

PUCRS

**ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FRANCIELE DIETRICH

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO REPARO DO TENDÃO DE
AQUILES EM RATOS**

**Porto Alegre
2017**

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



**Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO REPARO DO TENDÃO DE
AQUILES EM RATOS

FRANCIELE DIETRICH

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutora em Medicina e
Ciências da Saúde pela Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva

Coorientador: Dr. Vinícius Faccin Bampi

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

D566e Dietrich, Franciele

Efeito do plasma rico em plaquetas no reparo do tendão de aquiles em ratos / Franciele Dietrich . – 2017.

102 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius Faccin Bampi.

1. reparo. 2. plaquetas. 3. tendão calcâneo. 4. microbiota. 5. resistência a tração. I. Braga da Silva, Jefferson Luís. II. Bampi, Vinícius Faccin. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FRANCIELE DIETRICH

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO REPARO DO TENDÃO DE
AQUILES EM RATOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina e Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovada em: 26 de Julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin

Prof. Dr^a. Andreia Aparecida Guimarães Strohschoen

Dr. Eduardo Goldani

Prof. Dr. Jorge Antonio Pastro Noronha

Prof. Dr. Lúcio Sarubbi Fillmann

Porto Alegre

2017

DEDICATÓRIA

Ao meu amor Jean,

Pai Lírio, Mãe Soeli e irmã Fabrícia.

Meus irmãos de quatro patas, Fiona, Mel e Bobinho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

*“Have courage and be kind. Where there is kindness there is goodness
and where there is goodness, there is magic.”*

Cinderella, 2015

Ao Professor Doutor **Jefferson Braga Silva** que oportunizou a ampliação dos meus conhecimentos na área da pesquisa e que sempre incentivou a busca pela excelência. Sou eternamente grata a você, que desde o mestrado confia no meu trabalho.

Ao Doutor **Vinícius Faccin Bampi**, que esteve presente e me estimulando durante todas as fases de concretização deste trabalho. Mais que um orientador, uma amigo-irmão que me fez crescer como pessoa e espírito.

To Professor Doctor **Per Aspenberg**, for accepting me in your high-level research group. For trusting, stimulating and challenging me every day. Thank you for the daily lessons. I will take the advices that you have shared with me, through my whole life.

Ao Professor Doutor **Vinícius Duval**, por sempre estar disposto a me auxiliar, me incentivar e repassar todos os seus conhecimentos desde a época do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa integral e bolsa de doutorado sanduíche durante a realização dos meus estudos.

För kära **Birgitte Kayser** och **Licka**, för att ni är min Svenska familj, delar glada stunder och alltid är där när det behövs.

To **Malin Hammerman**, my Swedish friend/sister, for always being helpful. Also, for all the good and long conversations that have resulted in a nice collaboration.

To **Parmis Blomgran** and **Malin Hammerman**, for believing together with me that in the end, everything is possible.

A minha professora, amiga e eterna orientadora **Andreia A. G. Strohschoen** por me transmitir paz em todos os momentos de incertezas.

To **Pernilla Eliasson**, for sharing knowledge and experiences to me, and also trusting in my work.

To the lab colleagues, and now friends, **Malin H., Pernilla E., Parmis B., Olof Sandberg, Anna Svärd, Magnus Bernhardsson, Love Tätting** and **Cornelia Bratengeier**, for all the good moments that we have shared.

Às queridas, **Caroline P. Klein, Juliana O. Rangel** e **Alice C. Pellizzari** minhas amigas-irmãs que desde a época de mestrado me estimulam, me paparicam e fazem eu me sentir mais confiante.

Aos meus sogros **José Zagonel** e **Maria Clecy de Souza** e à minha cunhada **Bruna P. Zagonel** por sempre vibrarem com as minhas conquistas.

A **Fiona, Mel e Bobinho**, que a cada abanar de rabinho me animam e enchem meu coração de felicidade.

À minha irmã **Dr^a. Fabrícia Dietrich**, minha inspiração acadêmica. Por desde sempre ser meu apoio intelectual, esbanjando paciência para me ensinar e repassar todo o seu conhecimento.

