em relação ao tecido normal, segundo Duffield et al. (2013) pode estar relacionada com diminuição da capacidade de remodelamento e sugerir fragilidade do tecido lesionado em atingir propriedades fisiológicas do órgão ou do tecido lesionado.

Cabe ressaltar que a realização do exercício físico trata-se de um recurso frequentemente utilizado para potencializar os efeitos cicatriciais de tecidos lesionados, sendo sua realização isolada ou associada a outro recurso terapêutico uma importante ferramenta para acelerar o processo de reparo principalmente dos músculos (CUNHA et al., 2014).

Denapoli et al., (2016), induziram lesão muscular no gastrocnêmio de ratos por mecanismo traumático objetivando avaliar a influência dos leucócitos em diferentes preparações de PRP com ênfase especial nas concentrações dos fatores de crescimento. Os autores analisaram os seguintes fatores de crescimento: fatores de crescimento transformante beta ( $TGF\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Todos esses fatores de crescimento foram quantificados por ensaio imunoenzimático e, como resultados, os autores mencionam que através do teste de ELISA os leucócitos foram a principal fonte de VEGF e todos os outros fatores de crescimento mensurados tiveram uma maior concentração.

Considerando os diversos fatores de crescimento e suas respectivas funções, a tabela 1 descreve os principais fatores de crescimento plaquetários.

**Tabela 1.** Fatores de crescimento plaquetários e suas respectivas funções.

| <b>Fator de Crescimento</b>  | <b>Função</b>   |
|--|---|
| <b>PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas)</b>                   | Estimula síntese de proteínas e colágeno;   |
|  | Quimiotaxia para monócitos, neutrófilos e de fibroblastos para tecido muscular;                                       |
|  | Importante ação angiogênica;  |
|  | Estimula a produção de IGF-I  |
| <b>EGF (Fator de crescimento epidérmico)</b>                               | Presente em alta concentração no início do processo de reparo;  |
|  | Desempenha papel vital na proliferação, diferenciação, crescimento e migração de células epiteliais e queratinócitos. |
|  | Promove a angiogênese;  |
| <b>FGF (Fator de crescimento fibroblástico)</b>                            | Capacidade de formar tecido de granulação;  |
|  | Estimula a liberação de TGF- $\alpha$   |
|  | Estimula a proliferação de fibroblastos;  |
|  | Acelera a formação de tecido de granulação;   |
| <b>IGF (Fator de crescimento insulínico)</b>                               | Potencial na redução de colágeno cicatricial;   |
|  | Importante ação na fase proliferativa;  |
|  | Acelera a cicatrização tecidual;  |
|  | Promove a migração dos queratinócitos, melhorando o reparo tecidual   |
| <b>VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial)</b>                     | Promove o efeito de angiogênese;  |
|  | Regulador da vasculogênese fisiológica e permeabilidade vascular;   |
|  | Acelera o reparo de feridas aumentando a angiogênese;   |
| <b>TGF-<math>\beta</math> (Fator de transformação do crescimento beta)</b> | Exerce efeito quimiotático para os macrófagos;  |
|  | Possui 3 isoformas diferentes (TGF $\beta$ 1, $\beta$ 2 e $\beta$ 3) que possuem funções sobrepostas mas diferentes;  |
|  | Induz a produção de colágeno e fibronectina e inibe a atividade das metaloproteinases;                                |
| <b>TGF<math>\beta</math>1</b>  | Atuante na cicatrização de feridas e promove a diferenciação de fibroblastos e miofibroblastos;                       |
| <b>TGF<math>\beta</math>2</b>  | Atuação em cicatrização e fibrose;  |
| <b>TGF<math>\beta</math>3</b>  | Promove a angiogênese;  |
|  | Reduz a deposição de colágeno durante as fases proliferativas e de remodelamento, reduzindo a formação de cicatriz;   |
| <b>CTGF</b>  | Fibroplasia e Angiogênese;  |

**Fonte:** (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018)

No estudo realizado por Garcia et al., (2017), sobre a efetividade da aplicação de PRP + laserterapia com comprimento de onda de 637nm no tratamento do músculo

sóleo lesado, os autores demonstram que no grupo com ambos os tratamentos, fibras polimorfonucleares como neutrófilos, eosinófilos e basófilos intensas foram encontradas em 75% do tecido muscular dos ratos analisados imediatamente após as lesões induzidas. Após os tratamentos, o tecido muscular dos ratos apresentou menor quantidade de células inflamatórias e menor área lesada, resultando em um distúrbio estrutural menor em comparação aos outros grupos. Segundo os autores, tais achados se justificam pois a laserterapia promove angiogênese e tem propriedades anti-inflamatórias, enquanto o PRP contém fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF $\beta$ ) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), responsável por atrair células para o local da lesão e promover o reparo do tecido. No grupo tratado com laserterapia + PRP, a combinação das terapias teria resultado em menor intensidade de fibras polimorfonucleares, arredondadas e angulares. Como efeito secundário de menos fibras lesadas, a necrose e a fagocitose foram menores em comparação com o grupo lesionado. Os autores concluem descrevendo que os tratamentos isolados não apresentaram resultados.

Zhang et al., (2017) investigaram o efeito da associação Kartogenina, uma substância capaz de diferenciar condrócitos de células tronco mesenquimais e induzir formação de tecido semelhante a cartilagem em ratos, com o PRP, no reparo cartilaginoso, analisando dados histológicos, deposição de colágeno, bem como a força de absorção de impacto dessa cartilagem. Os autores descrevem através da análise histológica por coloração de hematoxilina e eosina, um melhor arranjo das fibras no grupo tratado com Kartogenina em comparação com o grupo tratado apenas com PRP, que apresentaram um arranjo moderado das fibrocartilagens. E concluem que a associação apresentou melhores resultados no quesito deposição de colágeno

Outro trabalho de lesão de cartilagem de joelhos de ratos, realizado por Yang; Lu; Guo, (2016), os autores destacam que o PRP promoveu a sobrevivência dos condrócitos inibindo a apoptose induzida por IL-1 $\beta$  através da diminuição da expressão de fatores pró-apoptóticos e aumento da expressão de fatores antiapoptóticos. Os autores defendem e sugerem que o efeito que o PRP possui, na inibição da atividade de enzimas catabólicas, esses efeitos antiapoptóticos e anti-catabólicos podem explicar parcialmente a eficácia clínica do PRP no tratamento da lesão da cartilagem, que normalmente define-se como um tecido de difícil cicatrização. Já Plentz et al., (2008), ao utilizarem o concentrado de fibrina do plasma, em ratos que sofreram lesão

no manguito rotador, concluíram que o concentrado de fibrina, é eficaz em induzir uma resposta de cura, com produção desordenada de fibras de colágeno.

Amar et al., (2015) não encontraram diferenças significativas entre os grupos tratado com PRP e o grupo controle, nas lesões induzidas no ligamento colateral medial de 32 ratos. Os autores relatam que nem a análise de escore de maturidade histológica (utilizado para avaliar qualitativamente o perfil de células) nem a função biomecânica do tendão apresentaram diferença no grupo tratado quando comparado com o controle.

A associação da injeção intratendínea de uma droga denominada Bevacizumab, associada ao PRP, foi investigada por Dallaudiere et al., (2014), onde comparou com apenas a indução de PRP, em modelo de lesão no tendão patelar e tendão calcâneo de ratos, e analisaram a mobilização articular, a histologia e o diâmetro de fibra de colágeno. Os autores relatam que a aplicação de Bevacizumab associada ao PRP acelera o reparo tecidual no tendão com efeitos mais significativos do que o PRP aplicado de forma isolada. Todos os animais tratados com a associação das terapias apresentaram melhor mobilidade articular em relação aos outros grupos, melhor organização das fibras de colágeno, assim como neovascularização no local lesionado, indicando processo inflamatório e resolução mais efetiva do tecido tendinoso. Em relação ao diâmetro da fibra de colágeno avaliada através da ultrassonografia por imagem, o grupo Bevacizumab associada ao PRP, também apresentou melhor resultado do que comparado aos outros grupos.

Cabe destacar a ação *in vitro* do plasma rico em plaquetas e a capacidade de estímulo de fatores de crescimento. Schar et al. (2015) investigaram o fator de crescimento transformador beta ( $TGF\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Como resultados, os autores ressaltam que o PRP propicia maior liberação de  $TGF\beta$  e PDGF, sem diferenças no IGF e VEGF, concluindo através do teste de ELISA que o PRP gera maior ação dos fatores de crescimento na presença de um concentrado de plaquetas.

Coskun et al. (2011) ressaltam ainda que o  $TGF\beta$  é um dos moduladores mais importantes no processo de reparo tecidual. E realizaram um estudo, com o objetivo de analisar os efeitos do tratamento com  $TGF\beta$  nos níveis de óxido nítrico (NO) e nos níveis de peroxidação lipídica, no processo de cicatrização de feridas orais de coelhos

e observaram que nos grupos implantados com TGF $\beta$  os níveis de NO aumentaram significativamente quando comparados ao controle. Sugerindo que o TGF $\beta$ 1 afeta a cicatrização de feridas alterando a produção de NO e regulando os mecanismos de reparo de feridas orais de coelhos. Os autores concluem, afirmando que TGF $\beta$ 1 induz a inibição da produção de NO pelos macrófagos através da diminuição da estabilidade e tradução de mRNA para NOS. Esse último estudo não foi incluído na tabela 2, devido ao fato de ser um trabalho *in vitro*. Contudo, observa-se características relevantes na análise dos estudos que envolvem o PRP como forma de tratamento, destacando-se a alta incidência de lesões musculares e articulares e os benefícios que o PRP oferece no reparo do tecido lesionado, bem como em sua capacidade de liberar fatores de crescimento que potencializam a cicatrização do tecido alvo. Enfatiza-se que dentre os trabalhos analisados, a associação do PRP combinado com outras terapias, potencializa os efeitos de remodelamento do tecido.

## **Conclusão**

De acordo com os estudos investigados, o PRP é uma técnica eficaz no reparo das lesões musculares e articulares, por potencializar a liberação de fatores de crescimento tais como TGF $\beta$ , VEGF e PDGF, dentre outros que potencializam o processo de cicatrização.

O papel do PRP no reparo das lesões esta diretamente relacionado com a forma de realização da punção do plasma, assim como o número de vezes em que o material sobre a centrifugação e também o número de rotações por minuto, podendo esses fatores influenciarem na estrutura e capacidade biológica do PRP. Na análise dos trabalhos acerca dos efeitos terapêuticos do PRP, a associação do concentrado plaquetário com outras técnicas de tratamento demonstra-se mais eficaz do que a aplicação do PRP isolada.

## **Referencias**

AFSHARNIA, M. et al. Electronic Physician ( ISSN: 2008-5842 ). n. November, p. 3248–3256, 2016.

AMAR, E. et al. Platelet-rich plasma did not improve early healing of medial collateral

- ligament in rats. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 135, n. 11, p. 1571–1577, 2015.
- BECK, J. et al. The biomechanical and histologic effects of platelet-rich plasma on rat rotator cuff repairs. **American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p. 2037–2044, 2012.
- CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013a.
- CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013b.
- CHANG, N. J. et al. Therapeutic Effects of the Addition of Platelet-Rich Plasma to Bioimplants and Early Rehabilitation Exercise on Articular Cartilage Repair. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 9, p. 2232–2241, 2018.
- CHATTERJEE, S. et al. Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- CHICHARRO-ALCÁNTARA, D. et al. Platelet rich plasma: New insights for cutaneous wound healing management. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.
- COCKS, M.; WAGENMAKERS, A. J. M. The effect of different training modes on skeletal muscle microvascular density and endothelial enzymes controlling NO availability. v. 8, n. July 2014, p. 2245–2257, 2016.
- COLE, B. J. et al. Hyaluronic Acid Versus Platelet-Rich Plasma. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 2, p. 339–346, 2017.
- CONTRERAS-MUÑOZ, P. et al. Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats but Are Not Synergistic When Combined. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 2131–2141, 2017.
- COŞKUN, Ş. et al. Effect of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) on nitric oxide production and lipid peroxidation in oral mucosal wound healing. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 1, p. 23–28, 2011.
- CRÓNICAS, T. Plasma Rico em Plaquetas : Alternativa Terapêutica. 2016.
- CUNHA, R. C. et al. Effect of platelet-rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 1879–1881, 2014.

- DALGLEISH, T. et al. [ **No Title** ]. [s.l: s.n.]. v. 136
- DALLAUDIERE, B. et al. Combined intra-tendinous injection of Platelet Rich Plasma and bevacizumab accelerates and improves healing compared to Platelet Rich Plasma in tendinosis: Comprehensive assessment on a rat model. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 3, p. 351–356, 2014.
- DENAPOLI, P. M. A. et al. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1962–1971, 2016.
- DIETRICH, W. D. Temporal and Segmental Distribution of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases after Traumatic Spinal Cord Injury : Effect of Aminoguanidine Treatment. v. 19, n. 5, p. 639–651, 2002.
- DOS ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 5, p. 975–983, 2017.
- DUFFIELD, J. S. et al. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, n. 1, p. 241–276, 2013.
- FILGUEIRAS, R. R. et al. Platelet rich plasma associated with heterologous fresh and thawed chondrocytes on osteochondral lesions of rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 168–176, 2014.
- GARCIA, T. A. et al. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 21, n. 6, p. 425–433, 2017.
- GONZALEZ, A. C. D. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.
- GRANDE, D. A. et al. Articular Cartilage Repair: Where We Have Been, Where We Are Now, and Where We Are Headed. **Cartilage**, v. 4, n. 4, p. 281–285, 2013.
- GREAVES, N. S. et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 206–217, 2013.
- GUEDES, R. N.; MARIA, R.; SERPA, G. A rtigo O riginal. v. 45, n. 2, p. 1731–1735, 2011.
- GUERREIRO, J. P. F. et al. Plasma rico em Plaquetas (PRP) aplicado na artroplastia total do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 2, p. 186–194, 2015.
- HAMID, M. S. A.; YUSOF, A.; MOHAMED ALI, M. R. Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2014.

- HASAN, S. et al. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff healing in a rat model. **Int J Sports Med**, p. Epub ahead of print, 2015.
- HERMETO, L. C. et al. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 789–794, 2012.
- HOTFIEL, T. et al. Nonoperative treatment of muscle injuries - recommendations from the GOTS expert meeting. **Journal of experimental orthopaedics**, v. 5, n. 1, p. 24, 2018.
- KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016a.
- KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016b.
- LENZA, M. et al. Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 122–127, 2013.
- MALAVOLTA, E. A. et al. Plasma rico em plaquetas no reparo artroscópico das roturas completas do manguito rotador. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 6, p. 741–747, 2012.
- MANDUCA, M. L.; STRAUB, S. J. Effectiveness of PRP Injection in Reducing Recovery Time of Acute Hamstring Injury: A Critically Appraised Topic. **Journal of Sport Rehabilitation**, p. 1–19, 2017.
- MAZZOCCA, A. D. et al. The Positive Effects of Different Platelet-Rich Plasma Methods on Human Muscle, Bone, and Tendon Cells. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1742–1749, 2012.
- MEADOWS, M. C. et al. Effects of Platelet-Rich Plasma and Indomethacin on Biomechanics of Rotator Cuff Repair. **American journal of orthopaedics (Belle Mead, N.J.)**, v. 46, n. 5, p. E336–E343, 2017.
- MILLER, R. E.; MILLER, R. J.; MALFAIT, A. M. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 185–193, 2014.
- MIRANDA, M. M. et al. Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.
- NGUYEN, Q. T.; JACOBSEN, T. D.; CHAHINE, N. O. Effects of Inflammation on Multiscale Biomechanical Properties of Cartilaginous Cells and Tissues. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2644–2656, 2017.
- NIU, K. Y.; RO, J. Y. Changes in intramuscular cytokine levels during masseter

inflammation in male and female rats. **Neuroscience Letters**, v. 487, n. 2, p. 223–227, 2011.

PALACIO, E. P. et al. Efeitos do plasma rico em plaquetas na epicondilite lateral do cotovelo: Estudo prospectivo, randomizado e controlado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 51, n. 1, p. 90–95, 2016.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 58–65, 2011.

PARKER, L. et al. Age and sex differences in human skeletal muscle fibrosis markers and transforming growth factor- $\beta$  signaling. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 7, p. 1463–1472, 2017.

PAS, H. I. M. F. L. et al. Efficacy of rehabilitation (lengthening) exercises, platelet-rich plasma injections, and other conservative interventions in acute hamstring injuries: An updated systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 18, p. 1197–1205, 2015.

PATEL, S. et al. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: A prospective, double-blind, randomized trial. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 2, p. 356–364, 2013.

PLENTZ, R. D. M. et al. Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 6, p. 488–494, 2008.

PRESTES, A. N. et al. Effect of platelet-rich plasma on muscle injuries associated with physical exercise. v. 53, n. 2, p. 81–86, 2012.

QUARTEIRO, M. L. et al. O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 5, p. 586–595, 2015.

ROVERE-QUERINI, P.; CLEMENTI, E.; BRUNELLI, S. Nitric oxide and muscle repair : Multiple actions converging on therapeutic efficacy. v. 730, p. 181–185, 2014.

SAUCEDO, J. M. et al. Platelet-rich plasma. **Journal of Hand Surgery**, v. 37, n. 3, p. 587–589, 2012.

SCHÄR, M. O. et al. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, n. 5, p. 1635–1643, 2015.

- SCHIPPINGER, G. et al. Autologous Platelet-Rich Plasma Preparations: Influence of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Platelet Function. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1–6, 2015.
- SEBBEN, A. D. et al. Estudo comparativo do uso isolado de plasma rico em plaquetas e combinado com cimento de alfa-fosfato tricálcico no reparo ósseo em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 4, p. 505–512, 2012.
- SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 847–852, 2012.
- TATLER, A. L. et al. Integrin  $\alpha 5$ -Mediated TGF- $\beta$  Activation by Airway Smooth Muscle Cells in Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 11, p. 6094–6107, 2011.
- TRUFLANDIER, K. et al. Mechanical ventilation modulates pro-inflammatory cytokine expression in spinal cord tissue after injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 671, n. November 2017, p. 13–18, 2018.
- UÉBEC, C. E. D. U. Guide de reconnaissance. v. 61, p. 260–265, 2008.
- VASCONCELOS, S.; FERNANDA, R. Resistance exercise , muscle damage and inflammatory response “ what doesn ’ t kill you makes you stronger ”. **MOJ Sports Medicine**, v. 2, n. 2, p. 70–72, 2018.
- VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, T. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Rev. bras. cir. plást**, v. 25, n. 4, p. 589–594, 2010.
- VETRANO, M. et al. Platelet-rich plasma versus focused shock waves in the treatment of Jumper’s knee in athletes. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 795–803, 2013.
- WANG, T. Y.; CHEN, D. Differential roles of TGF- $\beta$  signalling in joint tissues during osteoarthritis development. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 11, p. e72–e72, 2016.
- WASTERLAIN, A. S. et al. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013a.
- WASTERLAIN, A. S. et al. The Systemic Effects of Platelet-Rich Plasma Injection. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013b.
- WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 825–853, 2016.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–1040, 2012.

YANG, J.; LU, Y.; GUO, A. Platelet-rich plasma protects rat chondrocytes from interleukin-1induced apoptosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4075–4082, 2016.

ZHANG, J. et al. The combined use of kartogenin and platelet-rich plasma promotes fibrocartilage formation in the wounded rat Achilles tendon entheses. **Bone and Joint Research**, v. 6, n. 4, p. 231–244, 2017.

## 4.2 ARTIGO 2: EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) ATENUA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM LESÃO MUSCULAR DE RATOS?

Wagner Menna Pereira, Fernanda Tomiotto Pelissier, Milena Menegazzo Miranda-Sapla, Ivo Ilvan Kerppers, Carolina Panis, Wander Rogério Pavanelli.

### Resumo

**Introdução:** O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é uma técnica altamente utilizada em procedimentos biológicos, por gerar fatores de crescimento que aumentam e aceleram o processo de cicatrização em lesões musculares. A realização de exercícios (EXE), atualmente é utilizada na área de reabilitação para acelerar o processo de reparo e devolver a capacidade funcional dos músculos. O presente estudo, teve como objetivo analisar o efeito biológico da terapia com PRP, Exercício (EXE) ou PRP+EXE em lesão muscular através da análise quantitativa de células inflamatórias, caracterizar a deposição de colágeno e avaliar a produção de citocinas nos modelos de lesões induzidas em ratos, na fase aguda (3 dias) e tardia (14 dias).

**Materiais e Métodos:** Foram incluídos 40 ratos wistars, divididos em grupos controle positivo (n=10), PRP (n=10), EXE (n=10) e PRP+EXE (n=10). O PRP foi obtido por centrifugação do sangue autólogo, e inserido imediatamente no local da lesão muscular. A lesão muscular foi induzida por mecanismo traumático e a realização do exercício físico se deu em esteira ergométrica adaptada, com duração de 5 minutos, 1 vez por dia, todos os dias em velocidade de 2cm/seg. **Resultados:** Na fase aguda todos os tratamentos reduziram a quantidade de células polimorfonucleares, além de reduzir cNOS. Houve aumento de NFkB e VEGF no tratamento isolado com PRP que também foi observado no tratamento isolado com EXE. A associação de PRP+EXE reduziu IL-4, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Na fase tardia, houve uma diminuição de VEGF em todos os grupos tratados, mas somente o grupo EXE foi capaz de diminuir cNOS. Os grupos PRP isolado e PRP+EXE aumentaram IL-10 e NFkB e somente o grupo associação de PRP+EXE foi capaz de reduzir IL-4 e TGF $\beta$ 1. Em relação a deposição de colágeno, todos os tratamentos foram efetivos em aumentar a quantidade de fibras de colágeno maduro no 14<sup>o</sup> dia após a lesão em relação ao controle positivo no 3<sup>o</sup> dia pós lesão.

**Conclusão:** Todos os tratamentos reduziram a quantidade de infiltrado inflamatório na fase inicial e aumentaram a produção de colágeno maduro. A associação PRP+EXE reduziu a produção de citocinas inflamatórias tanto na fase aguda quanto na fase crônica.

**Palavras-chave:** Plasma rico em plaquetas; Fatores de crescimento; Reparo muscular; Exercício físico.

## PEREIRA, W. M. PHYSICAL EXERCISE ASSOCIATED WITH PLATELET RICH PLASMA (PRP) ATTENUATES THE INFLAMMATORY RESPONSE IN MUSCLE INJURY OF RATS?

Wagner Menna Pereira, Fernanda Tomiotto Pelissier, Milena Menegazzo Miranda-Sapla, Ivo Ilvan Kerppers, Carolina Panis, Wander Rogério Pavanelli.