As pessoas mais importantes da minha vida, mãe **Soeli F. Dietrich** e pai **Lírio Dietrich**, por desde pequena me ensinarem a importância do estudo, da honestidade e da independência. Por me ensinarem a ser forte e a compreender que as dificuldades nos fazem crescer. Por acreditarem em mim e me estimularem a sempre querer mais. Obrigada por existirem. Amo vocês!

Ao meu esposo **Jean Zagonel**, pelas longas conversas, apoio, incentivo e compreensão durante a realização de minhas aventuras acadêmicas. Por me encorajar, por me escutar, me apoiar e me ajudar em todos os momentos necessários. Obrigada por compartilhar sonhos comigo e por me estimular nessa incessante busca pelo aperfeiçoamento.

*"I don't know anything, but I do know that everything is interesting
if you go into it deeply enough."*

*Richard Feynman
Nobel Prize, 1965.*

RESUMO

A crescente incidência de lesões tendíneas constituem um desafio constante na medicina ortopédica. A utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) é uma estratégia amplamente explorada na clínica por creditar-se que acelera o processo de reparo tendíneo. Contudo, a eficácia clínica do PRP é questionável, e mais estudos que visem uma melhor compreensão deste tratamento são necessários. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do PRP no reparo do tendão de Aquiles (TA) de ratos. Um total de 242 ratos foram utilizados, sendo 181 animais randomicamente distribuídos em 6 diferentes experimentos. Os animais restantes foram utilizados como doadores sanguíneos (n= 49) e para realização de citometria de fluxo (n=12). A lesão foi executada através de transecção do TA direito. A avaliação do reparo foi feita 11 e 14 dias pós-cirúrgico, através de máquina de teste mecânico. O pico de força foi considerado a variável principal. Variações no protocolo de produção de PRP, concentração de leucócitos e atividade física dos ratos foram testados. O teste de ELISA foi realizado a fim de quantificar o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-AB) presente no PRP. Foram utilizados animais livres de patógenos e animais contaminados com *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). A concentração plaquetária do PRP padrão foi pelo menos 5 vezes maior que a do sangue periférico, e foi possível obtermos tanto uma alta ou baixa concentração de leucócitos no preparado. Os níveis de PDGF-AB no PRP inativado foram de 7.3 µg/mL (DP 6.0; n=4) e no plasma sanguíneo foram abaixo dos níveis de detecção (0.03 ng/mL). Nos experimentos realizados com ratos livres de patógenos, nenhum efeito significativo do PRP pôde ser observado no reparo tendíneo. Da mesma forma, nenhuma diferença significativa pôde ser encontrada nos ratos tratados com PRP com alta ou baixa concentração de leucócitos. Em contraste, os ratos contaminados com *S. aureus* demonstraram aumento da força tendínea após o tratamento com PRP. Significante interação entre estado bacteriológico e tratamento PRP foi verificada (p=0.003). Observou-se ainda, que ratos saudáveis possuíam maiores níveis de células T citotóxicas em seus baços. A diferença na resposta ao tratamento em ratos contaminados sugere que o efeito do PRP é dependente do estado imune dos animais. Esse é o primeiro estudo que sugere a possibilidade de interação entre microbiota e reparo tendíneo. A extrapolação deste tratamento para a clínica permanece dúvida.

Palavras-chaves: Sistema imune; plaquetas; tendão calcâneo; *Staphylococcus aureus*; resistência a tração, cicatrização, tecido conjuntivo.