### Abstract

**Introduction:** Platelet rich plasma (PRP) is a technique widely used in biological procedures, for generating growth factors that increase and accelerate the healing process in muscle injuries. Performing exercises (EXE) is currently used in the rehabilitation to accelerate the repair process and restore functional capacity of the muscles. The present study aimed to analyze the biological effect of PRP, Exercise (EXE) or PRP+EXE therapy on muscle injury through quantitative analysis of inflammatory cells, characterize collagen deposition and evaluate the production of cytokines in the models of induced lesions in rats in the acute (3 days) and late (14 days) phase. **Materials and Methods:** Wistar rats were divided into positive control groups (n = 10), PRP (n = 10), EXE (n = 10) and PRP+EXE (n = 10). The PRP was obtained by autologous blood centrifugation, and inserted immediately at the muscle injury site. Muscle injury was induced by a traumatic mechanism and physical exercise was performed on an ergometric treadmill, with a duration of 5 minutes, 1 time to day, every day at a speed of 2cm/sec. **Results:** In the acute phase, all treatments reduced the amount of polymorphonuclear cells, in addition to reducing cNOS. There was an increase in NF $\kappa$ B and VEGF in the PRP treatment that was also observed in the EXE treatment. The association of PRP+EXE reduced IL-4, IFN $\gamma$ , and TNF $\beta$ 1. In the late phase, there was a decrease in VEGF in all treated groups, but only the EXE group was able to decrease cNOS. The isolated PRP and PRP+EXE groups increased IL-10 and NF $\kappa$ B and only the PRP+EXE association group was able to reduce IL-4 and TGF $\beta$ 1. Regarding collagen deposition, all treatments were effective in increasing the amount of mature collagen fibers on the 14th day after the lesion in relation to the positive control on the 3rd day after injury. **Conclusion:** All treatments reduced the amount of inflammatory infiltrate in the initial phase and increased the production of mature collagen. The association PRP+EXE reduced the production of inflammatory cytokines both in the acute phase and in the chronic phase.

**Keywords:** Platelet-rich plasma (PRP); Growth factors; Muscle repair; Physical exercise.

### Introdução

O Plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto do sangue autólogo usado para tratar lesões agudas e crônicas de diversos tecidos biológicos. Esta terapia vêm sendo estudada e disseminada na literatura científica como um potente acelerador do

reparo tecidual (WASTERLAIN et al., 2013b; WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016). Proposto desde 1990, o PRP é obtido a partir da centrifugação do sangue preferencialmente autólogo e infiltrado no local lesionado para potencializar a liberação de fatores de crescimento no local da lesão (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017).

O PRP possui propriedades curativas atribuídas a concentrações aumentadas de fatores de crescimento e proteínas em nível celular (CUNHA et al., 2014). A expectativa é que esses fatores, quando introduzidos no local da lesão aumentem o recrutamento, a proliferação e a diferenciação das células e promovam o reparo acelerado do tecido ao qual foi inserido (COLE et al., 2017).

Dentre as possíveis condições clínicas que podem ser tratadas com a aplicação do PRP encontra-se a lesão muscular (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013a; CUNHA et al., 2014). Lesões musculares são definidas como alterações, morfológicas ou histoquímicas, que promovem disfunção do aparelho locomotor (HAMID; YUSOF; MOHAMED ALI, 2014). Podem ser causadas por dois mecanismos: traumas diretos como as contusões, e traumas indiretos como os estiramentos (MEADOWS et al., 2017). Cerca de 30% das lesões diagnosticadas por médicos têm relações com o sistema muscular sendo um dos traumas mais comuns ocorridos na prática esportiva, ou seja, é causa de 10% a 55% de todas as lesões ortopédicas, o que a torna uma das principais lesões do sistema musculoesquelético gerando perda da função do músculo lesionado e dificultando a prática de exercícios físicos (GARCIA et al., 2017).

A realização de exercícios físicos como forma de estímulo da recuperação muscular permite restauração do equilíbrio fisiológico do músculo (PRESTES et al. 2012), além de influenciar a presença de células inflamatórias e de seus mediadores, tais como o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4) (DENAPOLI et al. 2016). Wu; Diaz; Borg-Stein (2016) destacam que as plaquetas e a realização de exercício físico podem influenciar na liberação de fatores de crescimento relevantes no processo de cicatrização tais como cNOS, VEGF e  $TGF\beta 1$ . Os autores destacam ainda, que essas citocinas estimulam o recrutamento, diferenciação e comunicação celular e estão diretamente relacionadas com modelo de cicatrização.

Alguns autores sugerem que o exercício realizado de forma isolada estimula a síntese biológica de mediadores anti-inflamatórios no local lesionado potencializando

o reparo e auxiliando na resolução do processo inflamatório (CHANG et al., 2018; CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017; CUNHA et al., 2014; PAS et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho, foi analisar os efeitos biológicos da aplicação do PRP, associado ao exercício físico em lesão muscular de ratos em fase aguda (3 dias) e tardia (14 dias).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo experimental, controlado e randomizado. Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, pesando entre 180 e 250 gramas, com idade de aproximadamente 2 meses, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Londrina– UEL/PR e do Biotério da Universidade Estadual de Maringá – UEM/PR. Os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico medindo 45 cm de largura, 53 cm de comprimento e 25 cm de altura, com 5 animais por gaiola, sendo-lhes permitido livre acesso à ração específica para roedores e à água *ad libitum*, durante todo o período do experimento. Os animais mantiveram-se em biotério com ciclo claro/escuro de 12h (luzes ligadas de 7h às 19h) sob temperatura de 23°C ± 1°C. Todos os experimentos foram conduzidos segundo as normas de Comissão Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e CEUA – UNICENTRO, sob parecer de aprovação 024 e 045//2017 (ANEXO I).

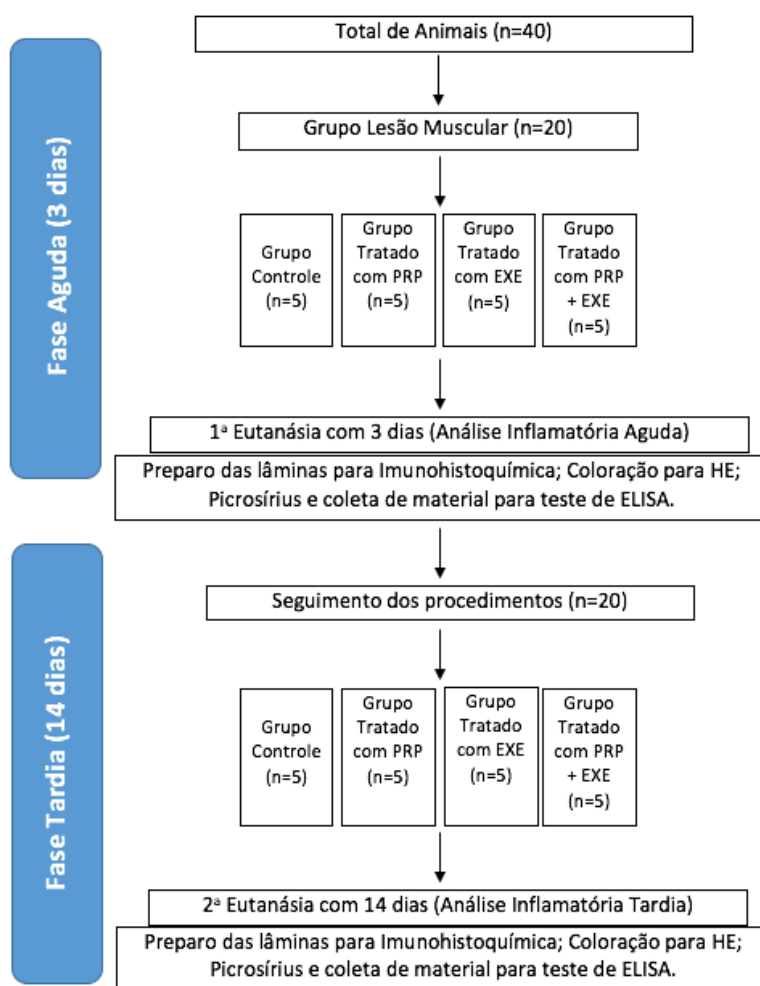
### **Realização do Estudo**

Realizou-se os experimentos práticos e diários de rotina com os animais, indução das lesões, preparo dos materiais e eutanásias na Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, através do laboratório de Neuroanatomia e Neurofisiologia, localizada na cidade de Guarapuava-PR. A realização das análises dos materiais e processamento dos resultados realizou-se na Universidade de Londrina – UEL, através do laboratório de Imunoparasitologia das doenças negligenciadas e câncer, na cidade de Londrina-PR.

### **Delineamento experimental**

Os animais foram separados por fase aguda e fase tardia, de acordo com o período de eutanásia, sendo o período de 3 dias para análise dos efeitos agudos e 14 dias para análise dos efeitos tardios, conforme ilustrado no fluxograma da figura 1.

Destes, 4 grupos compuseram a fase aguda (3 dias) e 4 grupos compuseram a fase tardia (14 dias). O grupo controle muscular positivo sofreu lesão muscular sem tratamento (C+), o grupo lesão muscular + PRP sofreu a lesão e foram tratados somente com PRP (PRP), o grupo lesão muscular + EXE, sofreu a lesão e foram tratados somente com exercício (EXE) e o grupo lesão muscular + PRP + EXE (PRP+EXE) sofreu a lesão e foram tratados com PRP e a realização de exercícios.



**Figura 1** - Fluxograma da alocação de animais conforme grupo de conduta aplicada e tempo de intervenção. Descrito o número de animais pertencentes em cada grupo e as intervenções realizadas na fase aguda (3 dias) e fase tardia (14 dias).

### Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Para obtenção do PRP foi utilizado o mesmo protocolo realizado por Contreras-Muñoz e colaboradores (2017). Os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de quetamina e 15 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal, após isso, foram coletados 1mL de sangue por punção cardíaca com agulha calibre 0,80 x 25mm. Alguns animais sofreram óbitos relacionados ao trauma cardíaco induzido pela punção, porém realizou-se a reposição desses animais para homogeneidade da amostra. O sangue foi transportado para um tubo de coleta a vácuo de 4,5ml contendo EDTA como anticoagulante. Após a homogeneização, o tubo foi centrifugado uma única vez, para não danificar as propriedades das plaquetas à 1800rpm durante 10 minutos, a uma temperatura de 25°C após a coleta do sangue, os animais foram devolvidos às respectivas gaiolas e aguardado o período de retorno dos efeitos da anestesia.

Após o processo de centrifugação foi possível distinguir duas camadas no tubo, as hemácias ao fundo e o plasma sobrenadante. Foram coletados 500µL do plasma, que foi congelado e mantido em -20°C para uso posterior. O tratamento foi feito pela injeção autóloga de 10µL pontualmente no local da lesão, como descrito por Quarteiro et al., (2015).

### **Indução da lesão muscular**

Para a indução da lesão muscular por mecanismo traumático, utilizou-se um dispositivo semelhante ao usado no trabalho de Quarteiro et al., (2015), onde o animal foi anestesiado previamente com o segmento a ser lesionado devidamente posicionado abaixo da linha de ação do dispositivo que induz a lesão muscular, o trauma é gerado por queda de uma estrutura de metal sólida com peso 200g que percorreu uma distância de 30 cm até a base onde estava localizado o membro a ser atingido, como ilustrado na figura 2. Assim, a força gerada pelo dispositivo foi de aproximadamente 240N, mensurados a partir do peso do objeto e pela altura da queda. A região escolhida para indução da lesão muscular foi a região posterior do membro inferior direito, exatamente no músculo gastrocnêmio, região essa encontrada superficialmente e de fácil localização (PRESTES et al., 2012). Imediatamente após a indução da lesão foi aplicado o PRP autólogo.

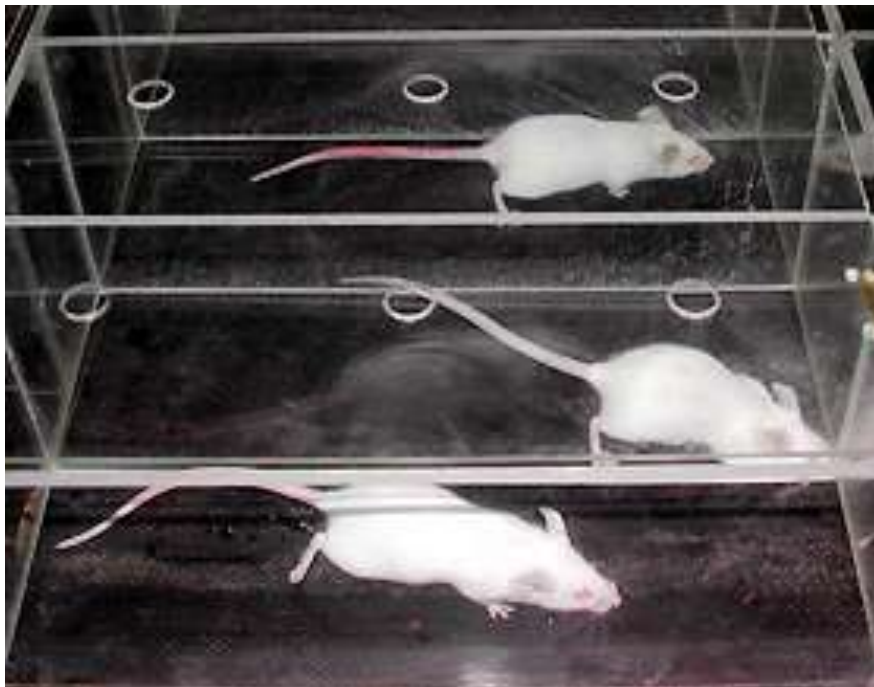


**Figura 2-** Procedimento de indução de lesão muscular, na região posterior do membro inferior direito, exatamente no músculo gastrocnêmio. O membro do animal foi mantido em posicionamento de extensão de joelho e a região muscular a ser lesionada foi posicionada cautelosamente abaixo do ponto de queda do dispositivo indutivo da lesão.

### **Realização dos exercícios físicos**

Os animais alocados no grupo exercício foram submetidos a um período de adaptação à caminhada, que consistiu de exercício diário a uma velocidade de 2cm/seg, por um período de 5 minutos/dia, por 10 dias, antes da indução da lesão. Utilizou-se um dispositivo de acrílico posicionado acima da esteira, com o intuito de induzir caminhada em linha reta, sem nenhum animal invadir o espaço de outro, com velocidade contínua e lenta, adaptada para exercício em ratos da espécie Wistars (Figura 3). A esteira utilizada foi da marca Movement®, e a metodologia do protocolo de exercício utilizada seguiu o recomendado para ratos (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017). A adaptação foi realizada para reduzir o estresse causado pela corrida sem promover alterações fisiológicas relativas ao treinamento físico.

Após o término dos 10 dias de treinamento de adaptação, os animais foram lesionados e realizaram exercícios de caminhada na esteira uma vez ao dia, com a mesma velocidade e horários, durante 5 minutos, todos os dias.



**Figura 3.** Realização de exercício de corrida na esteira ergométrica adaptada para ratos. Velocidade controlada de 2cm/seg com exercícios diários e duração de 5 minutos durante 3 ou 14 dias.

### **Eutanásia dos animais**

A eutanásia foi realizada sob prévia anestesia com solução de Cloridrato de quetamina (80 mg/Kg) e xilasina (15 mg/Kg), sendo administrado 1mL de tiopental intraperitoneal, conforme realizado no trabalho de Chang et al., (2018). A eutanásia foi realizada 3 dias após a indução da lesão, com o intuito de observar os componentes inflamatórios agudos e após 14 dias da indução da lesão, com o intuito de observar os componentes inflamatórios tardios.

### **Análise histológica**

Após eutanásia dos animais, o músculo a ser analisado foi fixado em formalina tamponada 10% por 48 horas. Após, foram desidratados em álcool 70% e clarificados

em xilol. Em seguida, foram inclusos em blocos de parafina e cortes longitudinais de 5µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo, foram obtidos 5 lâminas de cada bloco, com 3 cortes em cada lâmina. Os cortes foram dispostos em lâminas preparadas com polilisina e incubados a 50°C para aderência por 12 horas. Em seguida, foram lavados em xilol para a remoção do excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool.

Os cortes reidratados foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados com concentrações crescentes de álcool, lavados com xilol e cobertos com lamínulas para posterior análise microscópica (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013b). A avaliação dos resultados foi realizada pela mensuração histológica quantitativa do número de células por corte e classificou-se a presença de células em polimorfonucleares ou mononucleares e proporção de células inflamatórias na região da lesão, conforme Tabela 1.

A presença de infiltrado inflamatório foi quantificada com a escala utilizada por Amar et al. (2015) e Garcia et al. (2017), considerando 0 (ausência de inflamação), 1 (discreta inflamação), 2 (moderada inflamação) e 3 (quantidade elevada de infiltrado inflamatório). A análise objetivou identificar a presença de polimorfonucleares como neutrófilos, basófilos e eosinófilos. E mononucleares, células de atuação tardia no processo de reparo, tais como os linfócitos, monócitos e macrófagos. A análise foi realizada por um patologista experiente e capacitado para esse tipo de análise microscópica.

#### SCORE DE INFLAMAÇÃO

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>Ausência de inflamação</b>                        | 0 | Tecido semelhante ao normal  |
| <b>Discreta inflamação</b>                           | 1 | Pouca presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outras células.              |
| <b>Moderado infiltrado inflamatório</b>              | 2 | Elevada presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outras células.            |
| <b>Quantidade elevada de infiltrado inflamatório</b> | 3 | Intensa e populosa presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outras células. |

**Tabela 1.** Descrição da quantificação do nível inflamatório, realizada pelo analisador.

**Fonte:** Adaptado de Garcia et al., (2017) e Amar et al., (2015).

## **Análise da deposição de colágeno**

Com o intuito de analisar a presença de colágeno o músculo lesionado foi coletado e fixados em 10% de formalina neutra tamponada, por um período de 48 horas antes do processamento, sendo então embebidos em parafina, e realizados cortes longitudinais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Após, os cortes foram corados com picrossírius *fast green*. Imagens foram capturadas utilizando microscópio de luz polarizada em campo claro e campo escuro, de acordo com Miranda et al., (2015) e Sebben et al., (2012).

As imagens foram analisadas com software Image PRO Plus 7.0 no qual utilizou-se uma máscara como modelo e realizada varredura para identificar o total de fibras de colágeno maduro (CUNHA et al., 2014).

## **Determinação dos níveis de citocinas**

Para a obtenção do conteúdo líquido celular do material muscular, realizou-se o processo de maceração da peça. Para isso descongelou-se o material e a maceração ocorreu através de um homogenizador T25 digital ultra Turrax para obtenção do sobrenadante do conteúdo muscular na quantidade de 100mg/ml.

O sobrenadante do material macerado, foi utilizado para medir as seguintes citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), interferon gama ( $\text{IFN}\gamma$ ) e interleucina-1 (IL-1) e as seguintes citocinas anti-inflamatórias: fator de transformação do crescimento beta ( $\text{TGF}\beta 1$ ), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) todas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (eBiosciences, EUA). As placas foram lidas a 450nm usando leitor de placa ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO). Optou-se por analisar essas citocinas, por serem importantes moduladoras do processo inflamatório.

## **Análise imunohistoquímica (IHC)**

Para a realização da técnica de imunohistoquímica (IHC) foram confeccionadas lâminas como descritas acima para as análises histológicas e preparado anticorpos da marca Santa Cruz Biotech. A marcação foi realizada como descrito por Panis et al., (2011). Os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica Dako Pen<sup>®</sup> e realizado o

bloqueio das peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio 10% por 30 minutos, seguido de bloqueio de ligações inespecíficas por incubação em soro fetal 0,1% por 1 hora. Na sequência, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-CNOS (diluição 1:300), anti-NFkb (1:500) e anti-VEGF $\alpha$  (1:500) em câmara úmida *overnight* a 4°C. Após a incubação, as lamínas foram submetidas a 2 banhos (5 minutos) em PBS e em seguida, incubadas com anticorpo secundário. A marcação foi revelada pela incubação com 3,30-diaminobenzidina (DAB) por 1 min. Na última etapa, as seções foram fracamente contra-coradas com a hematoxilina de Harry (Merck). A intensidade e a localização da imunorreatividade com todos os anticorpos primários utilizados foram examinadas em todo o conteúdo da lâmina, utilizando um microscópio óptico. Para o estudo de análise de imagem, fotomicrografias coloridas de áreas representativas (ampliação de 400x) foram adquiridas digitalmente. Para a pontuação semiquantitativa, as imagens, em um total de 10 imagens para cada corte de cada animal foram avaliadas por meio da ferramenta de deconvolução de cores no software Image J (NIH, EUA). Pixels foram categorizados como descrito anteriormente por (CHATTERJEE et al., 2013), como fortes positivos (3+), positivos (2+), fracos positivos (1+) e negativos (0).

### **Análise estatística**

Para a análise estatística, utilizou-se o software Graphpad Prism versão 7. Realizou-se teste de normalidade de Kruskal-Wallis (95%) e para a realização das comparações entre os grupos, utilizou-se o teste estatístico de comparação multigrupos de Dunn's, considerando significância estatística  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

#### **1. Análise histológica quantitativa de polimorfonucleares e mononucleares do grupo controle positivo e dos grupos tratados com PRP, Exercício (EXE), ou PRP+EXE em lesão muscular ao 3º e 14º dia pós lesão.**

Inicialmente, foi analisada a quantidade e tipos celulares dos músculos tratados ou não com PRP, Exercício (EXE) ou PRP+EXE. Foi verificado que no 3º dia houve redução dos polimorfonucleares de todos os grupos tratados, quando comparados ao

controle e na análise da presença de células mononucleares somente o grupo lesão muscular tratado com EXE apresentou redução significativa. Na análise do músculo no 14<sup>o</sup> dia pós lesão, não houveram resultados significativos nem para polimorfonucleares nem para mononucleares. Conforme dados do quadro 1.

| <b>HEMATOXILINA e EOSINA</b> |                    |                 |                |               |                  |
|------------------------------|--------------------|-----------------|----------------|---------------|------------------|
| <b>3 dias</b>                |                    |                 |                |               |                  |
|                              |                    | <b>Controle</b> | <b>PRP</b>     | <b>EXE</b>    | <b>PRP + EXE</b> |
| Lesão Muscular               | Polimorfonucleares | 1 ± 0,23        | 0,14 ± 0,08*** | 0,42 ± 0,10** | 0,14 ± 0,05***   |
|                              | Mononucleares      | 2,48 ± 0,16     | 2,42 ± 0,21    | 1,28 ± 0,33*  | 1,85 ± 0,33      |
| <b>14 dias</b>               |                    |                 |                |               |                  |
|                              |                    | <b>Controle</b> | <b>PRP</b>     | <b>EXE</b>    | <b>PRP + EXE</b> |
| Lesão Muscular               | Polimorfonucleares | 0,12 ± 0,03     | 0,66 ± 0,20    | 1,6 ± 0,31    | 0,02 ± 0,01      |
|                              | Mononucleares      | 0,88 ± 0,21     | 1,16 ± 0,17    | 0,33 ± 0,11   | 0,02 ± 0,02      |

**Quadro 1.** Dados de média e desvio padrão, para as leituras microscópicas qualitativa de polimorfonucleares, e mononucleares, por coloração de hematoxilina e eosina dos grupos controle, tratado com PRP, tratado com exercício (EXE) e tratado com PRP associado ao exercício (PRP+EXE), para o grupo lesão muscular após 3 e 14 dias. As qualificações seguiram as descrições da tabela 1 supracitada. A análise foi feita por varredura completa do tecido. Cada grupo foi composto por 5 animais. \*Significância estatística ( $p < 0,05$ ). \*\*Significância estatística ( $p < 0,01$ ). \*\*\*Significância estatística ( $p < 0,001$ ).