ABSTRACT

The increasing incidence of tendon injuries is a constant challenge in orthopaedic medicine. The use of platelet-rich plasma (PRP) is a strategy widely explored in the clinic because it is believed to accelerate the tendon repair process. However, the PRP clinical efficacy is uncertain, and more studies that aim to a better understanding of this treatment are needed. The aim of this research was to evaluate the PRP effect on the Achilles tendon (AT) repair of rats. A total of 242 rats were used, where 181 animals were randomly distributed in 6 different experiments. The remaining animals were used as blood donors (n=49) and for flow cytometry (n=12). The lesion was performed by transection of the right AT. The repair evaluation occurred after 11 and 14 postoperative days, with a mechanical testing machine. Peak force was considered the primary variable. Variations in the PRP production protocols, leukocyte concentration and physical activity of the rats were tested. ELISA test was performed to quantify platelet-derived growth factor (PDGF-AB) present in PRP. Pathogen-free animals and animals contaminated with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were used. Standard PRP platelet concentration was at least 5 times higher than that of the peripheral blood, and it was possible to have either a high or a low leukocyte concentration in the preparation. PDGF-AB levels in inactivated PRP were 7.3 µg/mL (SD 6.0; n=4) and in plasma were below the detection levels (0.03 ng/mL). In the experiments performed with pathogen-free rats, no significant effect of PRP could be observed on tendon repair. In the same way, no significant difference could be found in the rats treated with PRP with higher or lower leukocyte concentration. In contrast, rats contaminated with *S. aureus* showed increased tendon force after PRP treatment. Significant interaction between bacteriological status and PRP treatment was verified (p=0.003). It was further observed that healthy rats had higher levels of cytotoxic T cells in their spleens. The difference in response to treatment in contaminated rats suggests that the PRP effect is dependent on the immune status of the animals. This is the first study that suggests the possibility of interaction between microbiota and tendon repair. Extrapolation of this treatment to the clinic remains dubious.

Key-words: Immune system, platelet, calcaneal tendon, *Staphylococcus aureus*, tensile strength, healing, connective tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de colágeno.	21
Figura 2. Representação gráfica da organização da estrutura tendínea	22
Figura 3. Ilustração esquemática do papel dos fatores de crescimentos durante os estágios de cicatrização.....	29
Figura 4. Esquema de reparo tendíneo.....	30
Figura 5. Gráfico de propriedades biomecânicas.....	36
Figura 6. Acondicionamento animal.....	39
Figura 7. Visão geral do trabalho de pesquisa.	41
Figura 8. Procedimento cirúrgico.	43
Figura 9. Esquema ampliado de modelo de ruptura padrão realizado no tendão de Aquiles direito dos ratos.	44
Figura 10. Fração resultante da segunda centrifugação.....	45
Figura 11. Fração correspondente ao PRP.....	46
Figura 12. Processo de preparo do PRP padrão e L-PRP	47
Figura 13. Esquema representativo dos tratamentos utilizados e modelo de ruptura, de acordo com o período de avaliação.....	49
Figura 14. Caixa de dois andares utilizada para estimular o aumento da atividade física dos animais.	50
Figura 15. Coleta de material para teste mecânico.	53
Figura 16. Máquina utilizada para a realização de teste de tração.	54
Figura 17. Realização de teste mecânico dos tendões reparados.....	55
Figura 18. Medidas mecânicas provenientes do software da máquina de tração.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de animais utilizados em cada um dos 6 experimentos realizados.....	41
Tabela 2 - Visão geral de todos os grupos experimentais e suas peculiaridades	51
Tabela 3 - Detalhes dos anticorpos utilizados neste estudo para configuração de citometria de fluxo	59

LISTA DE ABREVIATURAS

—	Dividido
/	Por, dividido
#	Número
%	Por cento, porcentagem
°	Grau
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
<	Maior
=	Igual
≠	Diferença
>	Menor
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase
ANOVA	Análise de variância
AT	Achilles Tendon
C ou []	Concentração
Ca Cl₂	Cloreto de Cálcio
CBR	Centro de Recursos Biomédicos
cm	Centímetros
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Dióxido de carbono
CPD	Citrato fosfato dextrose
<i>d</i>	Diâmetro
DP	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento epitelial
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
<i>et al</i>	E demais
FC	Fator de crescimento
FCs	Fatores de crescimento
FMO	Fluorescência minus one
g	Gramas
g	Gravidade

GDF	Fator de crescimento diferenciado
Gy	Gray
HE	Hematoxilina e eosina
IGF	Fator de crescimento insulino dependente
Kg	Kilograma
L	Litro
I-PRP	Plasma rico em plaquetas com baixa concentração de leucócitos
L-PRP	Plasma rico em plaquetas com alta concentração de leucócitos
LIU	Linköping University – Universidade de Linköping
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mol	Quantidade de matéria
Mpa	Megapascal
N	Newton
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
n° ou N	Número
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRF	Fibrina rica em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RPM	Rotações por minuto
s	Segundo
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standard deviation = Desvio Padrão
SD	Sprague- Dawley
TA	Tendão de Aquiles
TGF	Fator de crescimento transformador
TM	Trademark

TMB	Tetrametilbenzidina
U	Unidade
V ou vol	Volume
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
W	Wistar
X	Vezes
α	Alfa
β	Beta
β-FGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
γ	Lambda
δ	Delta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
π	Pi

SUMÁRIO

1	PREFÁCIO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	HISTOFISIOLOGIA DO TENDÃO	20
2.2	TENDÃO: DA LESÃO AO PROCESSO DE REPARO.....	23
2.3	PLASMA RICO EM PLAQUETAS - PRP	33
2.4	PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA	38
4.2	APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA	38
4.3	ACONDICIONAMENTO ANIMAL.....	38
4.4	PROCEDÊNCIA ANIMAL	39
4.5	CÁLCULO AMOSTRAL.....	40
4.6	GRUPOS DE EXPERIMENTAÇÃO	40
4.7	PROCEDIMENTO E TRATAMENTO OPERATÓRIO PADRÃO	42
4.7.1	Anestesia, analgesia e antibioticoprofilaxia	42
4.7.2	Procedimento Cirúrgico.....	42
4.8	PREPARAÇÃO PADRÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	44
4.8.1	Preparação do PRP com alta concentração de leucócitos.....	47
4.8.2	Preparação de PRP ativado com trombina ou cloreto de Cálcio (CaCl ₂).....	48
4.9	EUTANÁSIA	48
4.10	VARIAÇÃO DOS EXPERIMENTOS EM RELAÇÃO AOS PROCEDIMENTOS PADRÕES.....	48
4.11	TESTE BIOMECÂNICO	51
4.12	ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA).....	57
4.13	CITOMETRIA DE FLUXO.....	57
4.14	ESTATÍSTICA.....	59
4.15	ASPECTOS BIOÉTICOS.....	60
5	REFERÊNCIAS.....	62

ANEXOS	75
ANEXO 1 - ARTIGO PUBLICADO	76
ANEXO 2 - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE	85
ANEXO 3 - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL	86
ANEXO 4 - DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO	87
ANEXO 5 - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM CUIDADOS ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE LINKÖPING NA SUÉCIA	88
ANEXO 6 - ESTADO DE SAÚDE DOS RATOS SOPF, PROCEDENTES DA INSTALAÇÃO NOMEADA 8D	90
ANEXO 7 - ESTADO DE SAÚDE DOS RATOS SPF, PROCEDENTES DA INSTALAÇÃO NOMEADA UPI	94
ANEXO 8 - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ACTA ORTHOPAEDICA	95

1 PREFÁCIO

As lesões tendíneas constituem um desafio constante na medicina ortopédica, estimulando o desenvolvimento de pesquisas que visem o aperfeiçoamento e a aceleração do processo de reparo do tecido lesionado.

Diversos biomateriais tem sido investigados e testados com esse intuito, porém resultados satisfatórios ainda não foram encontrados, instigando ainda mais a busca por novas alternativas viáveis. Credita-se ao uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) a promoção de uma cicatrização acelerada, melhorando assim a qualidade de vida do paciente como um todo.

Por ser uma fonte natural de fatores de crescimento, de fácil obtenção e com baixo valor agregado, o PRP paulatinamente se difundiu na clínica, mesmo ainda sem obter-se resultados amplamente convincentes neste campo que demonstrem a certeza do seu potencial efeito benéfico em humanos.

O número de estudos que descrevem o benefício deste tratamento em diversos modelos experimentais é alto quando comparado ao número de publicações com efeitos negativos. Da mesma forma, efeito placebo bem como efeito positivo do uso deste tratamento na clínica já foram averiguados.

Os resultados histológicos obtidos previamente em modelo de transeção tendínea animal, realizados pelo nosso grupo brasileiro (DIETRICH *et al.*, 2015), contradizem grande parte dos achados disponíveis e investigados cientificamente.