A figura 4 ilustra as fotos representativas dos cortes histológicos para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) do músculo de ratos do grupo controle (C+) aos 3 e 14 dias, do grupo tratado com PRP (PRP) aos 3 e 14 dias, do grupo tratado com exercício (EXE) aos 3 e 14 dias e do grupo tratado com associação de PRP e exercício (PRP+EXE) aos 3 e 14 dias.

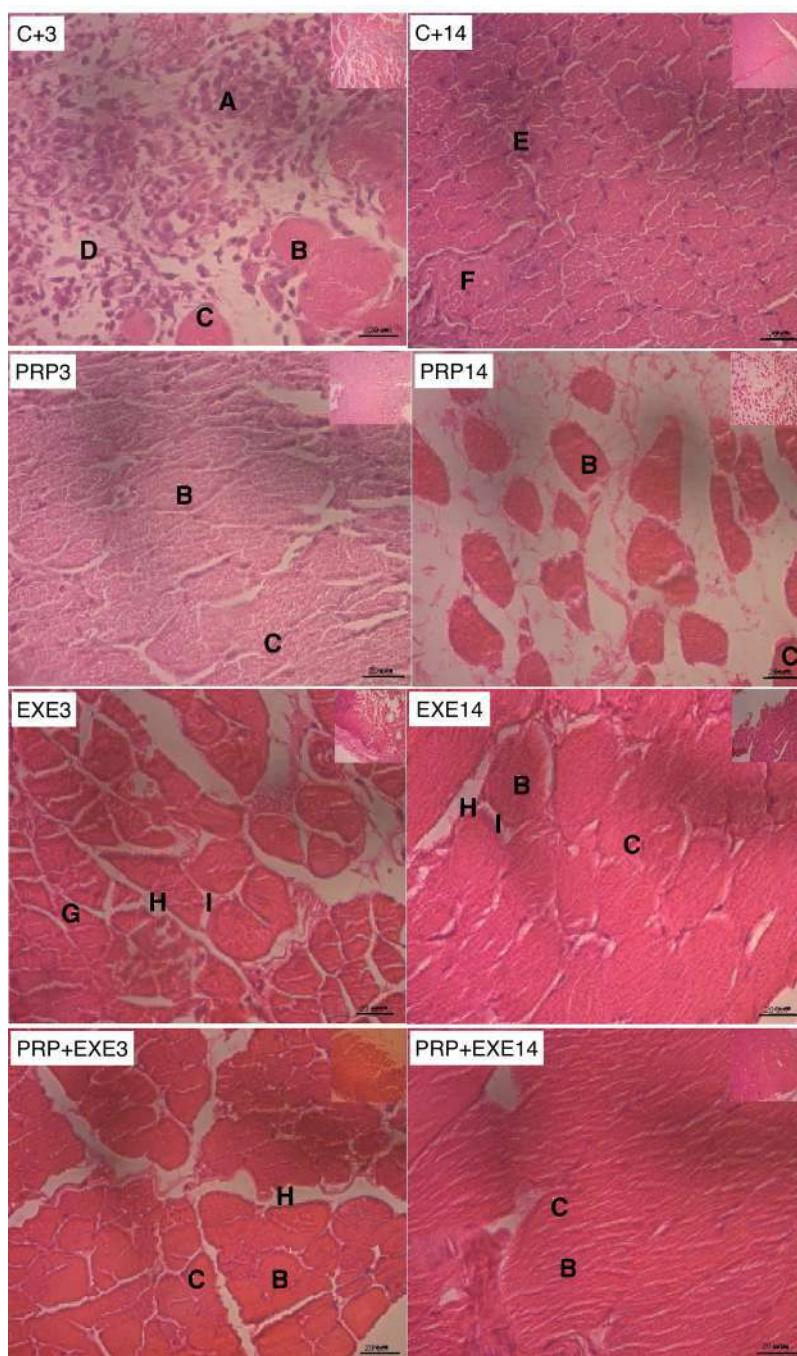
No grupo controle muscular positivo 3 dias (C+3) observa-se infiltrado inflamatório de neutrófilos e leucócitos, presença elevada de exsudato proteico e com

endomísio abundante, variações de diâmetros das fibras e fibras musculares atroficas na periferia. No grupo controle muscular positivo 14 dias (C+14) verificou-se a perda das delimitações das fibras musculares (perimísio e endomísio), aumento dos núcleos musculares e células polimorfonucleares como neutrófilos, eosinófilos e basófilos (figura 4).

No grupo PRP após 3 dias de lesão (PRP3) observa-se fibras musculares anguladas, infiltrado inflamatório na região central do tecido, fibras com variação de diâmetros (atroficas). Após 14 dias do grupo PRP (PRP14) observa-se alargamento do perimísio e fibras atrofiadas (figura 4).

A análise do grupo EXE3 nota-se a presença de necrose muscular, alterações na forma das fibras musculares, alargamento do perimísio, centralização de núcleos musculares e presença moderada de linfócitos. Na análise do 14º dia (EXE14) observa-se aspectos das fibras musculares em tamanho e forma normal, interligadas pelo feixe do perimísio e melhor preenchimento fibrilar (figura 4).

Ainda na figura 4 observa-se no grupo PRP+EXE3 as fibras musculares com aspectos normais, perimísio levemente afastados. Na análise do 14º dia (PRP+EXE14) o alinhamento das fibras musculares se faz presente, e o sentido das fibras pode ser visualizado com mais clareza.

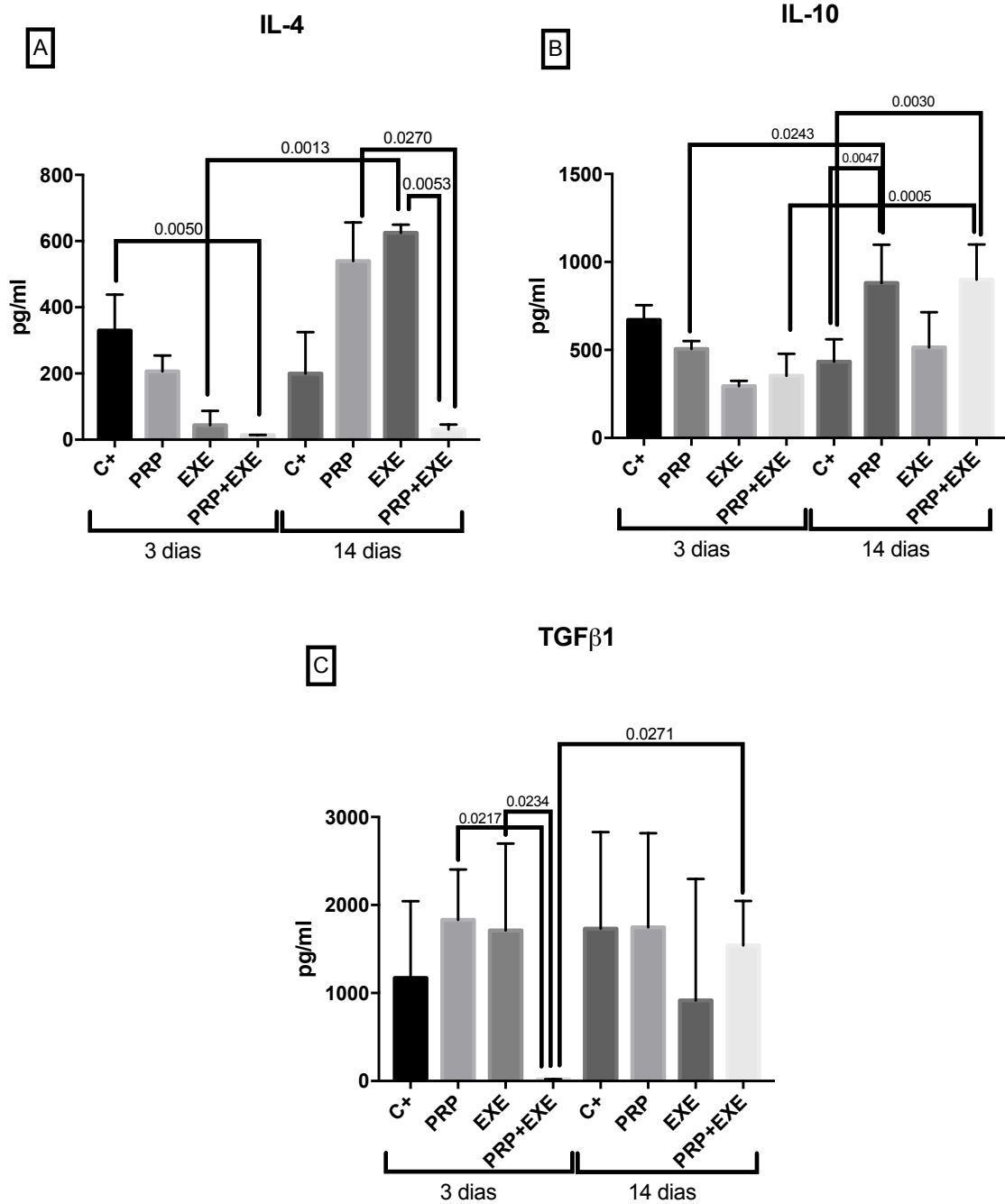


**Figura 4.** Análise do infiltrado inflamatório identificado pela presença de células polimorfonucleares e mononucleares em corte longitudinal do músculo de ratos dos grupos controle positivo 3 dias (C+3), controle positivo 14 dias (C+14), grupo tratado com PRP 3 dias (PRP3), grupo tratado com PRP 14 dias (PRP14), grupo tratado somente com exercício 3 dias (EXE3), grupo tratado somente com exercício 14 dias (EXE14), grupo tratado com associação de PRP+EXE 3 dias (PRP+EXE3) e grupo tratado com associação de PRP+EXE 14 dias (PRP+EXE14). Número total de 5 ratos para cada grupo. Coloração H.E. Foto em objetiva de 10x minimizada no canto superior direito e objetiva de 40x para focar o local em que foi realizada a análise. (a)

infiltrado inflamatório; (b) fibra muscular; (c) núcleo muscular; (d) infiltrado edematoso; (e) fibra com múltiplos núcleos; (f) fibra muscular desorganizada; (g) fibra muscular afinada; (h) perímio; (i) endomíio alargado com necrose muscular.

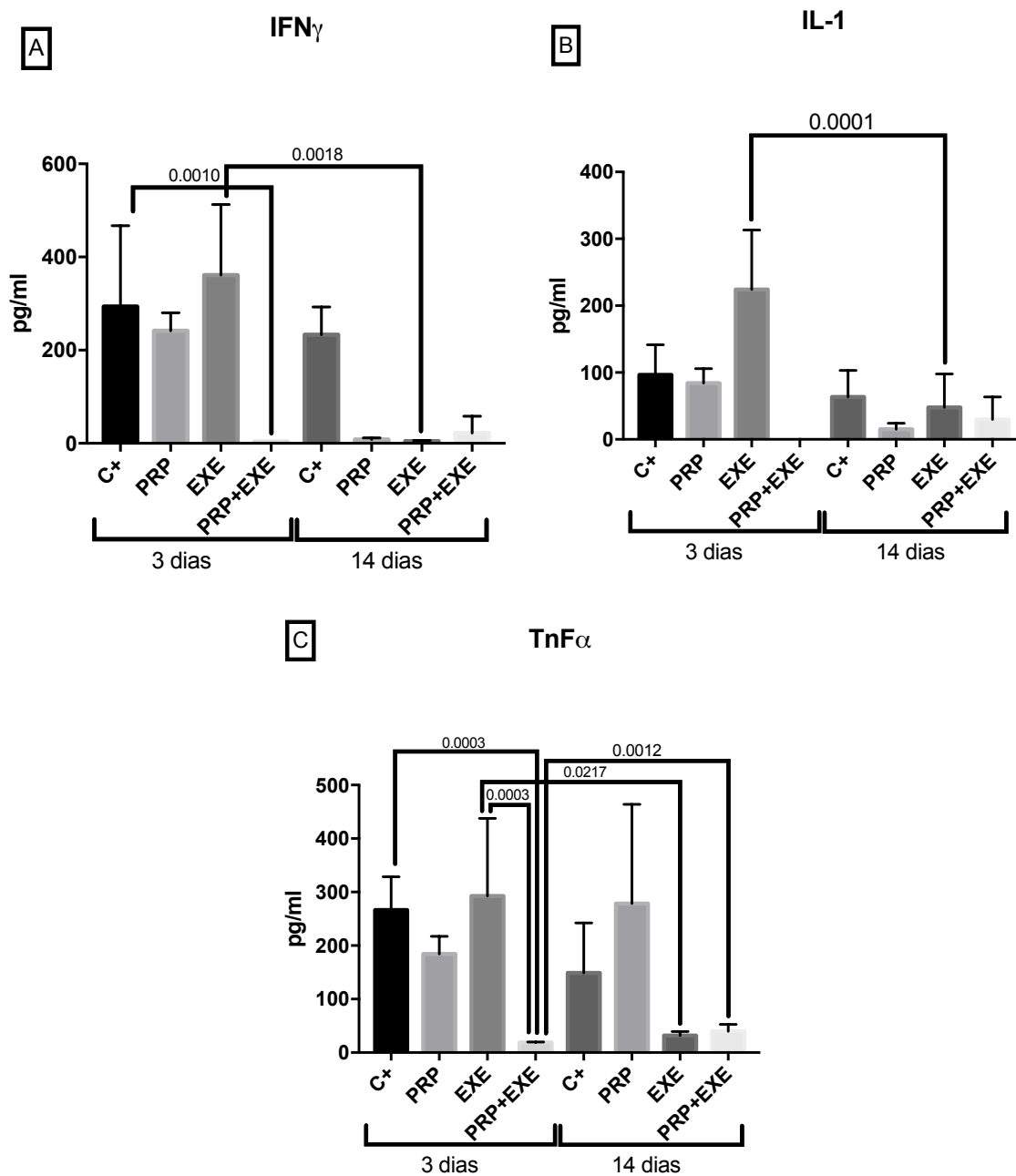
## **2. Análise da produção de citocinas (ELISA) na lesão muscular do grupo controle positivo e dos grupos tratados com PRP, EXE e PRP+EXE no 3° e 14° dias pós lesão.**

Abaixo, seguem descritas primeiramente as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e TGF $\beta$ 1. O comportamento da citocina IL-4 no músculo ao 3° e 14° dia pode ser observada na figura 5A, onde obteve-se significância estatística para a análise intragrupo entre EXE3 e EXE14 com p-valor de 0.0013. Já na comparação multigrupos, obteve-se diferença significativa entre C+3 e PRP+EXE-3 com p=0.0050, PRP14 e PRP+EXE14 com p-valor de 0,0270 e EXE14 com PRP+EXE14 com p-valor de 0,0053. Na figura 5B estão dispostos os valores médios e desvio padrão para análise da IL-10. Na análise intragrupo, obteve-se diferença estatística entre PRP3 e PRP14 com p-valor de 0.0243 e entre os grupos PRP+EXE3 e PRP+EXE14 o p-valor foi de 0,0005. Na análise multigrupos observa-se que PRP14 (p=0,0047) e PRP+EXE14 (p=0,0030) aumentaram significativamente os valores em relação ao seu controle (C+14). Observa-se que os valores médios da IL-10 no 14° dia foram maiores do que os valores dessa citocina no 3° dia pós lesão. Os valores para a citocina TGF $\beta$ 1 estão dispostos em média e desvio padrão na figura 5C onde observa-se na análise intragrupo PRP+EXE3 e PRP+EXE14 que houve um aumento significativo da produção da citocina TGF $\beta$ 1 com p-valor de 0,0271. Já na comparação multigrupos, obteve-se significância entre os grupos PRP3 e PRP+EXE3 com p-valor de 0,0217 e entre os grupos EXE3 e PRP+EXE3 com p-valor de 0,0234.



**Figura 5.** Valores da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 (A), IL-10 (B) e TGFβ1 (C) em picograma por mililitro no músculo de ratos, para o grupo lesão muscular ao 3<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias tratados ou não com PRP, EXE e PRP+EXE. Análise de comparação intragrupo (mesmo tratamento 3 e 14 dias) e comparação multigrupos no mesmo tempo de lesão (Teste estatístico de comparação de Dunn's  $p < 0,05$ ). Número de 5 animais para cada grupo.

A seguir seguem descritas a expressão das citocinas pró-inflamatórias  $IFN\gamma$ , IL-1 e  $TNF\alpha$ . Na figura 6A encontram-se os valores médios e desvio padrão da citocina  $IFN\gamma$  que na análise intragrupo EXE3 e EXE14 houve uma diminuição estatisticamente significativa com p-valor foi de 0.0018. Na análise multigrupos obteve-se diminuição dos valores de  $IFN\gamma$  do grupo PRP+EXE3 em relação ao seu controle C+3 com p-valor 0,0010. Observa-se ainda na figura abaixo, que os valores de produção de  $IFN\gamma$  no 3º dia foram maiores se comparados aos valores no período tardio de 14 dias. Os valores de IL-1 podem ser verificados na figura 6B, que demonstra as médias e o desvio padrão em cada grupo. Na comparação intragrupo de EXE3 e EXE14 o p-valor foi 0,0001. A citocina  $TNF\alpha$  pode ser visualizada em seus valores médios e desvio padrão na figura 6C, onde observou-se na análise intragrupos uma diminuição significativa do grupo EXE3 para EXE14 ( $p=0,0217$ ) e um aumento significativo do grupo PRP+EXE3 para PRP+EXE14 ( $p= 0,0012$ ). Na análise intergrupos houve uma diminuição na produção de  $TNF\alpha$  do grupo PRP+EXE3 em relação ao seu controle 3 dias (C+3) com p-valor 0,0003. E entre EXE3 e PRP+EXE3 com p-valor de 0,0003.



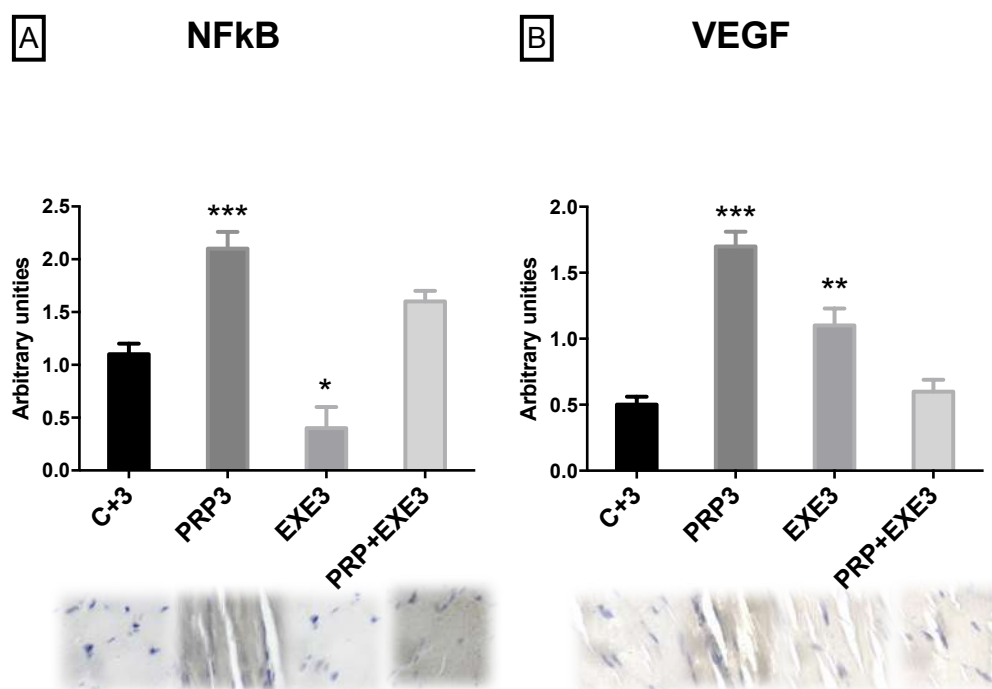
**Figura 6.** Valores da produção das citocinas pró-inflamatórias IFN $\gamma$  (A), IL-1 (B) e TNF $\alpha$  (C) em picograma por mililitro no músculo de ratos, para o grupo lesão muscular ao 3<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias tratados ou não com PRP, EXE e PRP+EXE. Análise de comparação intragrupo (mesmo tratamento 3 e 14 dias) e comparação multigrupos no mesmo tempo de lesão (Teste estatístico de comparação de Dunn's  $p < 0,05$ ). Número de 5 animais para cada grupo.

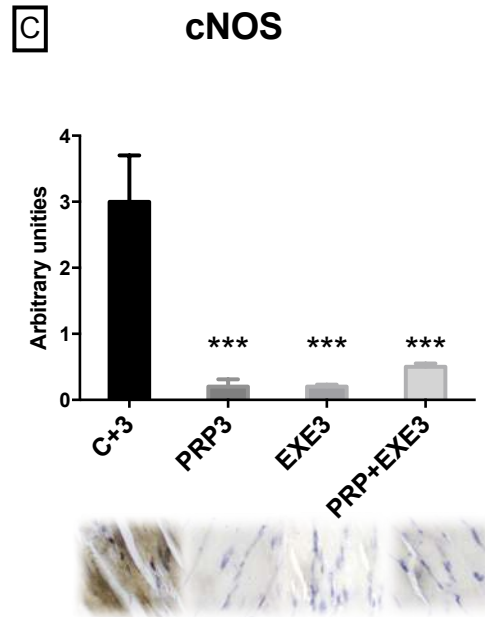
### 3. O tratamento com PRP, EXE e PRP+EXE altera a produção de mediadores pró inflamatórios analisados por Imunohistoquímica (IHC) no 3<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias

Realizou-se a análise de 3 proteínas através da técnica de IHC, todas envolvidas no processo de cicatrização: NFκB(p65), VEGF e cNOS. Os dados referentes às médias e desvios-padrão de todos os grupos experimentais para cada marcador analisado estão apresentados abaixo.

Na figura 7 (A, B e C) a seguir, apresenta-se os resultados das comparações entre os grupos analisados. Para a **lesão muscular avaliada em 3 dias**, observa-se que o exercício foi capaz de reduzir a expressão do NFκB (figura 7A) em comparação ao grupo controle positivo sem tratamento. Por outro lado, o grupo tratado somente com PRP no 3º dia aumentou a expressão deste marcador em relação ao C+3.

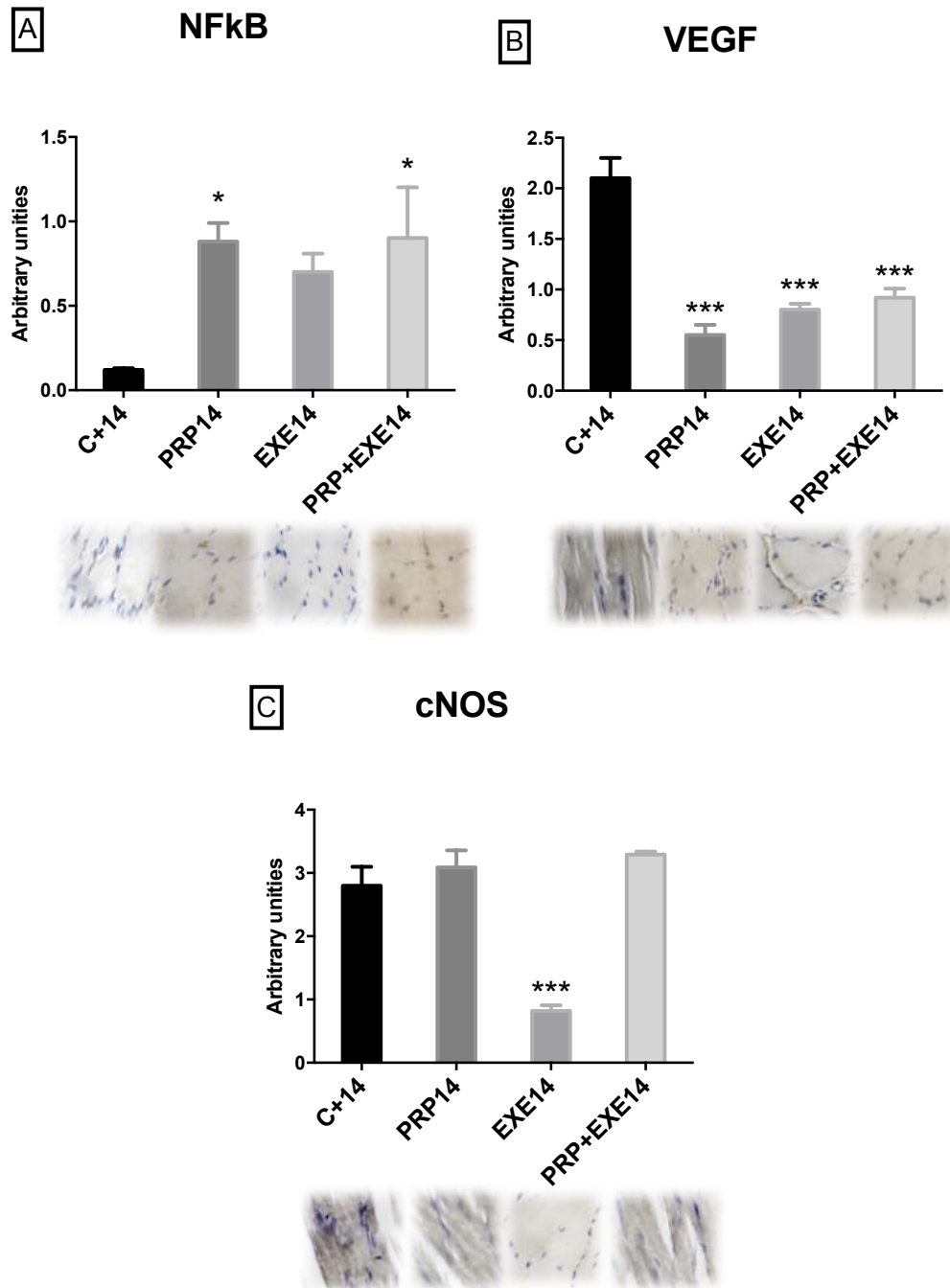
Os níveis de VEGF (figura 7B), foram aumentados tanto pelo exercício como pelo tratamento com PRP e não foi alterado pela associação EXE+PRP3. A figura 7(C) ilustra a expressão dos níveis de cNOS que foram significativamente reduzidos em todos os tratamentos.





**Figura 7.** Expressão dos níveis das proteínas analisadas no músculo de ratos após indução da lesão em 3 dias. (A) Expressão dos níveis de NFkB, (B) VEGF e cNOS (C). Grupo controle positivo (C+3), Grupo tratado com PRP (PRP3), grupo tratado com exercício isolado (EXE3) e grupo tratado com associação PRP+EXE (PRP+EXE3). Cada grupo foi composto por 5 animais. \*Significância estatística ( $p < 0,05$ ). \*\*Significância estatística ( $p < 0,01$ ). \*\*\*Significância estatística ( $p < 0,001$ ).

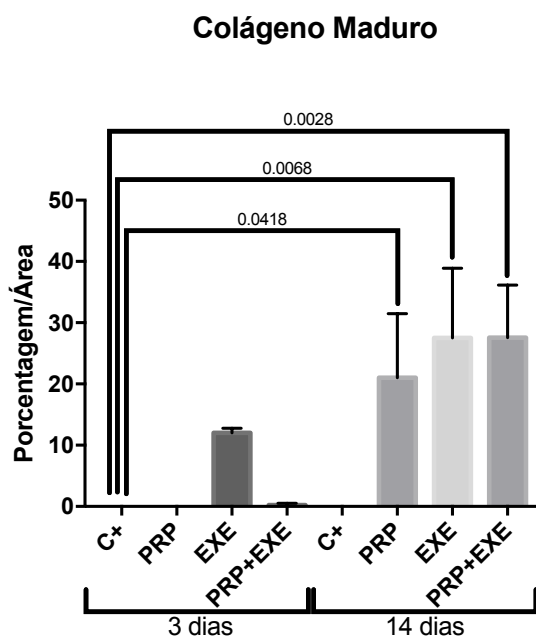
Na figura 8 (A, B e C) apresenta-se os resultados das comparações entre os grupos analisados. Para a **lesão muscular avaliada em 14 dias**, observou-se na figura 8A, que o tratamento com PRP isoladamente ou com a associação EXE+PRP promoveu aumento significativo dos níveis de NFkB. O VEGF (figura 8B) apresentou-se significativamente reduzido em todas intervenções. Já os níveis de cNOS (figura 8C), variaram significativamente apenas no grupo EXE14.



**Figura 8.** Expressão dos níveis das proteínas analisadas no músculo de ratos após indução da lesão em 14 dias. (A) Expressão dos níveis de NFκB, (B) VEGF e cNOS (C). Grupo controle positivo (C+14), Grupo tratado com PRP (PRP14), grupo tratado com exercício isolado (EXE14) e grupo tratado com associação PRP+EXE (PRP+EXE14). Cada grupo foi composto por 5 animais. \*Significância estatística ( $p < 0,05$ ). \*\*\*Significância estatística ( $p < 0,001$ ).

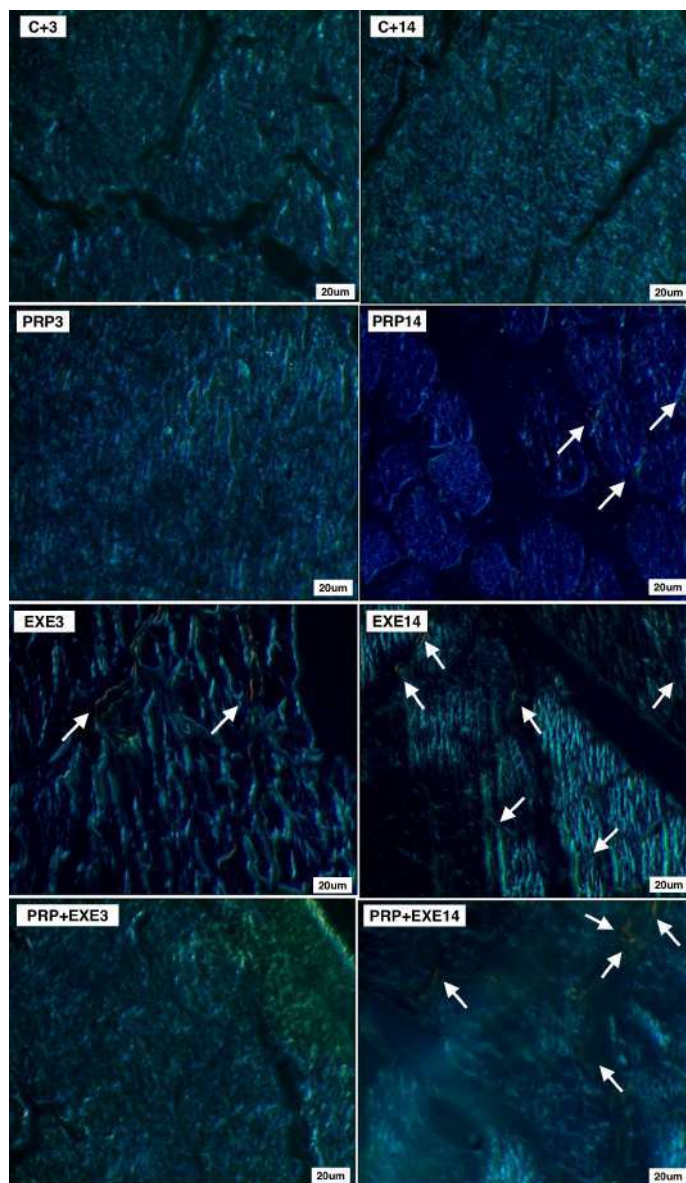
#### 4. Deposição de colágeno na lesão muscular tratada ou não com PRP, EXE ou PRP+EXE no 3° e 14° dias.

Em relação à deposição de colágeno, a figura 9 ilustra os valores de média e desvio padrão da quantidade de colágeno maduro em porcentagem por área analisada dos grupos com lesão muscular tratados ou não com PRP, EXE e PRP+EXE no 3° dia e no 14° dia pós lesão. Verifica-se que a quantidade de fibras de colágeno no 3° dia foi menor se comparado a quantidade de colágeno no 14° dia. Obtendo-se um aumento estatisticamente significativo na comparação multigrupos entre controle positivo 3 dias (C+3) com os grupos tratados com PRP14 ( $p=0,0418$ ), EXE14 ( $p=0,068$ ) e PRP+EXE14 ( $p=0,0028$ ).



**Figura 9.** Análise do efeito da terapia PRP, EXE e PRP+EXE na quantidade de colágeno maduro do músculo de ratos após 3 e 14 dias de lesão. Cada grupo foi composto por 5 animais. Dados representam média e desvio padrão dos grupos controle positivo (C+) grupo tratado com PRP (PRP), grupo tratado com exercício (EXE), grupo tratado com associação PRP+EXE (PRP+EXE), grupo controle positivo (C+), grupo tratado com PRP (PRP), grupo tratado com exercício (EXE) e grupo tratado com associação PRP+EXE (PRP+EXE). Teste estatístico de comparação multigrupos de Dunn's para  $p<0,05$ .

A figura 10 ilustra as fotos microscópicas representativas de cortes longitudinais de músculo de ratos para análise da quantidade de colágeno com coloração de picrossírius, dos grupos controle, tratado com PRP, tratado com EXE e tratado com PRP+EXE, após 3 e 14 dias.



**Figura 10.** Fotografias microscópicas com coloração picrossírius *fast green* do músculo gastrocnêmio de ratos analisado em corte longitudinal dos grupos controle positivo 3 dias (C+3), controle positivo 14 dias (C+14), grupo tratado com PRP 3 dias (PRP3), grupo tratado com PRP 14 dias (PRP14), grupo tratado somente com exercício 3 dias (EXE3), grupo tratado somente com exercício 14 dias (EXE14), grupo tratado com associação de PRP+EXE 3 dias (PRP+EXE3) e grupo tratado com associação de PRP+EXE 14 dias (PRP+EXE14). Observa-se a presença de fibras de colágeno

identificado pela seta no local em que localizam-se as fibras de colágeno maduro com coloração vermelha. Foto em objetiva de 40x.

## **Discussão**

No presente trabalho pôde-se observar de forma geral que os tratamentos com PRP, EXE e PRP+EXE tanto na fase aguda quanto na fase tardia, são fundamentais para a cicatrização do músculo, uma vez que altera a produção de citocinas e de mediadores envolvidos no processo inflamatório.

Analisando o músculo lesionado de ratos, nota-se que todos os grupos tratados apresentaram redução significativa no perfil celular inflamatório de polimorfonucleares na fase aguda (3 dias) quando comparado ao controle. Este resultado está de acordo com Garcia et al., (2017) que verificaram os efeitos do tratamento com PRP na lesão muscular traumática da panturrilha de trinta e cinco ratos. Os autores enfatizam que terapias que estimulam a proliferação celular e a produção de fatores de crescimento tais como a aplicação de plaquetas autólogas, a prática de exercícios ou até mesmo a aplicação de luz estimuladora no local da lesão, induz melhores resultados clínicos que animais controle. Os autores justificam esse mecanismo através da capacidade terapêutica das técnicas associadas ao PRP em estimular a ação de cicatrização do músculo estimulando um maior aporte vascular no local da lesão.

Contreras-Meñoz et al. (2017) analisaram os efeitos da aplicação do PRP associado ao exercício físico em esteira e investigaram os resultados no período tardio de 14 dias. Os autores encontraram resultados semelhantes ao presente trabalho, principalmente no que se refere ao efeito na melhora da cicatrização da área lesionada e enfatizam que a ação do PRP autólogo aplicado no local da lesão induz maior ação de leucócitos e células brancas, que garantem resistência natural aos fatores envolvidos no processo inflamatório, potencializando a ação de combate à gentes agressores, permitindo resposta de cicatrização acelerada da lesão muscular. Os achados dos autores supracitados corroboram com os achados do presente trabalho que demonstrou que a aplicação do PRP diminuiu significativamente a quantidade de células polimorfonucleares, permitindo afirmar que o PRP isolado, ou associado ao exercício, assim como a realização isolada do exercício propicia redução do infiltrado inflamatório polimorfonuclear no musculo lesionado de ratos.

Analisando o grupo tratado com PRP+EXE observa-se que a associação desses tratamentos induziu uma diminuição de IL-4, tanto na fase aguda, quanto na fase tardia da lesão muscular, tais achados permitem afirmar que o exercício físico associado a aplicação do PRP possui propriedades pró-inflamatórias inerentes a associação dessas terapias, pois a aplicação das terapias de forma isolada não apresentou essa redução, dessa que é uma citocina de perfil Th2. Esses achados vão de encontro com Niu e Ro (2011) que também encontraram uma diminuição de IL-4 em lesão muscular de ratos, os autores descrevem que essa diminuição de IL-4 regula positivamente os receptores opióides periféricos sob condições inflamatórias e descrevem que essa redução de IL-4 esta relacionada com a baixa proliferação celular, fator esse que pode ser positivo na aceleração da cicatrização das lesões musculares.

Outra informação relevante, refere-se ao aumento de VEGF na fase inicial do processo lesivo do músculo de ratos nos grupos tratados com PRP e tratados com EXE de forma isolada, já na fase tardia, todos os grupos reduziram significativamente a expressão de VEGF. Segundo Chicharro-Alcantara et al. (2018), esses achados se justificam devido ao fato de VEGF ser uma proteína responsável pela síntese de neovascularização e participar ativamente na formação de capilares que permitem a chegada de outras células importantes acelerando o processo de cicatrização, elevando dessa forma os valores de expressão dessa proteína na fase inicial. Já a diminuição de VEGF na fase tardia, pode ser justificada devido a diminuição da neovascularização necessária nesta fase, para conter o processo de extravasamento de liquido e propiciar a produção de cicatriz para remodelagem das fibras.

Segundo Rovere-Querini; Clementi; Brunelli (2014) o óxido nítrico (NO) é um mensageiro gasoso envolvido em mecanismos responsáveis por preservar a função muscular e estimular a reparação muscular. Em processos fisiológicos a produção de NO vem majoritariamente da cNOS, por isso se associa o papel da cNOS à cicatrização. No presente trabalho notou-se que todos os grupos tratados diminuíram cNOs na fase inicial, tal fator pode ser justificado pela possível ativação de outras vias nessa fase aguda, tal como iNOS que se trata de uma enzima presente quando há lesão e inflamação e que não foi dosada no presente trabalho. Já na fase tardia, nota-se que apenas o grupo EXE foi capaz de reduzir cNOS, fator esse que segundo Dietrich (2002) pode estar associado as características fisiológicas do exercício, pois

essa forma de intervenção pode levar mais tempo para manter ou elevar níveis de cNOS.

A insignificante produção de IL-1, bem como as reduções significativas de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , foram induzidas pela realização da associação entre PRP+EXE na fase aguda da lesão muscular demonstrando comportamento sinérgico entre essas citocinas e permitindo afirmar que o tratamento associado entre PRP+EXE na fase aguda induz uma ação anti-inflamatória, evidenciada pela baixa produção das citocinas supra citadas. Nota-se que na fase aguda a associação de PRP+EXE gerou uma diminuição estatisticamente significativa de TGF $\beta$ 1, comportamento esse que não ocorreu nos grupos tratados de forma isolada com PRP ou com EXE, demonstrando que a associação das terapias potencializou a ação pró-inflamatória nesta fase tardia e acelerou o reparo da região muscular lesionada (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013b)

A aceleração do processo inflamatório se traduz segundo Garcia et al. (2017), em remodelamento das fibras do músculo lesionado, esse remodelamento passa pela síntese e deposição de fibras de colágeno no local da lesão. As fibras de colágeno aumentadas no músculo previamente lesado permitem afirmar que o processo de cicatrização foi efetivo e que a ação fibroblástica sintetizou colágeno para realinhamento das fibras lesionadas. No presente trabalho observou-se que os grupos PRP, EXE e PRP+EXE, mantiveram quantidades menores de fibras de colágeno aos 3 dias pós lesão se comparado ao 14<sup>o</sup> dia pós lesão, pois esse é um período agudo de lesão, período em que outros fenômenos são mais presentes, tais como a neovascularização, que foi visualizada pelo aumento de VEGF no grupo C+3 e no grupo EXE3. Porém ao observarmos os achados do presente estudo no 14<sup>o</sup> dia pós lesão nota-se um aumento significativo na quantidade de colágeno em todos os grupos tratados, demonstrando que a ação remodeladora do tecido ocorre em uma fase mais tardia da lesão muscular.

Cunha et al. (2014) objetivaram demonstrar o efeito regenerativo do PRP em associação com o exercício físico na cicatrização do músculo vasto lateral de 20 ratos. A quantidade de fibras de colágeno foi medida pelas cores polarizadas em cortes musculares e os autores destacam uma maior quantidade de fibras de colágeno maduro no tecido muscular após a aplicação do PRP e da realização de exercício. Tais achados vão de encontro com os resultados obtidos na presente pesquisa, pois

ênfatizam a capacidade do PRP em aumentar a síntese de fibroblastos por estimular fatores de crescimento vascular e epitelial, aumentando assim a quantidade de fibras de colágeno no local da lesão. De fato, esse aumento de forma desorganizada seria prejudicial para o tecido, pois segundo os autores, isso geraria maiores aderências cicatriciais e menor mobilidade ao músculo, por isso se justifica a realização de exercício físico associado a aplicação do PRP, essa associação atua de forma efetiva na cicatrização permitindo maior mobilidade e melhor funcionalidade ao músculo.

## Conclusão

Na fase aguda para lesão muscular traumática de ratos a realização de EXE, PRP e PRP+EXE reduz a quantidade de células inflamatórias e aumenta o aporte sanguíneo no local da lesão, propiciando melhor reparo articular. Dentre os tratamentos impostos a associação PRP+EXE apresentou melhores resultados nas citocinas analisadas se comparado aos tratamentos isolados.

Na fase tardia todos os grupos tratados diminuíram o edema articular traduzida pela diminuição de VEGF e somente a associação PRP+EXE apresentou características pró-inflamatória enquanto as terapias isoladas parecem apresentar padrão anti-inflamatório.

## Referências

AFSHARNIA, M. et al. *Electronic Physician* ( ISSN : 2008-5842 ). n. November, p. 3248–3256, 2016.

AMAR, E. et al. Platelet-rich plasma did not improve early healing of medial collateral ligament in rats. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 135, n. 11, p. 1571–1577, 2015.

BECK, J. et al. The biomechanical and histologic effects of platelet-rich plasma on rat rotator cuff repairs. **American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p. 2037–2044, 2012.

CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013a.

CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico

em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013b.

CHANG, N. J. et al. Therapeutic Effects of the Addition of Platelet-Rich Plasma to Bioimplants and Early Rehabilitation Exercise on Articular Cartilage Repair. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 9, p. 2232–2241, 2018.

CHATTERJEE, S. et al. Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.

CHICHARRO-ALCÁNTARA, D. et al. Platelet rich plasma: New insights for cutaneous wound healing management. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.

COCKS, M.; WAGENMAKERS, A. J. M. The effect of different training modes on skeletal muscle microvascular density and endothelial enzymes controlling NO availability. v. 8, n. July 2014, p. 2245–2257, 2016.

COLE, B. J. et al. Hyaluronic Acid Versus Platelet-Rich Plasma. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 2, p. 339–346, 2017.

CONTRERAS-MUÑOZ, P. et al. Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats but Are Not Synergistic When Combined. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 2131–2141, 2017.

COŞKUN, Ş. et al. Effect of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) on nitric oxide production and lipid peroxidation in oral mucosal wound healing. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 1, p. 23–28, 2011.

CRÓNICAS, T. Plasma Rico em Plaquetas : Alternativa Terapêutica. 2016.

CUNHA, R. C. et al. Effect of platelet-rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 1879–1881, 2014.

DALGLEISH, T. et al. [ **No Title** ]. [s.l.: s.n.]. v. 136

DALLAUDIERE, B. et al. Combined intra-tendinous injection of Platelet Rich Plasma and bevacizumab accelerates and improves healing compared to Platelet Rich Plasma in tendinosis: Comprehensive assessment on a rat model. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 3, p. 351–356, 2014.

DENAPOLI, P. M. A. et al. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1962–1971, 2016.

DIETRICH, W. D. Temporal and Segmental Distribution of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases after Traumatic Spinal Cord Injury : Effect of Aminoguanidine

Treatment. v. 19, n. 5, p. 639–651, 2002.

DOS ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 5, p. 975–983, 2017.

DUFFIELD, J. S. et al. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, n. 1, p. 241–276, 2013.

FILGUEIRAS, R. R. et al. Platelet rich plasma associated with heterologous fresh and thawed chondrocytes on osteochondral lesions of rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 168–176, 2014.

GARCIA, T. A. et al. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 21, n. 6, p. 425–433, 2017.

GONZALEZ, A. C. D. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.

GRANDE, D. A. et al. Articular Cartilage Repair: Where We Have Been, Where We Are Now, and Where We Are Headed. **Cartilage**, v. 4, n. 4, p. 281–285, 2013.