Nosso primeiro estudo publicado nesta área demonstra que PRP quando aplicado imediatamente após a lesão, não é efetivo em acelerar o processo de regeneração do tendão de Aquiles (TA) de ratos. Neste, nenhuma diferença significativa, 28 dias pós cirúrgico, pôde ser observada quando utilizado PRP como tratamento. Ainda, quando analisado qualitativamente, imagens histológicas em coloração HE, neste tempo, foram verificados resultados inferiores no grupo PRP, como a presença de áreas hemorrágicas (Anexo 1).

Todavia, apesar das limitações de nosso estudo prévio, como variáveis na produção do tratamento e a não realização de teste biomecânico, a verificação dos resultados opostos aos achados literários, fizeram-nos questionar e refletir ainda mais sobre o assunto.

Diante dos fatos, precisávamos compreender o real papel do PRP e tínhamos o conhecimento de que o pesquisador Per Aspenberg da Universidade de Linköping na Suécia fora o primeiro pesquisador a publicar, no ano de 2004, o efeito positivo do uso de PRP no reparo de TA em ratos. Entretanto, o mesmo autor publicou no ano de 2011 que o PRP não é eficaz para o tratamento de ruptura de TA em humanos.

De posse dos resultados do nosso grupo, iniciamos um projeto em cooperação com essa universidade sueca, com o objetivo de refazer os experimentos para esclarecer a possível diferença encontrada.

A única diferença significativa positiva relacionada ao uso do PRP encontrada na pesquisa desenvolvida pelo nosso grupo, anteriormente à realização da colaboração, fora que, em 14 dias pós lesão, a quantidade de colágeno tipo I e III era estatisticamente diferente quando relacionada ao grupo controle.

Na tentativa de encontrar uma "teoria unificadora" para este modelo, nós especulamos que todos os efeitos positivos sobre a cicatrização poderiam estar relacionados à inflamação, incluindo os efeitos anteriores com PRP encontrados em ambos grupos de pesquisa. Isso nos levou a suspeita de que o efeito atribuído anteriormente aos fatores de crescimento inseridos no PRP poderia ser, ao invés disso, devido a influências inespecíficas sobre a inflamação.

A fim de demonstrar o efeito benéfico, nós precisávamos repetir as experiências antigas utilizando-se o PRP. Entretanto, após realizar estes experimentos, verificou-se que não fomos capazes de conseguir reproduzir os resultados previamente positivos.

A fim de reproduzir o experimento com efeito positivo no ano de 2004, diversas variáveis na produção do tratamento haviam sido testadas, desde a ativação ou não das plaquetas com ou sem fatores externos, a diversidade na concentração plaquetária e leucocitária, a irradiação ou não deste material, bem como a estimulação mecânica nos animais.

Enquanto tentávamos incansavelmente encontrar o que havia de diferente entre os antigos experimentos bem sucedidos e os novos fracassados, finalmente consideramos a observação recentemente publicada: a cicatrização de fraturas ósseas em camundongos é dependente do ambiente bacteriológico das instalações de criação (REINKE *et al.*, 2013).

Neste estudo, a cicatrização da fratura é prejudicada se o sistema imunológico tiver amadurecido como consequência de desafios bacterianos, alterando especialmente os níveis

de células T-CD8+. Por coincidência, testes de triagem de rotina de um lote de ratos entregues a nós demonstrou crescimento de *Staphylococcus aureus*. Estes animais foram impedidos de acessar à instalação padrão de animais. Isso desencadeou uma chance inesperada para testar o papel do status bacteriológico: os ratos foram transferidos para outra instalação, e pela primeira vez, os efeitos antigos de PRP reapareceram. Ao testar esta hipótese, observamos que o efeito parecia estar relacionado com a microbiota.

A falha em reproduzir experimentos anteriores em ratos não contaminados foi surpreendente e a diferença encontrada na resposta entre esses animais e os ratos contaminados com *Staphylococcus*, sugere que o efeito do PRP é dependente do sistema imune e as funções do PRP podem ser mais complexas do que somente a liberação de fatores de crescimento.

A experiência clínica com o PRP é questionável, e não há nenhuma evidência de um efeito positivo de cicatrização tendínea, tendinopatias ou problemas de entese, mesmo que alguns artigos aleguem que há.