GREAVES, N. S. et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 206–217, 2013.

GUEDES, R. N.; MARIA, R.; SERPA, G. A rtigo O riginal. v. 45, n. 2, p. 1731–1735, 2011.

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

HAMID, M. S. A.; YUSOF, A.; MOHAMED ALI, M. R. Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2014.

HASAN, S. et al. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff healing in a rat model. **Int J Sports Med**, p. Epub ahead of print, 2015.

HERMETO, L. C. et al. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 789–794, 2012.

HOTFIEL, T. et al. Nonoperative treatment of muscle injuries - recommendations from the GOTS expert meeting. **Journal of experimental orthopaedics**, v. 5, n. 1, p. 24, 2018.

KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016a.

- KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016b.
- LENZA, M. et al. Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 122–127, 2013.
- MALAVOLTA, E. A. et al. Plasma rico em plaquetas no reparo artroscópico das roturas completas do manguito rotador. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 6, p. 741–747, 2012.
- MANDUCA, M. L.; STRAUB, S. J. Effectiveness of PRP Injection in Reducing Recovery Time of Acute Hamstring Injury: A Critically Appraised Topic. **Journal of Sport Rehabilitation**, p. 1–19, 2017.
- MAZZOCCA, A. D. et al. The Positive Effects of Different Platelet-Rich Plasma Methods on Human Muscle, Bone, and Tendon Cells. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1742–1749, 2012.
- MEADOWS, M. C. et al. Effects of Platelet-Rich Plasma and Indomethacin on Biomechanics of Rotator Cuff Repair. **American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)**, v. 46, n. 5, p. E336–E343, 2017.
- MILLER, R. E.; MILLER, R. J.; MALFAIT, A. M. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 185–193, 2014.
- MIRANDA, M. M. et al. Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.
- NGUYEN, Q. T.; JACOBSEN, T. D.; CHAHINE, N. O. Effects of Inflammation on Multiscale Biomechanical Properties of Cartilaginous Cells and Tissues. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2644–2656, 2017.
- NIU, K. Y.; RO, J. Y. Changes in intramuscular cytokine levels during masseter inflammation in male and female rats. **Neuroscience Letters**, v. 487, n. 2, p. 223–227, 2011.
- PALACIO, E. P. et al. Efeitos do plasma rico em plaquetas na epicondilite lateral do cotovelo: Estudo prospectivo, randomizado e controlado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 51, n. 1, p. 90–95, 2016.
- PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 58–65, 2011.

- PARKER, L. et al. Age and sex differences in human skeletal muscle fibrosis markers and transforming growth factor- $\beta$  signaling. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 7, p. 1463–1472, 2017.
- PAS, H. I. M. F. L. et al. Efficacy of rehabilitation (lengthening) exercises, platelet-rich plasma injections, and other conservative interventions in acute hamstring injuries: An updated systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 18, p. 1197–1205, 2015.
- PATEL, S. et al. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: A prospective, double-blind, randomized trial. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 2, p. 356–364, 2013.
- PLENTZ, R. D. M. et al. Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 6, p. 488–494, 2008.
- PRESTES, A. N. et al. Effect of platelet-rich plasma on muscle injuries associated with physical exercise. v. 53, n. 2, p. 81–86, 2012.
- QUARTEIRO, M. L. et al. O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 5, p. 586–595, 2015.
- ROVERE-QUERINI, P.; CLEMENTI, E.; BRUNELLI, S. Nitric oxide and muscle repair : Multiple actions converging on therapeutic efficacy. v. 730, p. 181–185, 2014.
- SAUCEDO, J. M. et al. Platelet-rich plasma. **Journal of Hand Surgery**, v. 37, n. 3, p. 587–589, 2012.
- SCHÄR, M. O. et al. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, n. 5, p. 1635–1643, 2015.
- SCHIPPINGER, G. et al. Autologous Platelet-Rich Plasma Preparations: Influence of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Platelet Function. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1–6, 2015.
- SEBBEN, A. D. et al. Estudo comparativo do uso isolado de plasma rico em plaquetas e combinado com cimento de alfa-fosfato tricálcico no reparo ósseo em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 4, p. 505–512, 2012.
- SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 847–852,

2012.

TATLER, A. L. et al. Integrin  $\alpha$ 5-Mediated TGF- $\beta$  Activation by Airway Smooth Muscle Cells in Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 11, p. 6094–6107, 2011.

TRUFLANDIER, K. et al. Mechanical ventilation modulates pro-inflammatory cytokine expression in spinal cord tissue after injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 671, n. November 2017, p. 13–18, 2018.

UÉBEC, C. E. D. U. Guide de reconnaissance. v. 61, p. 260–265, 2008.

VASCONCELOS, S.; FERNANDA, R. Resistance exercise , muscle damage and inflammatory response “ what doesn ’ t kill you makes you stronger ”. **MOJ Sports Medicine**, v. 2, n. 2, p. 70–72, 2018.

VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, T. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Rev. bras. cir. plást.**, v. 25, n. 4, p. 589–594, 2010.

VETRANO, M. et al. Platelet-rich plasma versus focused shock waves in the treatment of Jumper’s knee in athletes. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 795–803, 2013.

WANG, T. Y.; CHEN, D. Differential roles of TGF- $\beta$  signalling in joint tissues during osteoarthritis development. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 11, p. e72–e72, 2016.

WASTERLAIN, A. S. et al. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013a.

WASTERLAIN, A. S. et al. The Systemic Effects of Platelet-Rich Plasma Injection. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013b.

WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 825–853, 2016.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–1040, 2012.

YANG, J.; LU, Y.; GUO, A. Platelet-rich plasma protects rat chondrocytes from interleukin-1induced apoptosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4075–4082, 2016.

ZHANG, J. et al. The combined use of kartogenin and platelet-rich plasma promotes fibrocartilage formation in the wounded rat Achilles tendon entheses. **Bone and Joint Research**, v. 6, n. 4, p. 231–244, 2017.

### 4.3 ARTIGO 3: PERFIL DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM LESÃO ARTICULAR DE RATOS SOB APLICAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E DO EXERCÍCIO FÍSICO.

Wagner Menna Pereira, Fernanda Tomiotto Pelissier, Milena Menegazzo Miranda-Sapla, Carolina Panis, Ivo Ilvan Kerppers, Wander Rogério Pavanelli

#### Resumo

**Introdução:** O Plasma Rico em Plaquetas (PRP), é uma técnica altamente utilizada em procedimentos biológicos, por gerar fatores de crescimento que aumentam e aceleram o processo de reparo das lesões articulares. A realização de exercícios (EXE), atualmente é utilizada na área de reabilitação, para acelerar o processo de reparo das lesões e devolver a capacidade funcional das articulações. O presente estudo, teve como objetivo analisar o efeito biológico da terapia com PRP, Exercício (EXE) ou PRP+EXE em lesão articular através da análise quantitativa de células inflamatórias, caracterizar a deposição de colágeno e avaliar a produção de citocinas nos modelos de lesões induzidas em ratos, na fase aguda (3 dias) e tardia (14 dias). **Materiais e Métodos:** Foram incluídos 40 ratos wistars, divididos em grupos controle (n=10), PRP (n=10), EXE (n=10) ou PRP+EXE (n=10). O PRP foi obtido por centrifugação do sangue autólogo, e inserido imediatamente após a lesão no local lesionado. A lesão foi induzida na região capsular da articulação do joelho direito de todos os ratos realizou-se sob prévia anestesia, seguido pela injeção de Adjuvant de Freud na quantidade de 50µl e a realização do exercício físico se deu em esteira ergométrica adaptada, com duração de 5 minutos, 1 vez por dia, todos os dias em velocidade de 2cm/seg. **Resultados:** Na fase aguda houve redução de polimorfonucleares nos grupos EXE e associação entre PRP+EXE. Além disso, todos os grupos tratados na fase aguda reduziram NFκB, TGFβ1 e VEGF. Já na fase tardia o tratamento com PRP aumentou VEGF, enquanto que o PRP isolado aumentou NFκB e diminuiu a quantidade de células mononucleares assim como a associação PRP+EXE que induziu o aumento de IL-10. **Conclusão:** Na fase inicial todos os tratamentos diminuem o aporte sanguíneo e a migração de células inflamatórias. Já na fase tardia os tratamentos induziram maior aporte vascular na articulação lesionada e reduziram a migração de células inflamatórias. Somente a associação PRP+EXE aumentou a produção de IL-10 demonstrando um comportamento desejável no processo de cicatrização.

**Palavras-chave:** Plasma rico em plaquetas; Fatores de crescimento; Reparo articular; Exercício físico.

#### PEREIRA, W. M. PROFILE OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN JOINT INJURY OF RATS UNDER APPLICATION OF PLATELET RICH PLASMA (PRP) AND PHYSICAL EXERCISE

Wagner Menna Pereira, Fernanda Tomiotto Pelissier, Ivo ilvan Kerppers, Milena Menegazzo Miranda-Sapla, Carolina Panis, Wander Rogério Pavanelli

## Abstract

**Introduction:** Platelet rich plasma (PRP) is a technique widely used in biological procedures because it generates growth factors that increase and accelerate the repair process of joint injuries. Exercise (EXE) is currently used in the rehabilitation to accelerate the repair of the lesions and restore the functional capacity of the joints. The present study aimed to analyze the biological effect of PRP, EXE or PRP+EXE therapy on joint injury through quantitative analysis of inflammatory cells, to characterize collagen deposition and to evaluate the production of cytokines in the models of induced lesions in rats in the acute (3 days) and late (14 days) phase. **Materials and Methods:** Wistar rats were divided into control groups (n=10), PRP (n=10), EXE (n=10) or PRP+EXE (n=10). The PRP was obtained by autologous blood centrifugation, and inserted immediately after injury at the injured site. The lesion was induced in the capsular region of the right knee joint of all the rats under previous anesthesia, followed by the injection of Freud's Adjuvant in the amount of 50 $\mu$ l and the physical exercise was performed in a matched treadmill, with duration of 5 minutes, 1 time a day, every day at 2cm/sec speed. **Results:** In the acute phase there was reduction of polymorphonuclear in EXE groups and association between PRP+EXE. In addition, all groups treated in the acute phase reduced NF $\kappa$ B, TGF $\beta$ 1 and VEGF. In the late phase PRP treatment increased VEGF, whereas PRP alone increased NF $\kappa$ B and decreased the amount of mononuclear cells as well as the PRP+EXE association that induced IL-10. **Conclusion:** In the initial phase all the treatments decrease the blood supply and the migration of inflammatory cells. In the late phase, the treatments induced greater vascular supply in the injured joint and reduced the migration of inflammatory cells. Only the association PRP + EXE increased IL-10 production demonstrating a desirable behavior in the healing process.

**Keywords:** Platelet-rich plasma (PRP); Growth factors; Joint repair; Physical exercise.

## INTRODUÇÃO

A inflamação articular também denominada de artrite é uma doença que afeta as estruturas intra-articulares, podendo afetar diferentes estruturas tais como a cartilagem, os ligamentos e cápsula articular (TRUFLANDIER et al., 2018). Considerada uma importante causa de incapacidade física em todo o mundo, a artrite é caracterizada pela inflamação sinovial denominada de sinovite ou seja, inflamação da cápsula articular que recobre as articulações (CHANG et al., 2018). Essa patologia altera a arquitetura articular induzindo quadro inflamatório na articulação e pode estar associada a características agudas e crônicas no compartimento sinovial (DOS ANJOS et al., 2017).

Dentre os fatores etiológicos dos acometimentos articulares cita-se o aumento excessivo da prática de atividades físicas com impacto em todas as faixas etárias, com isso a incidência de lesões articulares cresce a cada dia (VASCONCELOS; FERNANDA, 2018). Proporcionalmente cresce a expectativa com relação a tratamentos que acelerem a recuperação diminuindo o tempo de afastamento à prática de atividades (QUARTEIRO et al., 2015). De fato, a capacidade de regeneração articular especialmente da cartilagem articular é limitada devido ao seu isolamento da regulação sistêmica e seu limitado aporte vascular. Essas alterações metabólicas e biológicas podem levar à perda de homeostasia da articulação resultando em defeitos na superfície articular seguida de artrite e elevados quadros dolorosos e inflamatórios (CHANG et al., 2018). Sinais clínicos esses, que representam elevada taxa de prevalência nas clínicas de recuperação de lesões articulares, que atualmente tem priorizado a realização de exercícios como forma de tratamento (CUNHA et al., 2014).

A realização de exercício físico denominado por Contreras-Muñoz et al. (2017) como a movimentação ativa e controlada do segmento lesionado pode restaurar a homeostase articular, influenciando a produção de citocinas inflamatórias tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator transformante do crescimento beta (TGF $\beta$ 1), interleucina 1 (IL-1) interleucina 10 (IL-10) dentre outras, além de estimular a migração de leucócitos para o foco da inflamação (quimiotaxia) aumentando assim a neovascularização caracterizado pelo aumento de VEGF, facilitando dessa forma o reparo da articulação lesionada. Segundo Uébec (2008) uma vez que essas alterações podem envolver condições pró ou anti-inflamatórias possivelmente as expressões de NFkB e cNOS, estejam envolvidas no processo inflamatório articular (COCKS; WAGENMAKERS, 2016). Segundo Prestes et al. (2012) o exercício desempenha um papel essencial na homeostase articular auxiliando na diminuição dos sinais inflamatórios como a dor e o derrame articular, suprimindo o processo inflamatório da artrite. Assim como a prática de exercício físico outras técnicas mais inovadoras tais como o uso autólogo do plasma rico em plaquetas (PRP) também pode ser utilizado no processo de reparo das lesões articulares (CHANG et al. 2018).

O PRP define-se como a utilização autóloga de um concentrado plaquetário obtido através da centrifugação do sangue para obtenção de uma concentração cerca de 3 a 5 vezes maior de fatores de crescimento do sangue que estimulam a proliferação celular e direcionam as células terapêuticas para o local de reparo

articular e induzem fatores de crescimento autócrinos para a cicatrização da articulação (CUNHA et al. 2014). A injeção intra-articular de PRP tem sido apontada como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de lesões articulares por meio do potencial biológico do PRP de estimular a regeneração tecidual (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018; GARCIA et al., 2017; KNOP; DE PAULA; FULLER, 2016b)

Contudo, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos inflamatório, da produção de colágeno e na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias na artrite induzida em joelho de ratos, e os efeitos das terapias por injeção do PRP, realização de exercícios (EXE), e a associação das duas terapias PRP+EXE nas fases aguda (3 dias) e tardia (14 dias).

## **METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo experimental, controlado e randomizado. Foram utilizados 40 ratos wistar, machos, pesando entre 180 e 250 gramas, com idade de aproximadamente 2 meses, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Londrina– UEL/PR e do Biotério da Universidade Estadual de Maringá – UEM/PR. Os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico medindo 45 cm de largura, 53 cm de comprimento e 25 cm de altura, com 5 animais por gaiola, sendo-lhes permitido livre acesso à ração específica para roedores e à água *ad libitum*, durante todo o período do experimento. Os animais mantiveram-se em biotério com ciclo claro/escuro de 12h (luzes ligadas de 7h às 19h) sob temperatura de 23°C ± 1°C. Todos os experimentos foram conduzidos segundo as normas de Comissão Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e CEUA – UNICENTRO, sob parecer de aprovação 024 e 045//2017 (ANEXO I).

### **Realização do Estudo**

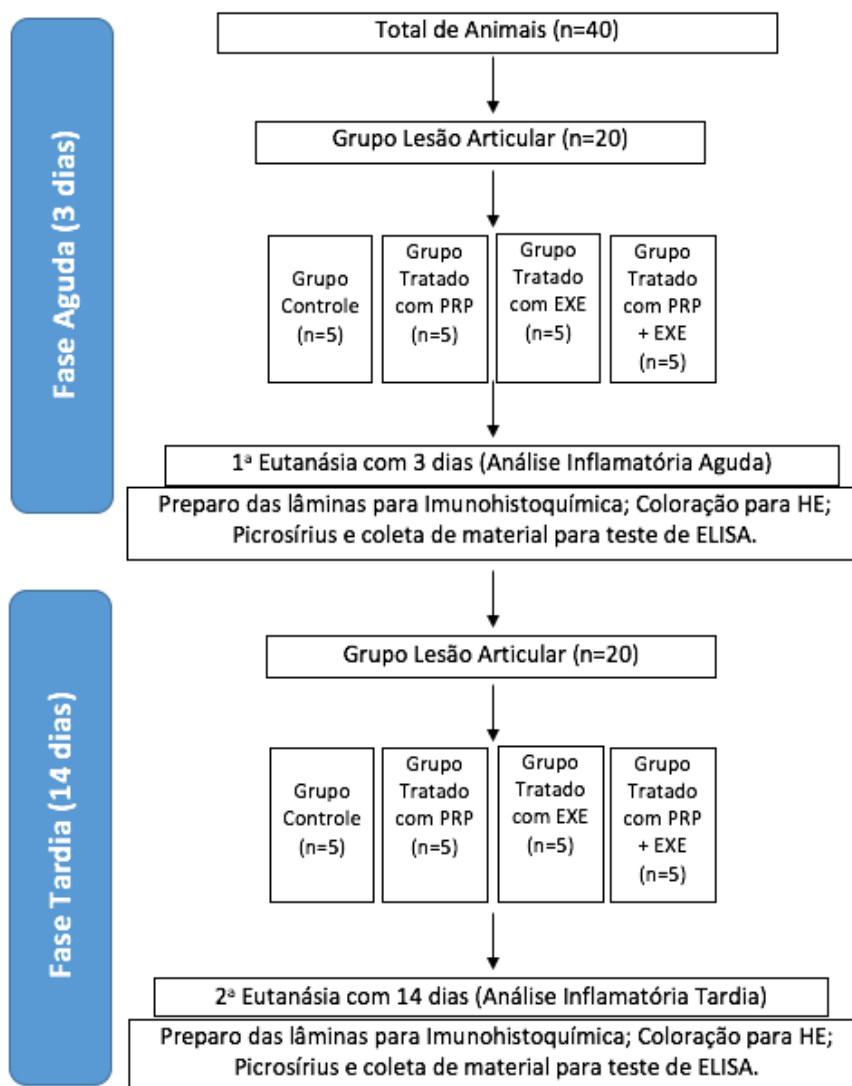
Realizou-se os experimentos práticos e diários de rotina com os animais, indução das lesões, preparo dos materiais e eutanásias na Universidade Estadual do

Centro-Oeste – UNICENTRO, através do laboratório de Neuroanatomia e Neurofisiologia, localizada na cidade de Guarapuava-PR. A realização das análises dos materiais e processamento dos resultados realizou-se na Universidade de Londrina – UEL, através do laboratório de Imunoparasitologia das doenças negligenciadas e câncer, na cidade de Londrina-PR.

### **Delineamento experimental**

Os animais foram separados por fase aguda e fase tardia, de acordo com o período de eutanásia, sendo o período de 3 dias para análise dos efeitos agudos e 14 dias para análise dos efeitos tardios, conforme ilustrado no fluxograma da figura 1.

Destes, 4 grupos compuseram a fase aguda e 4 grupos compuseram a fase tardia. O grupo controle articular positivo (+) sofreu apenas lesão articular sem tratamento (C+); o grupo lesão articular + PRP sofreu a lesão e foram tratados somente com PRP (PRP); o grupo lesão articular + EXE, sofreu a lesão e foram tratados somente com exercício (EXE) e o grupo lesão articular + PRP + EXE sofreu a lesão e foram tratados com PRP e realização de exercícios (PRP+EXE).



**Figura 1** - Fluxograma da alocação de animais conforme grupo de conduta aplicada e tempo de intervenção. Descrito o número de animais pertencentes em cada grupo e as intervenções realizadas, bem como os momentos de eutanásia dos animais e o preparo dos materiais para análises.

### Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Para obtenção do PRP, foi utilizado o mesmo protocolo realizado por Contreras-Muñoz e colaboradores (2017). Os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de quetamina e 15 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal, após isso, foi coletado 1mL de sangue por punção cardíaca com agulha calibre 0,80 x 25mm. Alguns animais sofreram óbitos relacionados ao trauma cardíaco induzido pela punção, porém realizou-se a reposição desses animais para homogeneidade da amostra. O

sangue foi transportado para um tubo de coleta a vácuo de 4,5mL contendo EDTA como anticoagulante. Após a homogeneização, o tubo foi centrifugado uma única vez, para não danificar as propriedades das plaquetas à 1800rpm durante 10 minutos, à temperatura de 25°C, após a coleta do sangue os animais foram devolvidos às respectivas gaiolas e aguardado o período de retorno dos efeitos da anestesia.

Após o processo de centrifugação foi possível distinguir duas camadas no tubo, as hemácias ao fundo e o plasma sobrenadante. Foram coletados 500µL do plasma, que foi congelado e mantido em -20°C para uso posterior. O tratamento com a aplicação do PRP deu-se sob prévia anestesia, e imediatamente após a realização da lesão com a injeção autóloga de 10µL pontualmente no local da lesão, como descrito por Quarteiro et al., (2015).

### **Indução da lesão articular**

Para a indução da lesão articular, respeitou-se o prazo de 48 horas, para novamente realizar a anestesia com 80mg/kg de quetamina e 15mg/kg de xilazina por via intraperitoneal. Em seguida, foi administrado por via intra-articular do joelho direito, com o intuito de adentrar a cápsula articular e realizou-se leve tração do membro para abertura da articulação seguida pela aplicação conforme ilustrado na figura 2, na quantidade de 50µL de Adjuvante Completo de Freud (Sygma-Aldrich), conforme descrito por Prestes et al., (2012), substância essa capaz de gerar artrite inflamatória através da indução do estímulo de anticorpos, e sinais como dor, febre, edema, eritema, entre outros sinais inflamatórios (YANG; LU; GUO, 2016; GUERREIRO et al., 2015).

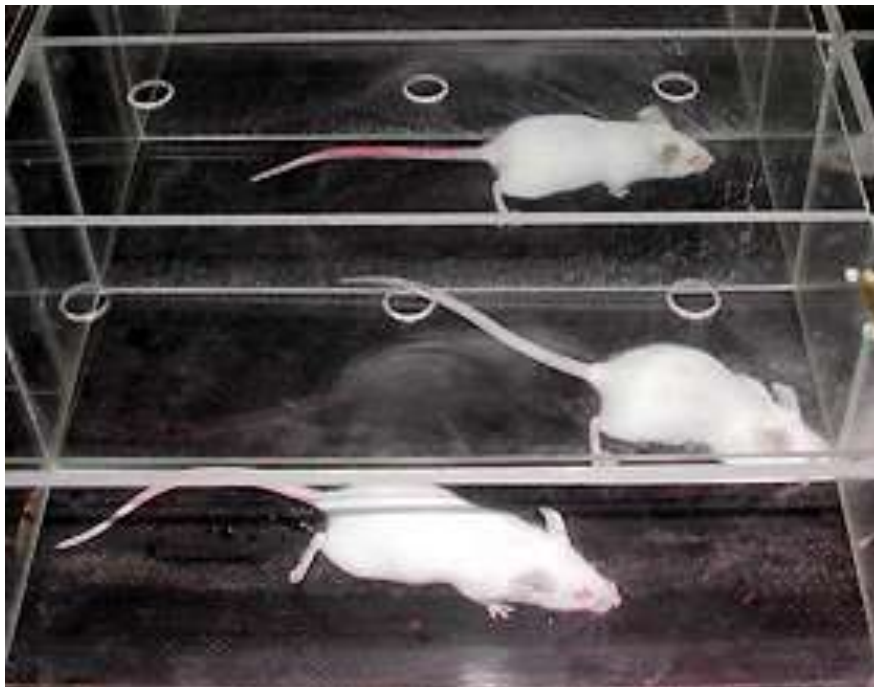


**Figura 2.** Indução da lesão articular por injeção de Adjuvante completo de Freud na quantidade de 50 $\mu$ L. A aplicação foi realizada por via ânterolateral, localizada na interlinha articular do joelho direito com o intuito de adentrar a capsular articular da articulação induzindo uma lesão periférica capsular sem intuito de gerar danos na cartilagem articular.

### **Realização dos exercícios físicos**

Os animais alocados no grupo exercício foram submetidos a um período de adaptação à caminhada em esteira preparada para experimentos animais, que consistiu de caminhadas diárias a uma velocidade de 2cm/seg, por um período de 3 minutos/dia, durante 10 dias, antes da indução da lesão. Utilizou-se um dispositivo de acrílico posicionado acima da esteira, com o intuito de induzir caminhada em linha reta, sem nenhum animal invadir o espaço de outro, com velocidade contínua e lenta, adaptada para exercício em ratos da espécie Wistars (Figura 3). A esteira utilizada foi da marca Movement®, e a metodologia do protocolo de exercício utilizada seguiu o recomendado para ratos (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2017). A adaptação foi realizada para reduzir o estresse causado pela corrida sem promover alterações fisiológicas relativas ao treinamento físico.

Após o término dos 10 dias de treinamento de adaptação, os animais lesionados realizaram exercícios de caminhada na esteira uma vez ao dia, com a mesma velocidade e horários, durante 5 minutos, todos os dias.



**Figura 3.** Realização de exercício de caminhada na esteira ergométrica adaptada para ratos. Ilustração do material de acrílico utilizado para induzir caminhada em linha reta e sem a invasão de espaço por outros animais. Caminhada com velocidade de 2cm/seg com tempo de duração de 5 minutos. Durante 3 ou 14 dias.

### **Eutanásia dos animais**

A eutanásia foi realizada sob prévia anestesia com solução de Cloridrato de quetamina (80 mg/Kg) e xilasina (15 mg/Kg), sendo administrado 1 mL de tiopental intraperitoneal, conforme realizado no trabalho de Chang et al. (2018). A eutanásia foi realizada 3 dias após a indução da lesão articular, com o intuito de observar os componentes inflamatórios agudos e após 14 dias da indução da lesão, com o intuito de observar os componentes inflamatórios tardios.

### **Análise histológica**

Após eutanásia dos animais, a articulação do joelho a ser analisada foi fixada em formalina tamponada 10% por 48 horas. Realizou-se a descalcificação preparada a partir de ácido fórmico, formaldeído e água, na proporção de 2:2:6 respectivamente. Após, foram desidratados em álcool 70% e clarificados em xilol. Em seguida, foram inclusos em blocos de parafina e cortes longitudinais de 5µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo, foram obtidas 5 lâminas de cada bloco, com 3 cortes em cada lâmina. Os cortes foram dispostos em lâminas preparadas com polilisina e incubados a 50°C para aderência por 12 horas. Em seguida, foram lavados em xilol para a remoção do excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool.

Os cortes reidratados foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados com concentrações crescentes de álcool, lavados com xilol e cobertos com lamínulas para posterior análise microscópica (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013b). A avaliação dos resultados foi realizada pela mensuração histológica quantitativa do número de células por campo em 3 cortes por lâmina. A análise realizada foi pela quantidade de célula inflamatória podendo ser polimorfonucleares caracterizados principalmente pela presença de neutrófilos, basófilos, eosinófilos ou mononucleares, células de atuação tardia no processo de cicatrização, tais como os linfócitos, monócitos e macrófagos. Realizou-se também a análise da proporção de células inflamatórias na região da lesão, conforme Tabela 1.

A presença de infiltrado inflamatório foi quantificada com a escala utilizada por Amar et al., (2015) e Garcia et al., (2017), considerando 0 (ausência de inflamação), 1 (discreta inflamação), 2 (moderada inflamação) e 3 (quantidade elevada de infiltrados inflamatórios). A análise foi realizada por um patologista experiente e capacitado para esse tipo de análise microscópica.

**Tabela 1.** Descrição da quantificação do nível inflamatório, realizada pelo analisador.

#### SCORE DE INFLAMAÇÃO

|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>Ausência de inflamação</b>           | 0 | Tecido semelhante ao normal  |
| <b>Discreta inflamação</b>              | 1 | Pouca presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outras células.    |
| <b>Moderado infiltrado inflamatório</b> | 2 | Moderada presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outras células. |

**Quantidade elevada de  
infiltrado inflamatório**

3

Intensa e populosa presença de neutrófilos, macrófagos,  
linfócitos e outras células.

**Fonte:** Adaptado de Garcia et al., (2017) e Amar et al., (2015).

### **Análise da deposição de colágeno**

Com o intuito de analisar a presença de colágeno maduro, a articulação lesionada foi coletada e fixada em 10% de formalina neutra tamponada, por um período mínimo de 48 horas antes do processamento, sendo então embebida em parafina, e realizados cortes longitudinais de 5µm de espessura. Após, os cortes foram corados com picrossírius *fast green*. Imagens foram capturadas utilizando microscópio de luz polarizada em campo claro e em campo escuro, de acordo com Miranda et al., (2015) e Sebben et al., (2012).

As imagens foram analisadas na região da capsular articular e estruturas periarticulares com software Image PRO Plus 7.0 no qual utilizou-se uma máscara como modelo e realizada varredura e quantificação de colágeno presente, identificando o total de fibras de colágeno maduro (CUNHA et al., 2014).

### **Determinação dos níveis de citocinas**

Para a obtenção do conteúdo líquido celular do material articular, realizou-se o processo de maceração da peça. Para isso descongelou-se o material e a maceração ocorreu através de um homogenizador T25 digital ultra Turrax para obtenção do sobrenadante dos fragmentos da articulação do joelho direito na quantidade de 100mg/ml.

O sobrenadante do material macerado foi utilizado para medir o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferon gama (IFN $\gamma$ ), interleucina IL-1, IL-4 e IL-10 por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (eBiosciences, EUA). As placas foram lidas a 450nm usando leitor de placa ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO). Optou-se por analisar essas citocinas, por serem importantes moduladoras do processo inflamatório.

## **Análise imunohistoquímica (IHC)**

Para a realização da técnica de IHC foram confeccionadas lâminas como descritas acima para as análises histológicas e preparado anticorpos da marca Santa Cruz Biotech. A marcação foi realizada como descrito por Panis et al., (2011). Os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica Dako Pen<sup>®</sup> e realizado o bloqueio das peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio 10% por 30 minutos, seguido de bloqueio de ligações inespecíficas por incubação em soro fetal 0,1% por 1 hora. Na sequência, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-CNOS (diluição 1:300), anti-NFκb (1:500), anti-TGFβ1 (1:400) e anti-VEGFα (1:500) em câmara úmida *overnight* a 4°C. Após a incubação, as laminas foram submetidas a 2 banhos (5 minutos) em PBS e em seguida, incubadas com anticorpo secundário. A marcação foi revelada pela incubação com 3,30-diaminobenzidina (DAB) por 1 min. Na última etapa, as seções foram fracamente contra-coradas com a hematoxilina de Harry (Merck). A intensidade e a localização da imunorreatividade com todos os anticorpos primários utilizados foram examinadas em todo o conteúdo da lâmina, utilizando um microscópio óptico. Para o estudo de análise de imagem, fotomicrografias coloridas de áreas representativas (ampliação de 400x) foram adquiridas digitalmente. Para a pontuação semi-quantitativa, as imagens, em um total de 10 imagens para cada corte de cada animal foram avaliadas por meio da ferramenta de deconvolução de cores no software Image J (NIH, EUA). Pixels foram categorizados como descrito anteriormente por (CHATTERJEE et al., 2013), como fortes positivos (3+), positivos (2+), fracos positivos (1+) e negativos (0).

## **Análise estatística**

Para a análise estatística, utilizou-se o software Graphpad Prism versão 7. Realizou-se teste de normalidade de Kruskal-Wallis (95%) e para a realização das comparações entre os grupos, utilizou-se o teste estatístico de comparação multigrupos de Dunn's, considerando significância estatística  $p < 0,05$ .

## Resultados

### 1. Análise histológica quantitativa de polimorfonucleares e mononucleares do grupo controle e dos grupos tratados com PRP, Exercício (EXE), ou PRP+EXE na lesão articular aos 3 e 14 dias.

Inicialmente, foi analisada a quantidade e tipos celulares nas articulações lesionadas e tratadas ou não com PRP, Exercício (EXE) ou PRP+EXE. Verificou-se que no 3º dia, houve redução significativa na quantidade de polimorfonucleares na lesão articular após o EXE, fenômeno este que persistiu quando houve a associação EXE+PRP em relação ao controle. Na análise de mononucleares, não houveram alterações significativas. Analisando a fase tardia, não houve alterações significativas na análise de polimorfonucleares. Já na análise de mononucleares os grupos PRP e PRP+EXE, obtiveram redução significativa na quantidade de células. Conforme os dados descritos do quadro 1.

| HEMATOXILINA e EOSINA |                    |             |                 |                |               |
|-----------------------|--------------------|-------------|-----------------|----------------|---------------|
| 3 dias                |                    |             |                 |                |               |
|                       |                    | Controle    | PRP             | EXE            | PRP + EXE     |
| Lesão Articular       | Polimorfonucleares | 2,85 ± 0,40 | 1,71 ± 0,37     | 0,33 ± 0,13*** | 1 ± 0,40**    |
|                       | Mononucleares      | 2,5 ± 0,21  | 2,85 ± 0,35     | 2,83 ± 0,17    | 2,57 ± 0,41   |
| 14 dias               |                    |             |                 |                |               |
|                       |                    | Controle    | PRP             | EXE            | PRP + EXE     |
| Lesão Articular       | Polimorfonucleares | 1,14 ± 0,20 | 0,16 ± 0,13     | 0,28 ± 0,07    | 0,33 ± 0,11   |
|                       | Mononucleares      | 3 ± 0,54    | 1,71 ± 0,42**** | 2,57 ± 0,48    | 1,83 ± 0,25** |

**Quadro 1.** Dados de média e desvio padrão, para as leituras microscópicas quantitativa de polimorfonucleares e mononucleares, por coloração de hematoxilina e eosina dos grupos controle positivo (C+), tratado com PRP (PRP), tratado com exercício (EXE) e tratado com PRP associado ao exercício (PRP+EXE), para as lesões articulares após 3 e 14 dias. As qualificações seguiram as descrições da tabela 1 supracitada. A análise foi realizada por varredura da região capsular e periarticular. Cada grupo foi composto por 5 animais. \*\*Significância estatística (p<0,01). \*\*\*Significância estatística (p<0,001).

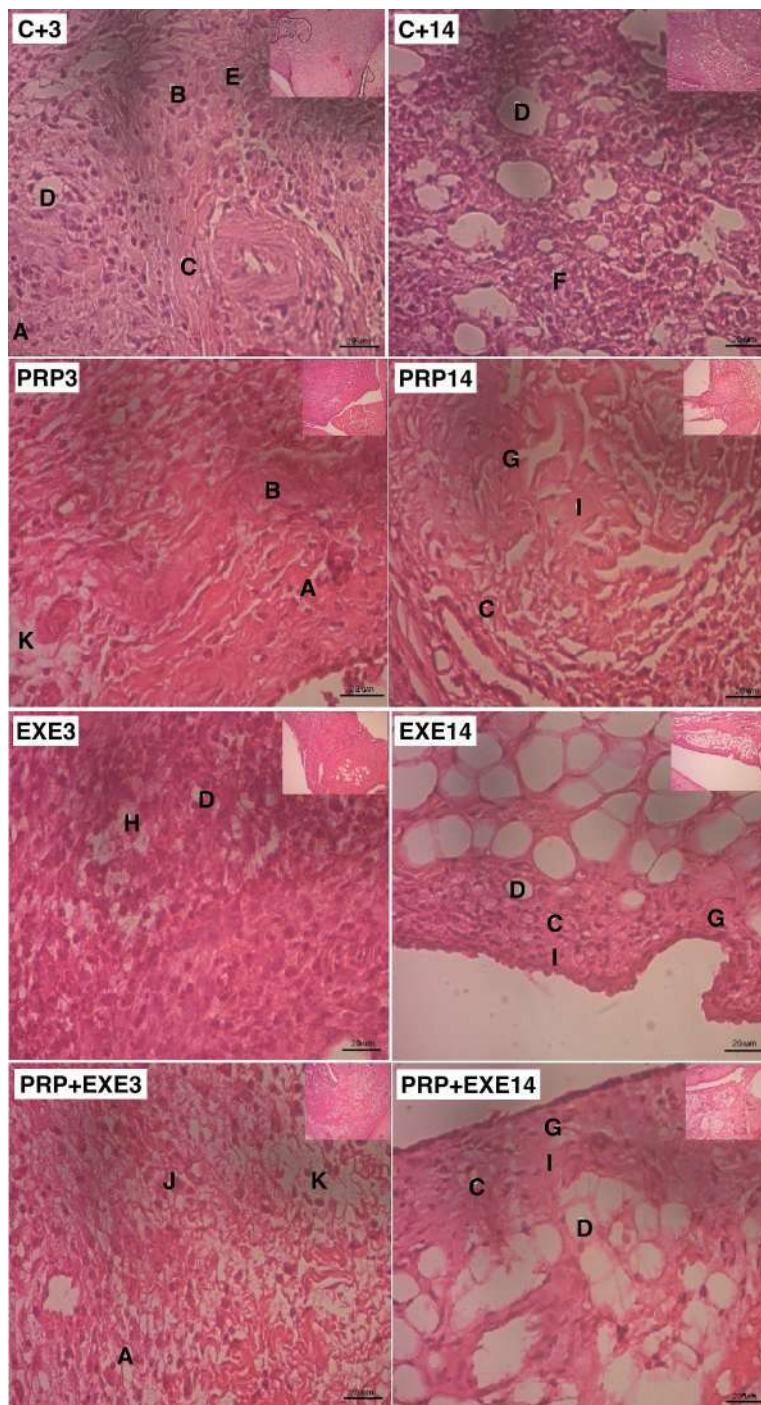
Abaixo, na figura 4 seguem descritas as fotos representativas dos cortes histológicos para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) da articulação com foco na cápsula articular e estruturas periarticulares dos grupos controle positivo 3 e 14 dias (C+), tratado somente com PRP 3 e 14 dias (PRP), tratado com somente com exercício 3 e 14 dias (EXE) e tratado com PRP associado ao exercício (PRP+EXE) após 3 e 14 dias, com aumento de 10x no canto superior direito de cada imagem para identificação do local articular em que foram realizadas as fotografias e objetiva de 40x para focar o local analisado.

Nota-se na figura 4 que o grupo C+3 apresentou elevado processo inflamatório de forma difusa apresentado por polimorfonucleares e plasmócitos, presença moderada de células adiposas sem a presença de neovascularização. No grupo C+14 observou-se presença de polimorfonucleares de forma moderada e difusa com presença de neovascularização.

No grupo PRP3 nota-se a presença de necrose tecidual de forma moderada, edema difuso, leve presença de polimorfonucleares, tecido conjuntivo desorganizado e presença moderada de forma focal de linfócitos. No grupo PRP14 observa-se tecido conjuntivo organizado, presença moderada de fibroblastos e presença moderada de células adiposas (figura 4).

No grupo EXE3 identifica-se a presença elevada de polimorfonucleares e células adiposas, necrose tecidual de forma moderada no interior do tecido e ausência de neovascularização. No grupo EXE14 nota-se a presença moderada de células adiposas claras e cinzas, neovascularização de forma moderada, presença de fibroblastos e tecido conjuntivo organizado (figura 4).

Ainda na figura 4 observa-se no grupo PRP+EXE3 a presença de polimorfonucleares de forma elevada e difusa, células adiposas de forma elevada e difusa e desorganização do tecido conjuntivo. No grupo PRP+EXE14 são observados células adiposas claras e cinzas de forma moderada, células mononucleares de forma moderada e tecido conjuntivo organizado.

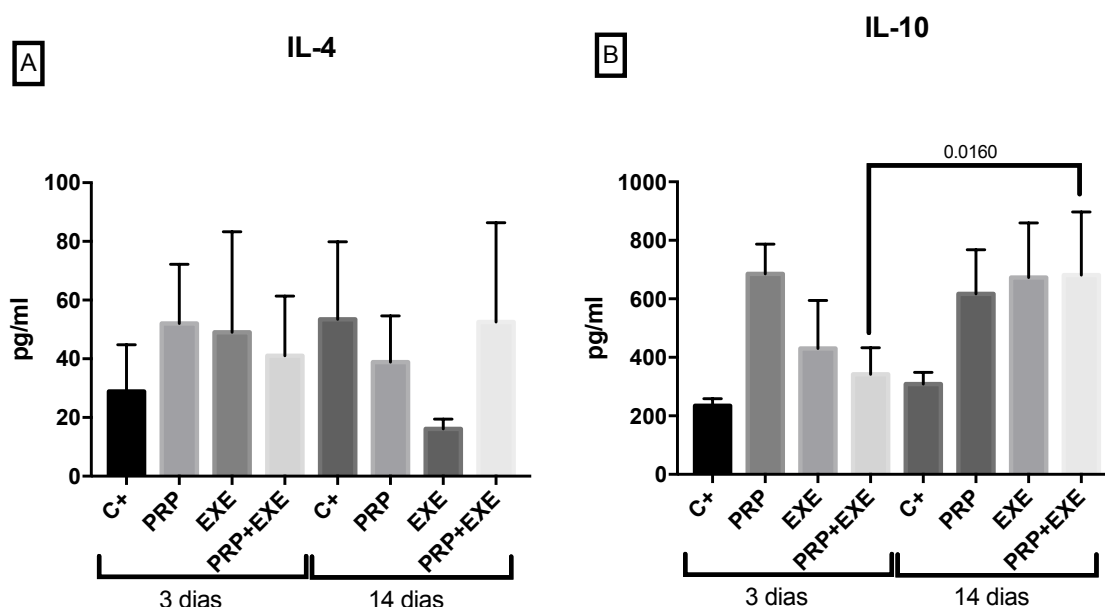


**Figura 4.** Análise de infiltrado inflamatório identificado pela presença de células polimorfonucleares e mononucleares em corte longitudinal da articulação de ratos dos grupos controle positivo 3 dias (C+3), controle positivo 14 dias (C+14), grupo tratado com PRP 3 dias (PRP3), grupo tratado com PRP 14 dias (PRP14), grupo tratado somente com exercício 3 dias (EXE3), grupo tratado somente com exercício 14 dias (EXE14), grupo tratado com associação de PRP+EXE 3 dias (PRP+EXE3) e grupo tratado com associação de PRP+EXE 14 dias (PRP+EXE14). Número total de 5 ratos para cada grupo. Coloração H.E. 10x (Canto superior direito) e 40x (Amplificação do

local de indução da lesão e realização da análise). (a) polimorfonucleares; (b) necrose tecidual; (c) vascularização; (d) células adiposas; (e) tecido desorganizado; (f) macrófagos; (g) fibroblastos; (h) infiltrado edematoso; (i) tecido organizado; (j) linfócitos; (k) infiltrado edematoso;

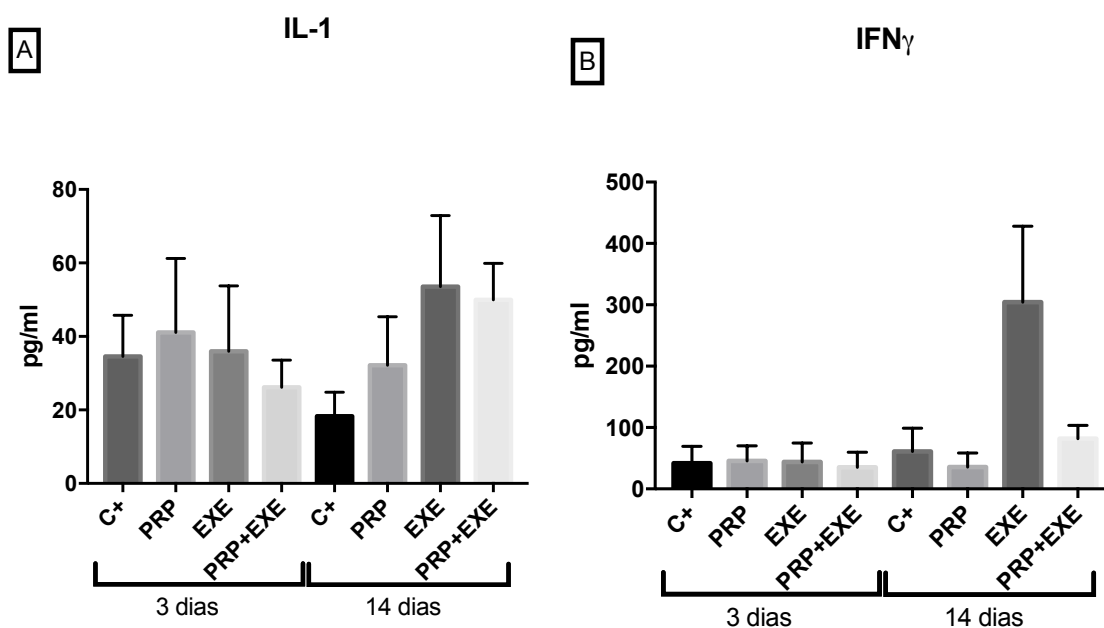
## 2. Análise da produção de citocinas (ELISA), nas lesões articulares do grupo controle e dos grupos tratados com PRP, EXE e PRP+EXE aos 3 e 14 dias.