A transição de estudos experimentais para clínicos é complexa. Uma diferença básica entre ratos e humanos é o tamanho. Esta variável tem maiores efeitos em relação as distâncias de difusão e migração e a necessidade para fornecimento vascular precoce no local da lesão, entre outros.

Estudos de ciência básica que visem uma melhor compreensão deste tratamento ainda são necessários, investigando a fundo o papel destes concentrados e outras variáveis relacionadas a esse processo.

A extrapolação dos resultados encontrados anteriormente com o uso do PRP para humanos, em função dos nossos achados, torna-se ainda mais incerta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTOFISIOLOGIA DO TENDÃO

O tendão é formado por tecido conjuntivo denso, sendo constituído por fibroblastos e matriz extracelular, onde estão imersas as proteínas fibrosas de colágeno e elastina, tais como as glicoproteínas, as proteoglicanas, e os mucopolissacarídeos (ENWEMEKA, 1989a).

O tecido tendíneo pode ser diferenciado dos demais devido a sua pequena proporção de células quando em relação a quantidade de matriz extracelular presente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Neste tecido, as células, denominadas tenoblastos e tenócitos se conectam através da matriz umas as outras, comunicando-se através de junções gap (WALL *et al.*, 2007). Estas células são responsáveis pela produção de colágeno (KANNUS, 2000), sendo o colágeno tipo I e III os principais componentes da matriz extracelular em tendões (SHARMA e MAFFULLI, 2005).

As estruturas tendíneas são um conjunto de fibras colágenas compactas que conectam o músculo ao osso, possuindo aproximadamente 70% de água, sendo boa parte associada aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular (RILEY *et al.*, 1994).

O colágeno, constituinte básico do tendão, representa até 95% de seu peso, sendo sua maior proporção referida ao colágeno tipo I e menos de 10% de colágeno tipo III (RUFAl *et al.*, 1995). Além destes constituintes, estão presentes ainda aproximadamente 2% de elastina (KANNUS, 2000; EYDEN e TZAPHLIDOU, 2001) e, conforme Ahtikoski *et al.* (2003), uma pequena quantidade de colágeno tipo IV (AHTIKOSKI *et al.*, 2003).

Na síntese de colágeno (Figura 1), a enzima lisil oxidase converte determinados grupos de lisina e hidroxilisina em aldeídos, que espontaneamente formam ligações cruzadas que estabilizam as fibras colágenas (LIU *et al.*, 1995), reduzem a tensão na falha e aumentam o módulo elástico (WANG, 2006).