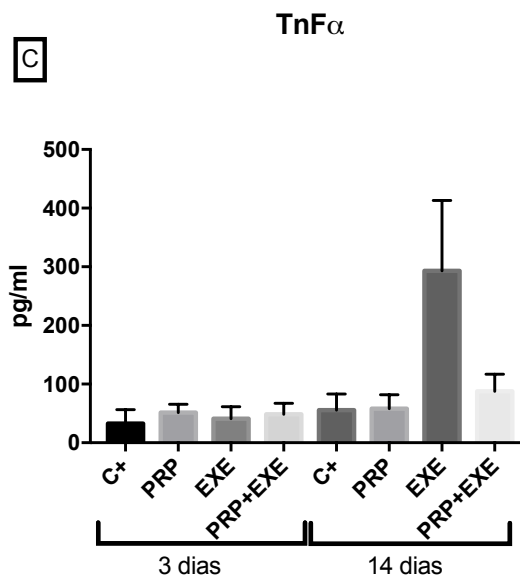
Abaixo, seguem descritos os valores de produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. A figura 5A descreve a análise de IL-4 em valores médios e o desvio padrão entre os grupos tratados ou não com PRP, EXE e PRP+EXE em 3 dias e 14 dias pós lesão. Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa. A análise de IL-10 em valores médios e desvio padrão pode ser observado na figura 5B. Na análise intragrupo nota-se que PRP+EXE3 e PRP+EXE14 obtiveram diferença estatisticamente significativa, obtendo um aumento no 14<sup>o</sup> dia com p-valor de 0,0160.



**Figura 5.** Valores da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 (A) e IL-10 (B) em picograma por millilitro, na articulação de ratos, para o grupo lesão articular ao 3<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias tratados ou não com PRP, EXE e PRP+EXE. Análise de comparação intragrupo (mesmo tratamento 3 e 14 dias) e comparação multigrupos no mesmo tempo de lesão (Teste estatístico de comparação de Dunn's  $p < 0,05$ ). Número de 5 animais para cada grupo.

Na sequência seguem descritos os valores da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Na figura 6A são expressos os valores de média e desvio padrão para a análise da IL-1. Realizou-se a comparação multigrupos e não houveram diferenças estatisticamente significantes entre 3 e 14 dias. Observa-se que os valores médios da citocina IL-1 ao 3<sup>o</sup> dia foram menores se comparados aos valores médios no 14<sup>o</sup> dia. A figura 6B descreve os valores médios e desvio padrão da citocina IFN $\gamma$  entre os grupos avaliados. Verifica-se na análise multigrupos que não houveram diferenças estatísticas para  $p < 0,05$ . Os valores médios e o desvio padrão para o TNF $\alpha$  são observados na figura 6C, que descreve através da análise multigrupos que não houveram diferenças estatísticas para  $p < 0,05$ .



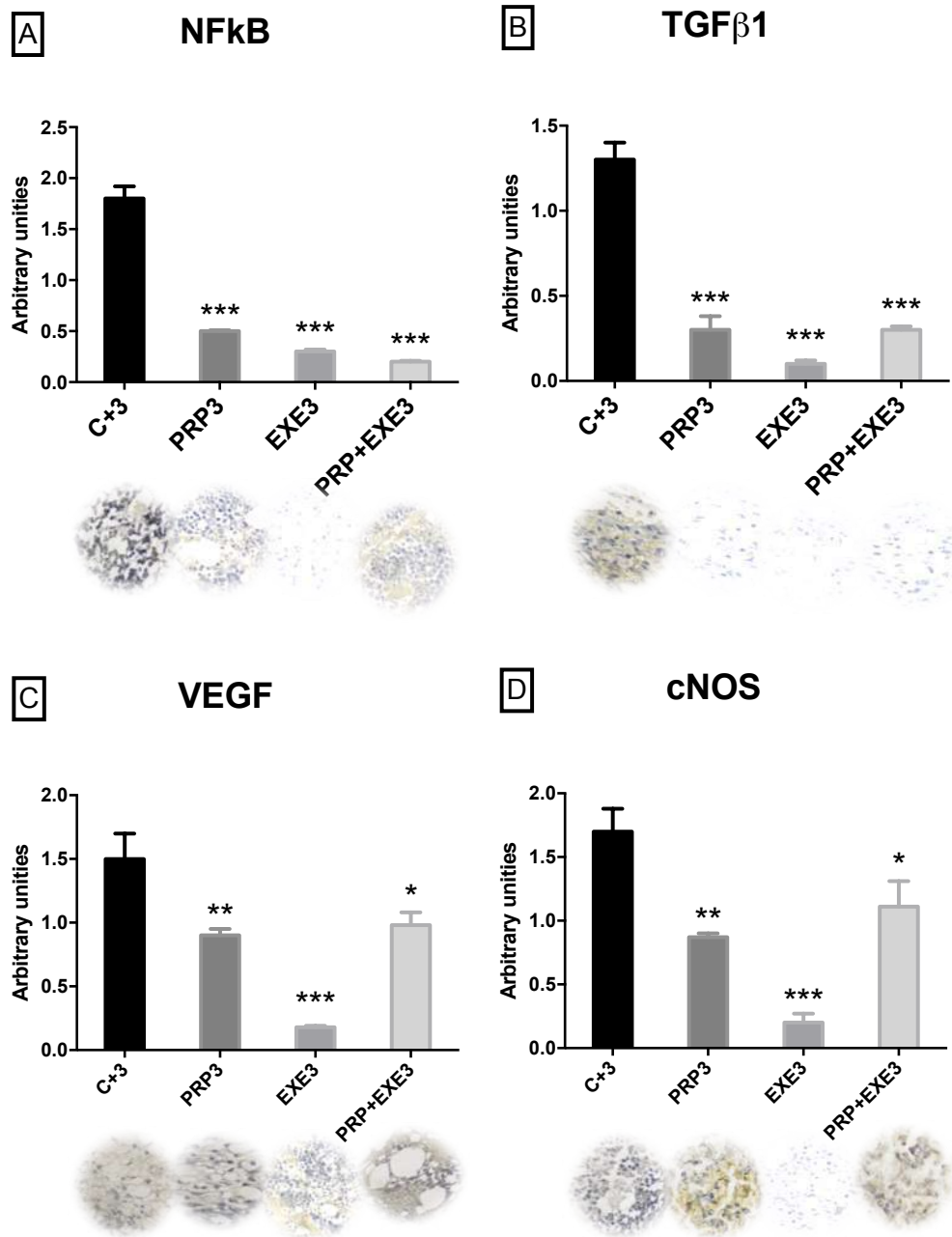


**Figura 6.** Valores da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 (A), IFN $\gamma$  (B) e TNF- $\alpha$  (C) em picograma por mililitro na articulação de ratos do grupo lesão articular ao 3<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias tratados ou não com PRP, EXE e PRP+EXE. Análise de comparação intragrupo (mesmo tratamento 3 e 14 dias) e comparação multigrupos no mesmo tempo de lesão (Teste estatístico de comparação de Dunn's  $p < 0,05$ ). Número de 5 animais para cada grupo.

### 3. O tratamento com PRP, EXE e PRP+EXE altera a produção de mediadores pró-inflamatórios analisados por imunohistoquímica (IHC) no 3<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias.

Realizou-se a análise de 4 proteínas através da técnica de IHC, todas envolvidas no processo de cicatrização e reparo: NF $\kappa$ B(p65), TGF $\beta$ 1, VEGF e cNOS. Os dados referentes às médias e desvios-padrão de todos os grupos experimentais para cada marcador analisado estão ilustrados nas figuras 7 e 8.

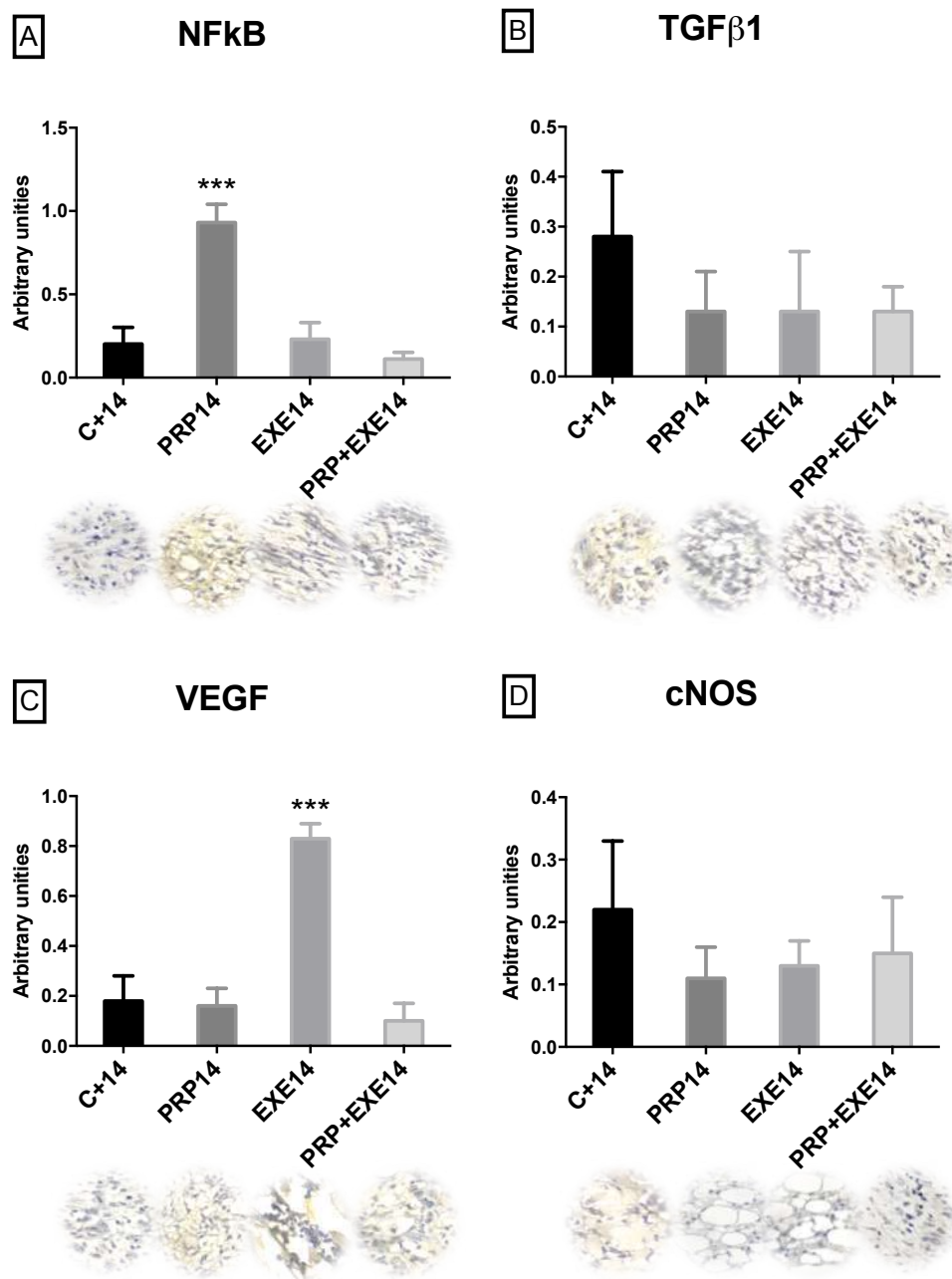
Na análise da articulação no 3<sup>o</sup> dia pós lesão, observou-se na figura 7A redução da expressão de NF $\kappa$ B, TGF $\beta$ 1 (figura 7B), VEGF (figura 7C) e cNOS (figura 7D) em todos os grupos tratados em relação ao controle positivo (C+3).



**Figura 7.** Expressão dos níveis das proteínas analisadas na articulação após indução da lesão em 3 dias. (A) Expressão dos níveis de NFκB, (B) TGFβ1, (C) VEGF e (D) cNOS. Grupo controle positivo (C+), tratado com PRP (PRP), tratado com exercício (EXE) e tratado com PRP associado ao exercício (PRP+EXE). Cada grupo foi composto por 5 animais. \*Significância estatística ( $p < 0,05$ ). \*\*Significância estatística ( $p < 0,01$ ). \*\*\*Significância estatística ( $p < 0,001$ ).

A figura 8 ilustra que após 14 dias de lesão na articulação observou-se de forma estatisticamente significativa aumento de NFκB no grupo PRP (figura 8A) e aumento

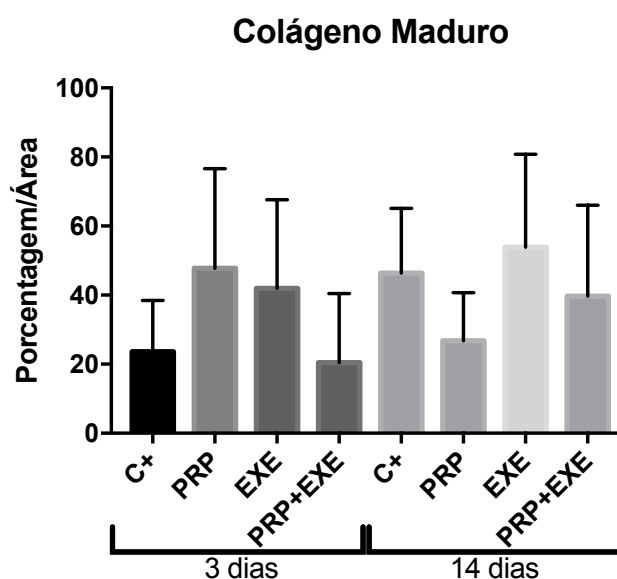
de VEGF no grupo EXE (figura 8C). Não houveram alterações significativas nos valores de TGF $\beta$ 1 (figura 8B) e cNOS (figura 8D).



**Figura 8.** Expressão dos níveis das proteínas analisadas na articulação após indução da lesão em 14 dias. (A) Expressão dos níveis de NFkB, (B) TGF $\beta$ 1, (C) VEGF e (D) cNOS. Grupo controle positivo (C+), tratado com PRP (PRP), tratado com exercício (EXE) e tratado com PRP associado ao exercício (PRP+EXE). Cada grupo foi composto por 5 animais. \*\*\*Significância estatística ( $p < 0,001$ ).

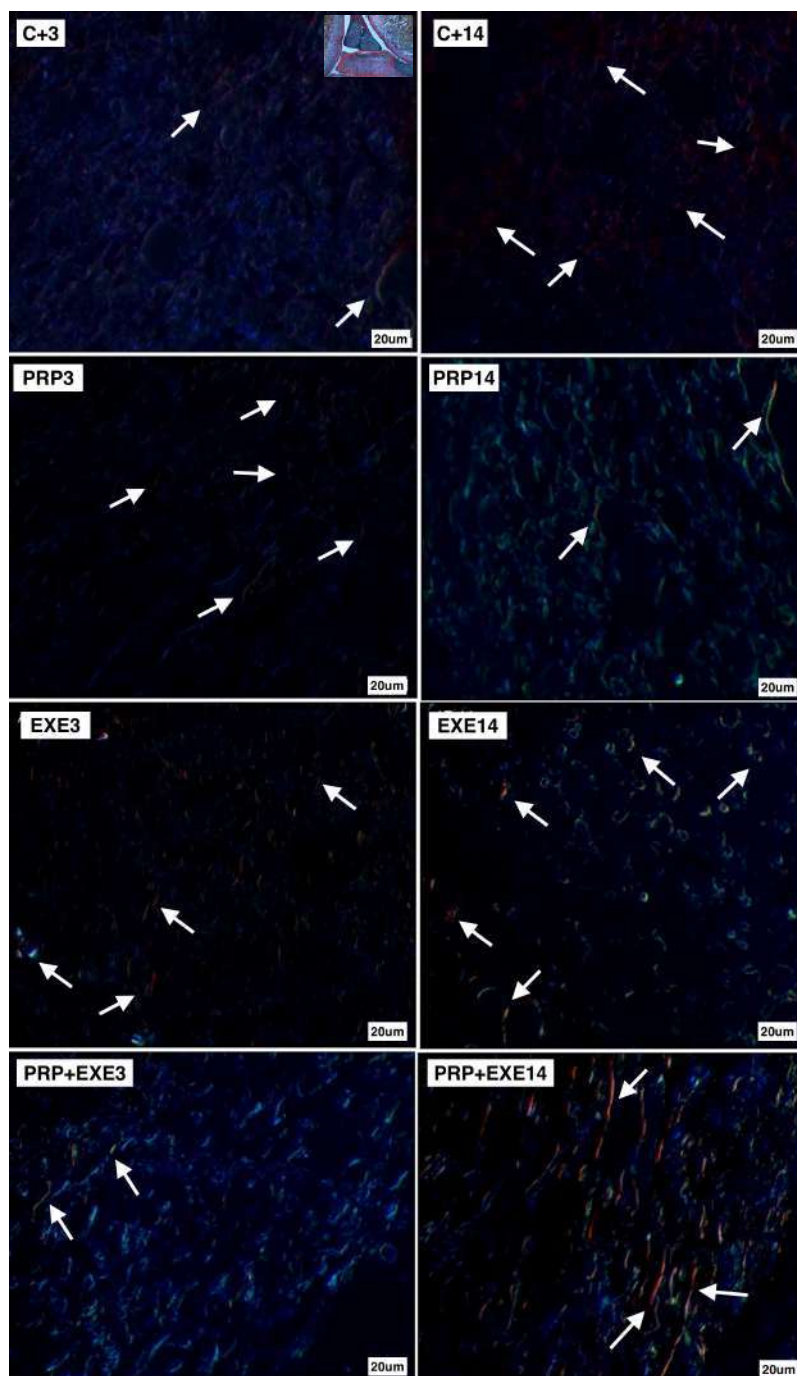
#### 4. Deposição de colágeno na lesão articular tratadas ou não com EXE, PRP ou PRP+EXE aos 3 e 14 dias.

Em relação à deposição de colágeno, a figura 9 descreve os valores de média e desvio padrão da quantidade de colágeno maduro em porcentagem por área analisada dos grupos com lesão articular tratados ou não com PRP, EXE e PRP+EXE no 3º dia e no 14º dia pós lesão. As comparações não obtiveram diferença estatisticamente significativa para  $p < 0,05$ .



**Figura 9.** Análise do efeito da terapia PRP, EXE e PRP+EXE na quantidade de colágeno maduro na articulação após 3 e 14 dias de lesão. Grupo controle positivo (C+), tratado com PRP (PRP), tratado com exercício (EXE) e tratado com PRP associado ao exercício (PRP+EXE). Cada grupo foi composto por 5 animais. Dados representam média e desvio padrão dos grupos.

A figura 10 ilustra as fotos microscópicas representativas de cortes longitudinais da articulação de ratos para análise da quantidade de colágeno com coloração de picrossírius *fast green*, dos grupos controle, tratado com PRP, tratado com EXE e tratado com PRP+EXE, após 3 e 14 dias. Observa-se em coloração vermelha as fibras de colágeno maduro identificadas pelas setas dos grupos analisados.



**Figura 10.** Fotografias microscópicas com coloração picosírius *fast green* da articulação em corte longitudinal de ratos dos grupos controle positivo 3 dias (C+3), controle positivo 14 dias (C+14), grupo tratado com PRP 3 dias (PRP3), grupo tratado com PRP 14 dias (PRP14), grupo tratado somente com exercício 3 dias (EXE3), grupo tratado somente com exercício 14 dias (EXE14), grupo tratado com associação de PRP+EXE 3 dias (PRP+EXE3) e grupo tratado com associação de PRP+EXE 14 dias (PRP+EXE14). Lâminas examinada em campo escuro e sob luz polarizada para identificação pela cor vermelha às fibras de colágeno maduro (tipo 1). No canto

superior da primeira foto, a descrição do local de retirada das fotografias (Objetiva de 4x). Objetiva de 40x para focar o local de lesão e análise.

## **Discussão**

Observou-se através dos resultados que a associação de PRP+EXE tanto na fase inicial quanto na fase tardia reduziu infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear respectivamente traduzindo à associação das terapias uma contenção da migração celular inflamatória, característica que os tratamentos isolados não apresentaram. Tais achados corroboram com Garcia et al. (2017) que identificaram também em ratos a redução de células inflamatórias na associação do PRP com laserterapia (637nm). Os autores concluem afirmando que a associação do PRP com outras terapias potencializa os efeitos de cicatrização associado ao processo inflamatório pois permite um efeito desejável na redução do infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear, além de permitir sinais de homeostasia articular, efeitos esses que não ocorrem nos tratamentos com PRP de forma isolada.

De acordo com Dos Anjos et al. (2017) células polimorfonucleares são células de perfil inflamatório agudo que apresentam uma meia-vida muito curta e morrem rapidamente, no entanto em um processo inflamatório, a morte por apoptose é acusada por sinais inflamatórios, que são capazes de intensificar os sinais inflamatórios da artrite. Os autores mencionam que a redução na quantidade dessas células pode estar relacionada com uma ação eficaz de cicatrização. Tal comportamento se comprova, ao analisarmos no 14<sup>o</sup> dia as células mononucleares, que por sua vez, estão relacionadas com um reparo mais tardio, pois compreendem células como macrófagos, linfócitos e fibroblastos, que participam de uma ação tardia e são células presentes na fase mais avançada do processo inflamatório articular, relacionadas com remodelagem e fagocitose.

Miller, Miller e Malfait, (2014) descrevem que os condrócitos, as células sinoviais e outras células da articulação podem expressar e responder às citocinas podendo serem detectadas em condições inflamatórias articulares do joelho. Os autores descrevem que  $TNF\alpha$  possui a função de coordenar e influenciar a resposta inflamatórias e a expressão de diversas citocinas. Esse relato dos autores supracitados, corroboram com os achados do presente trabalho no sentido de notarmos uma baixa produção de  $TNF\alpha$ , assim como uma baixa produção de

praticamente todas as citocinas analisadas no presente estudo, fato esse que comprova que a ação baixa de  $TNF\alpha$ , esta relacionada com uma baixa produção de outras citocinas. Tais achados se confirmam através da análise de NF $\kappa$ B, que também é fator de transcrição de mediadores da inflamação e que foi reduzida pela influência de todos os tratamentos impostos na fase aguda (3 dias). A única citocina dentre as analisadas que obteve aumento estatisticamente significativo no presente estudo foi IL-10.

O presente trabalho demonstrou em seus resultados que a associação do PRP+EXE no 14º dia aumentou significativamente a produção de IL-10 se comparado ao 3º dia, destacando-se a influência de IL-10 em inibir a produção de  $TNF\alpha$  pelos macrófagos, resultados que foram identificados no presente estudo apresentando assim um comportamento desejável no que se refere a resolução do processo inflamatório.

Wang; Chen (2016) relatam que a inativação da transformação do fator de crescimento beta-1 (TGF $\beta$ 1) pode ser um importante evento de sinalização para a patogênese da artrite. Os autores descrevem que TGF $\beta$ 1 estimula a expressão de Prg5, que codifica para Lubricina, uma molécula importante para diminuir o atrito da articulação e que está presente no líquido sinovial e desempenha um papel importante na lubrificação das articulações e na homeostase sinovial. Esses achados sugerem que a sinalização de TGF $\beta$ 1 pode desempenhar papel relevante e diferencial nas articulações durante o desenvolvimento da artrite. Analisando os achados do presente trabalho, nota-se uma diminuição significativa na expressão de TGF $\beta$ 1 em todos os grupos: PRP, EXE e PRP+EXE no 3º dia pós lesão articular em ratos. Tais resultados, fortalecem os achados de Wang; Chen (2016) pois comprovam que o modelo de indução de lesão articular foi efetivo em induzir a artrite no joelho de ratos, reduzindo assim os índices de expressão de TGF $\beta$ 1, denotando em um real estado de inflamação articular.

Todos os grupos tratados, seja com PRP isolado, EXE isolado, ou associação de PRP+EXE reduziram de forma significativa a expressão de VEGF no 3º dia. De fato VEGF é uma proteína relevante na neovascularização e que esta diretamente relacionada com o aspecto de cicatrização das estruturas periarticulares, já a sua redução indica aspectos positivos referentes ao controle do edema e do inchaço articular (NGUYEN; JACOBSEN; CHAHINE, 2017). Segundo Greaves et al., (2013)

esse controle do edema articular juntamente com análise da expressão de cNOS e outras enzimas pode indicar importante ação de cicatrização no tecido lesado. Ao analisar a expressão de cNOS, o presente estudo identificou que todos os grupos tratados na fase inicial reduziram significativamente a produção dessa enzima, já na fase tardia, não houve influência. Tal comportamento pode se justificar devido a possível ativação de outra via de sinalização de NO tal como a iNOS.

Uma das maiores preocupações no reparo das lesões articulares esta relacionada à produção excessiva de tecido conjuntivo e à formação de cicatriz, que retardam consideravelmente o tempo de recuperação (PARKER et al., 2017). O desenvolvimento de terapias direcionadas para evitar a expressão e deposição excessivas de colágeno maduro pode representar abordagens promissoras para o tratamento de lesões articulares (DUFFIELD et al., 2013). Considerando que um aumento na produção de colágeno traduz em fibrose articular e menos mobilidade as estruturas, nossos resultados revelam que os tratamentos baseados em aplicação de PRP, ou realização de exercício (EXE), ou a associação do PRP+EXE, não permitiram a deposição aumentada de colágeno maduro na capsula articular do joelho de ratos. Tais achados corroboram com os achados de Contreras-Muñoz et al. (2017) pois os autores relatam que o fator de crescimento tumoral b1 (TGF $\beta$ 1) é um fator chave no desenvolvimento da fibrose, os autores citam que a diminuição significativa na expressão de TGF $\beta$ 1 pode ter inibido a produção de colágeno por parte dos fibroblastos.

Cunha et al. (2014) também descreve a correlação entre baixo índices de TGF $\beta$ 1 com baixa ação fibroblástica e os autores mencionam ainda que a ação dos fibroblastos faz parte do processo tardio de cicatrização e funciona com o intuito de reparar o local lesionado.

## **Conclusão**

O exercício demonstrou ser responsável por reduzir a migração de células polimorfonucleares. Porém todos os grupos reduziram a neovascularização identificada através da diminuição de VEGF em todos os grupos na fase aguda, além de diminuir a expressão dos marcadores NF $\kappa$ B e TGF $\beta$ 1. Já na fase tardia somente o tratamento com exercício aumentou a neovascularização expressa pelo aumento de VEGF. O

tratamento com PRP isolado diminuiu a quantidade de células mononucleares assim como o grupo tratado pela associação de PRP+EXE-14, que além de diminuir a quantidade de células mononucleares, aumentou a expressão de IL-10, traduzindo para o grupo associação de PRP+EXE-14 um comportamento desejável para a cicatrização da artrite induzida em joelho de ratos.

## REFERENCIAS

AFSHARNIA, M. et al. *Electronic Physician* ( ISSN : 2008-5842 ). n. November, p. 3248–3256, 2016.

AMAR, E. et al. Platelet-rich plasma did not improve early healing of medial collateral ligament in rats. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 135, n. 11, p. 1571–1577, 2015.

BECK, J. et al. The biomechanical and histologic effects of platelet-rich plasma on rat rotator cuff repairs. **American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p. 2037–2044, 2012.

CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013a.

CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013b.

CHANG, N. J. et al. Therapeutic Effects of the Addition of Platelet-Rich Plasma to Bioimplants and Early Rehabilitation Exercise on Articular Cartilage Repair. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 9, p. 2232–2241, 2018.

CHATTERJEE, S. et al. Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.

CHICHARRO-ALCÁNTARA, D. et al. Platelet rich plasma: New insights for cutaneous wound healing management. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.

COCKS, M.; WAGENMAKERS, A. J. M. The effect of different training modes on skeletal muscle microvascular density and endothelial enzymes controlling NO availability. v. 8, n. July 2014, p. 2245–2257, 2016.

COLE, B. J. et al. Hyaluronic Acid Versus Platelet-Rich Plasma. **American Journal of**

**Sports Medicine**, v. 45, n. 2, p. 339–346, 2017.

CONTRERAS-MUÑOZ, P. et al. Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats but Are Not Synergistic When Combined. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 2131–2141, 2017.

COŞKUN, Ş. et al. Effect of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) on nitric oxide production and lipid peroxidation in oral mucosal wound healing. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 1, p. 23–28, 2011.

CRÓNICAS, T. Plasma Rico em Plaquetas : Alternativa Terapêutica. 2016.

CUNHA, R. C. et al. Effect of platelet-rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 1879–1881, 2014.

DALGLEISH, T. et al. [ **No Title** ]. [s.l: s.n.]. v. 136

DALLAUDIERE, B. et al. Combined intra-tendinous injection of Platelet Rich Plasma and bevacizumab accelerates and improves healing compared to Platelet Rich Plasma in tendinosis: Comprehensive assessment on a rat model. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 3, p. 351–356, 2014.

DENAPOLI, P. M. A. et al. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1962–1971, 2016.

DIETRICH, W. D. Temporal and Segmental Distribution of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases after Traumatic Spinal Cord Injury : Effect of Aminoguanidine Treatment. v. 19, n. 5, p. 639–651, 2002.

DOS ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 5, p. 975–983, 2017.

DUFFIELD, J. S. et al. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, n. 1, p. 241–276, 2013.

FILGUEIRAS, R. R. et al. Platelet rich plasma associated with heterologous fresh and thawed chondrocytes on osteochondral lesions of rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 168–176, 2014.

GARCIA, T. A. et al. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 21, n. 6, p. 425–433, 2017.

GONZALEZ, A. C. D. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.

- GRANDE, D. A. et al. Articular Cartilage Repair: Where We Have Been, Where We Are Now, and Where We Are Headed. **Cartilage**, v. 4, n. 4, p. 281–285, 2013.
- GREAVES, N. S. et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 206–217, 2013.
- GUEDES, R. N.; MARIA, R.; SERPA, G. A rtigo O riginal. v. 45, n. 2, p. 1731–1735, 2011.
- GUERREIRO, J. P. F. et al. Plasma rico em Plaquetas (PRP) aplicado na artroplastia total do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 2, p. 186–194, 2015.
- HAMID, M. S. A.; YUSOF, A.; MOHAMED ALI, M. R. Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2014.
- HASAN, S. et al. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff healing in a rat model. **Int J Sports Med**, p. Epub ahead of print, 2015.
- HERMETO, L. C. et al. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 789–794, 2012.
- HOTFIEL, T. et al. Nonoperative treatment of muscle injuries - recommendations from the GOTS expert meeting. **Journal of experimental orthopaedics**, v. 5, n. 1, p. 24, 2018.
- KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016a.
- KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016b.
- LENZA, M. et al. Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 122–127, 2013.
- MALAVOLTA, E. A. et al. Plasma rico em plaquetas no reparo artroscópico das roturas completas do manguito rotador. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 6, p. 741–747, 2012.
- MANDUCA, M. L.; STRAUB, S. J. Effectiveness of PRP Injection in Reducing Recovery Time of Acute Hamstring Injury: A Critically Appraised Topic. **Journal of Sport Rehabilitation**, p. 1–19, 2017.
- MAZZOCCA, A. D. et al. The Positive Effects of Different Platelet-Rich Plasma Methods on Human Muscle, Bone, and Tendon Cells. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1742–1749, 2012.
- MEADOWS, M. C. et al. Effects of Platelet-Rich Plasma and Indomethacin on

Biomechanics of Rotator Cuff Repair. **American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)**, v. 46, n. 5, p. E336–E343, 2017.

MILLER, R. E.; MILLER, R. J.; MALFAIT, A. M. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 185–193, 2014.

MIRANDA, M. M. et al. Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

NGUYEN, Q. T.; JACOBSEN, T. D.; CHAHINE, N. O. Effects of Inflammation on Multiscale Biomechanical Properties of Cartilaginous Cells and Tissues. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2644–2656, 2017.

NIU, K. Y.; RO, J. Y. Changes in intramuscular cytokine levels during masseter inflammation in male and female rats. **Neuroscience Letters**, v. 487, n. 2, p. 223–227, 2011.

PALACIO, E. P. et al. Efeitos do plasma rico em plaquetas na epicondilite lateral do cotovelo: Estudo prospectivo, randomizado e controlado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 51, n. 1, p. 90–95, 2016.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 58–65, 2011.

PARKER, L. et al. Age and sex differences in human skeletal muscle fibrosis markers and transforming growth factor- $\beta$  signaling. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 7, p. 1463–1472, 2017.

PAS, H. I. M. F. L. et al. Efficacy of rehabilitation (lengthening) exercises, platelet-rich plasma injections, and other conservative interventions in acute hamstring injuries: An updated systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 18, p. 1197–1205, 2015.

PATEL, S. et al. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: A prospective, double-blind, randomized trial. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 2, p. 356–364, 2013.

PLENTZ, R. D. M. et al. Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 6, p. 488–494, 2008.

PRESTES, A. N. et al. Effect of platelet-rich plasma on muscle injuries associated with physical exercise. v. 53, n. 2, p. 81–86, 2012.

QUARTEIRO, M. L. et al. O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 5, p. 586–595, 2015.

ROVERE-QUERINI, P.; CLEMENTI, E.; BRUNELLI, S. Nitric oxide and muscle repair : Multiple actions converging on therapeutic efficacy. v. 730, p. 181–185, 2014.

SAUCEDO, J. M. et al. Platelet-rich plasma. **Journal of Hand Surgery**, v. 37, n. 3, p. 587–589, 2012.

SCHÄR, M. O. et al. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, n. 5, p. 1635–1643, 2015.

SCHIPPINGER, G. et al. Autologous Platelet-Rich Plasma Preparations: Influence of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Platelet Function. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1–6, 2015.

SEBBEN, A. D. et al. Estudo comparativo do uso isolado de plasma rico em plaquetas e combinado com cimento de alfa-fosfato tricálcico no reparo ósseo em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 4, p. 505–512, 2012.

SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 847–852, 2012.

TATLER, A. L. et al. Integrin  $\alpha 5$ -Mediated TGF- Activation by Airway Smooth Muscle Cells in Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 11, p. 6094–6107, 2011.

TRUFLANDIER, K. et al. Mechanical ventilation modulates pro-inflammatory cytokine expression in spinal cord tissue after injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 671, n. November 2017, p. 13–18, 2018.

UÉBEC, C. E. D. U. Guide de reconnaissance. v. 61, p. 260–265, 2008.

VASCONCELOS, S.; FERNANDA, R. Resistance exercise , muscle damage and inflammatory response “ what doesn ’ t kill you makes you stronger ”. **MOJ Sports Medicine**, v. 2, n. 2, p. 70–72, 2018.

VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, T. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Rev. bras. cir. plást.**, v. 25, n. 4, p. 589–594, 2010.

VETRANO, M. et al. Platelet-rich plasma versus focused shock waves in the treatment

of Jumper's knee in athletes. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 795–803, 2013.

WANG, T. Y.; CHEN, D. Differential roles of TGF- $\beta$  signalling in joint tissues during osteoarthritis development. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 11, p. e72–e72, 2016.

WASTERLAIN, A. S. et al. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013a.

WASTERLAIN, A. S. et al. The Systemic Effects of Platelet-Rich Plasma Injection. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013b.

WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 825–853, 2016.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–1040, 2012.

YANG, J.; LU, Y.; GUO, A. Platelet-rich plasma protects rat chondrocytes from interleukin-1induced apoptosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4075–4082, 2016.

ZHANG, J. et al. The combined use of kartogenin and platelet-rich plasma promotes fibrocartilage formation in the wounded rat Achilles tendon entheses. **Bone and Joint Research**, v. 6, n. 4, p. 231–244, 2017.

#### 4. CONCLUSÃO

A presente tese permitiu através da realização da pesquisa bibliográfica inferir que o PRP é uma técnica eficaz na cicatrização das lesões musculares e articulares, por potencializar a liberação de fatores de crescimento que potencializam o processo de cicatrização e que possui suas capacidades potencializadas quando associado a outras terapias, tais como a realização de exercício.

Conclui-se ainda, que para as lesões musculares traumáticas em ratos na fase aguda a realização de EXE, PRP e PRP+EXE, reduzem a quantidade de células polimorfonucleares assim como a expressão de cNOS, aumentando a neovascularização demonstrado pelo aumento de VEGF. Além disso, o tratamento com a associação PRP+EXE diminuiu IL-4, IFN, e TNF, permitindo afirmar que na fase aguda, a associação responde melhor na cicatrização do músculo lesionado de ratos. Após 14 dias de lesão muscular houve uma redução de VEGF em todos os grupos tratados. Somente a associação PRP+EXE foi capaz de diminuir TGF $\beta$ 1 e IL-4. O PRP isolado ou associado ao EXE elevou índices da produção de IL-10.

Em relação a lesão articular induzida por inflamação no joelho de ratos, os tratamentos com PRP, EXE e PRP+EXE reduziram a neovascularização identificada através da diminuição de VEGF em todos os grupos na fase aguda, além de diminuir a expressão dos marcadores NF $\kappa$ B e TGF $\beta$ 1. Já na fase tardia, somente o tratamento com exercício aumentou a neovascularização expressa pelo aumento de VEGF. O tratamento com PRP isolado diminuiu a quantidade de células mononucleares assim como o grupo tratado pela associação de PRP+EXE<sup>14</sup>, que além de diminuir a quantidade de células mononucleares, aumentou a expressão de IL-10, traduzindo para o grupo associação de PRP+EXE um comportamento desejável para a cicatrização da artrite induzida em joelho de ratos.

## 5. REFERENCIAS

- AFSHARNIA, M. et al. *Electronic Physician* ( ISSN : 2008-5842 ). n. November, p. 3248–3256, 2016.
- AMAR, E. et al. Platelet-rich plasma did not improve early healing of medial collateral ligament in rats. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 135, n. 11, p. 1571–1577, 2015.
- BECK, J. et al. The biomechanical and histologic effects of platelet-rich plasma on rat rotator cuff repairs. **American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p. 2037–2044, 2012.
- CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013a.
- CARNEIRO, M. DE O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80–86, 2013b.
- CHANG, N. J. et al. Therapeutic Effects of the Addition of Platelet-Rich Plasma to Bioimplants and Early Rehabilitation Exercise on Articular Cartilage Repair. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 9, p. 2232–2241, 2018.
- CHATTERJEE, S. et al. Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- CHICHARRO-ALCÁNTARA, D. et al. Platelet rich plasma: New insights for cutaneous wound healing management. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.
- COCKS, M.; WAGENMAKERS, A. J. M. The effect of different training modes on skeletal muscle microvascular density and endothelial enzymes controlling NO availability. v. 8, n. July 2014, p. 2245–2257, 2016.
- COLE, B. J. et al. Hyaluronic Acid Versus Platelet-Rich Plasma. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 2, p. 339–346, 2017.
- CONTRERAS-MUÑOZ, P. et al. Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats but Are Not Synergistic When Combined. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 2131–2141, 2017.
- COŞKUN, Ş. et al. Effect of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) on nitric oxide production and lipid peroxidation in oral mucosal wound healing. **Medicinal**

**Chemistry Research**, v. 20, n. 1, p. 23–28, 2011.

CRÓNICAS, T. Plasma Rico em Plaquetas : Alternativa Terapêutica. 2016.

CUNHA, R. C. et al. Effect of platelet-rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 1879–1881, 2014.

DALGLEISH, T. et al. [ **No Title** ]. [s.l: s.n.]. v. 136

DALLAUDIERE, B. et al. Combined intra-tendinous injection of Platelet Rich Plasma and bevacizumab accelerates and improves healing compared to Platelet Rich Plasma in tendinosis: Comprehensive assessment on a rat model. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 3, p. 351–356, 2014.

DENAPOLI, P. M. A. et al. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1962–1971, 2016.

DIETRICH, W. D. Temporal and Segmental Distribution of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases after Traumatic Spinal Cord Injury : Effect of Aminoguanidine Treatment. v. 19, n. 5, p. 639–651, 2002.

DOS ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 5, p. 975–983, 2017.

DUFFIELD, J. S. et al. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, n. 1, p. 241–276, 2013.

FILGUEIRAS, R. R. et al. Platelet rich plasma associated with heterologous fresh and thawed chondrocytes on osteochondral lesions of rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 168–176, 2014.

GARCIA, T. A. et al. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 21, n. 6, p. 425–433, 2017.

GONZALEZ, A. C. D. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.

GRANDE, D. A. et al. Articular Cartilage Repair: Where We Have Been, Where We Are Now, and Where We Are Headed. **Cartilage**, v. 4, n. 4, p. 281–285, 2013.

GREAVES, N. S. et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 206–217, 2013.

GUEDES, R. N.; MARIA, R.; SERPA, G. A rtigo O riginal. v. 45, n. 2, p. 1731–1735,

2011.

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

HAMID, M. S. A.; YUSOF, A.; MOHAMED ALI, M. R. Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2014.

HASAN, S. et al. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff healing in a rat model. **Int J Sports Med**, p. Epub ahead of print, 2015.

HERMETO, L. C. et al. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 789–794, 2012.

HOTFIEL, T. et al. Nonoperative treatment of muscle injuries - recommendations from the GOTS expert meeting. **Journal of experimental orthopaedics**, v. 5, n. 1, p. 24, 2018.

KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016a.

KNOP, E.; DE PAULA, L. E.; FULLER, R. Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 152–164, 2016b.

LENZA, M. et al. Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 122–127, 2013.

MALAVOLTA, E. A. et al. Plasma rico em plaquetas no reparo artroscópico das roturas completas do manguito rotador. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 6, p. 741–747, 2012.

MANDUCA, M. L.; STRAUB, S. J. Effectiveness of PRP Injection in Reducing Recovery Time of Acute Hamstring Injury: A Critically Appraised Topic. **Journal of Sport Rehabilitation**, p. 1–19, 2017.

MAZZOCCA, A. D. et al. The Positive Effects of Different Platelet-Rich Plasma Methods on Human Muscle, Bone, and Tendon Cells. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1742–1749, 2012.

MEADOWS, M. C. et al. Effects of Platelet-Rich Plasma and Indomethacin on Biomechanics of Rotator Cuff Repair. **American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)**, v. 46, n. 5, p. E336–E343, 2017.

MILLER, R. E.; MILLER, R. J.; MALFAIT, A. M. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 185–193, 2014.

MIRANDA, M. M. et al. Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in

experimental leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

NGUYEN, Q. T.; JACOBSEN, T. D.; CHAHINE, N. O. Effects of Inflammation on Multiscale Biomechanical Properties of Cartilaginous Cells and Tissues. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2644–2656, 2017.

NIU, K. Y.; RO, J. Y. Changes in intramuscular cytokine levels during masseter inflammation in male and female rats. **Neuroscience Letters**, v. 487, n. 2, p. 223–227, 2011.

PALACIO, E. P. et al. Efeitos do plasma rico em plaquetas na epicondilite lateral do cotovelo: Estudo prospectivo, randomizado e controlado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 51, n. 1, p. 90–95, 2016.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 58–65, 2011.

PARKER, L. et al. Age and sex differences in human skeletal muscle fibrosis markers and transforming growth factor- $\beta$  signaling. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 7, p. 1463–1472, 2017.

PAS, H. I. M. F. L. et al. Efficacy of rehabilitation (lengthening) exercises, platelet-rich plasma injections, and other conservative interventions in acute hamstring injuries: An updated systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 18, p. 1197–1205, 2015.

PATEL, S. et al. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: A prospective, double-blind, randomized trial. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 2, p. 356–364, 2013.

PLENTZ, R. D. M. et al. Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 6, p. 488–494, 2008.

PRESTES, A. N. et al. Effect of platelet-rich plasma on muscle injuries associated with physical exercise. v. 53, n. 2, p. 81–86, 2012.

QUARTEIRO, M. L. et al. O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 5, p. 586–595, 2015.

ROVERE-QUERINI, P.; CLEMENTI, E.; BRUNELLI, S. Nitric oxide and muscle repair : Multiple actions converging on therapeutic efficacy. v. 730, p. 181–185, 2014.

- SAUCEDO, J. M. et al. Platelet-rich plasma. **Journal of Hand Surgery**, v. 37, n. 3, p. 587–589, 2012.
- SCHÄR, M. O. et al. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, n. 5, p. 1635–1643, 2015.
- SCHIPPINGER, G. et al. Autologous Platelet-Rich Plasma Preparations: Influence of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Platelet Function. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1–6, 2015.
- SEBBEN, A. D. et al. Estudo comparativo do uso isolado de plasma rico em plaquetas e combinado com cimento de alfa-fosfato tricálcico no reparo ósseo em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 4, p. 505–512, 2012.
- SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 847–852, 2012.
- TATLER, A. L. et al. Integrin  $\alpha 5$ -Mediated TGF- $\beta$  Activation by Airway Smooth Muscle Cells in Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 11, p. 6094–6107, 2011.
- TRUFLANDIER, K. et al. Mechanical ventilation modulates pro-inflammatory cytokine expression in spinal cord tissue after injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 671, n. November 2017, p. 13–18, 2018.
- UÉBEC, C. E. D. U. Guide de reconnaissance. v. 61, p. 260–265, 2008.
- VASCONCELOS, S.; FERNANDA, R. Resistance exercise , muscle damage and inflammatory response “ what doesn ’ t kill you makes you stronger ”. **MOJ Sports Medicine**, v. 2, n. 2, p. 70–72, 2018.
- VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, T. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Rev. bras. cir. plást**, v. 25, n. 4, p. 589–594, 2010.
- VETRANO, M. et al. Platelet-rich plasma versus focused shock waves in the treatment of Jumper’s knee in athletes. **American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 795–803, 2013.
- WANG, T. Y.; CHEN, D. Differential roles of TGF- $\beta$  signalling in joint tissues during osteoarthritis development. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 11, p. e72–e72, 2016.
- WASTERLAIN, A. S. et al. The systemic effects of platelet-rich plasma injection.

**American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013a.

WASTERLAIN, A. S. et al. The Systemic Effects of Platelet-Rich Plasma Injection. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 1, p. 186–193, 2013b.

WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 825–853, 2016.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–1040, 2012.

YANG, J.; LU, Y.; GUO, A. Platelet-rich plasma protects rat chondrocytes from interleukin-1induced apoptosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4075–4082, 2016.

ZHANG, J. et al. The combined use of kartogenin and platelet-rich plasma promotes fibrocartilage formation in the wounded rat Achilles tendon entheses. **Bone and Joint Research**, v. 6, n. 4, p. 231–244, 2017.