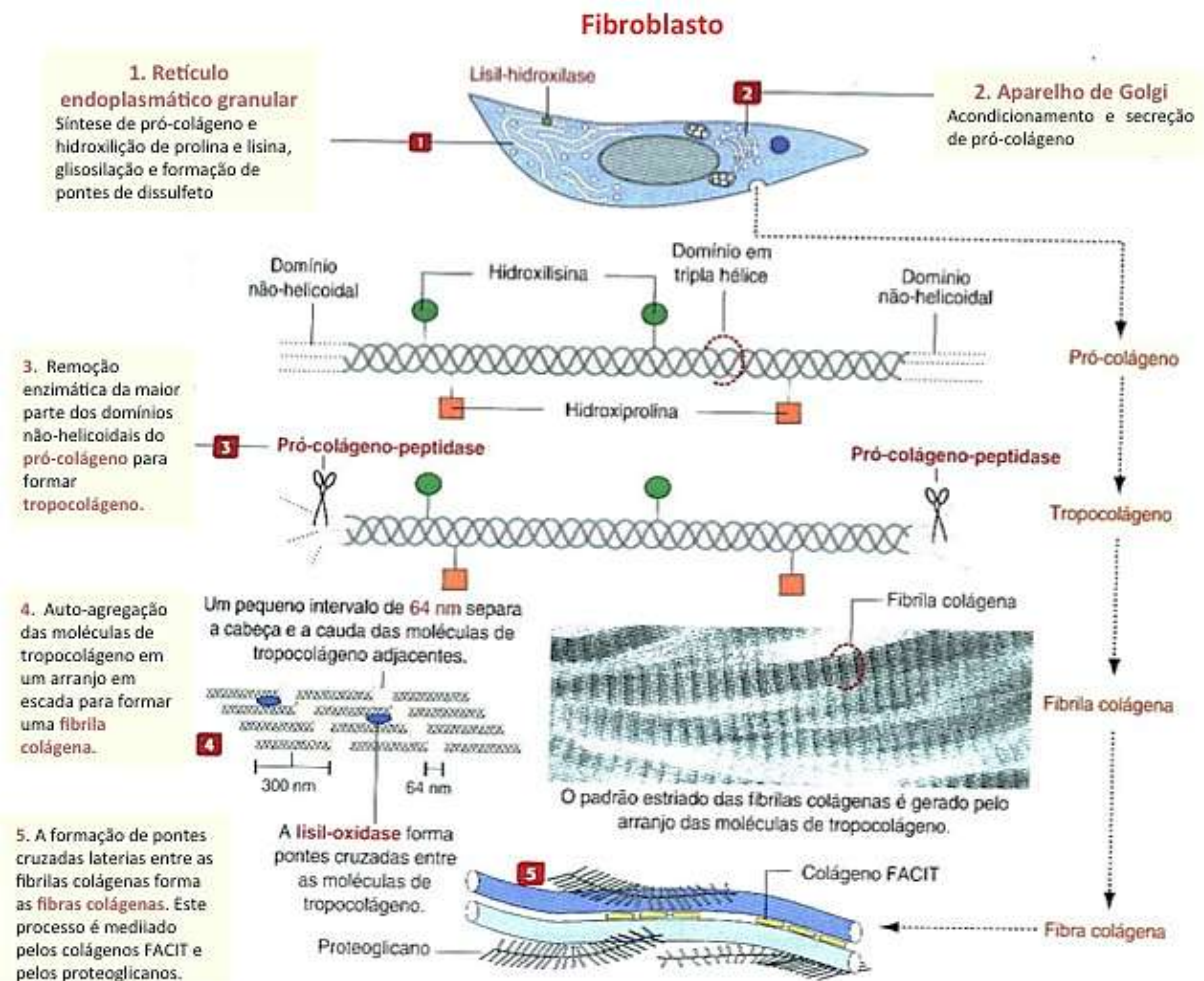


Figura 1. Síntese de colágeno. Imagem adaptada de: Kierszenbaum e Tres (2012), (KIERSZENBAUM e TRES, 2012).

O colágeno está envolvido na formação de redes fibrilares e microfibrilares da matriz extracelular, membranas basais e outras estruturas da matriz extracelular. Este desempenha importantes funções mecânicas no corpo, particularmente em tecidos conjuntivos, onde colágenos fibrilares providenciam a maior parte das propriedades mecânicas essenciais para o funcionamento dos sistemas (GELSE *et al.*, 2003).

Anatomicamente, os tendões normais são brancos, possuem aspecto brilhante e textura fibroelástica, demonstrando, desta forma, grande resistência a cargas mecânicas (KHAN *et al.*, 1999). Segundo Komi (1990), a força produzida pelo TA corresponde a 12.5 vezes o peso do corpo humano (KOMI, 1990).

As fibras colágenas dos tendões são compostas pela união das fibrilas, formando uma forte estrutura (KANNUS, 2000). Estas estão dispostas de maneira a oferecer máxima resistência às forças que atuam sobre o tecido (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), uma vez

que estão organizadas longitudinalmente, transversalmente e horizontalmente, com fibrilas de colágeno longitudinais, formando assim, cordões espirais (GARTNER e HIATT, 2003) (Figura 2).

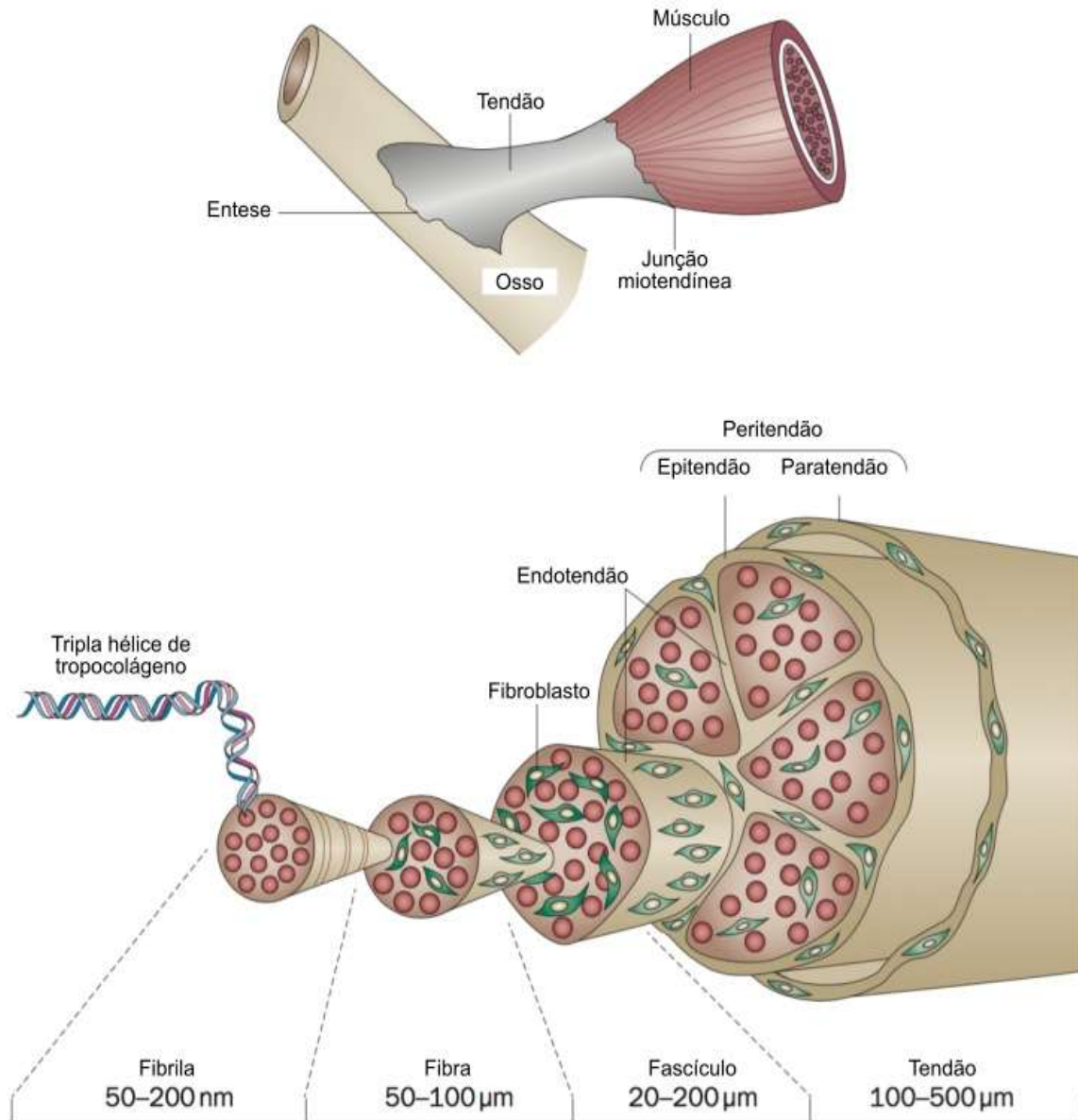


Figura 2. Representação gráfica da organização da estrutura tendínea. Nesta é possível visualizar o tendão conectando-se ao osso e ao músculo, bem como o arranjo de sua estrutura como um todo. Imagem adaptada de Nourissat *et al.* (2015) (NOURISSAT *et al.*, 2015).

Esta estrutura possibilita ao tendão grande capacidade de equilibrar forças longitudinais, transversais, horizontais e rotacionais durante todas as atividades e movimentos (JOZSA e KANNUS, 1997) uma vez que o tendão deve ser capaz de resistir a elevadas forças de tração com limitado alongamento (BEST *et al.*, 1994).

As fibrilas de colágeno são cristalinas e longas, e nos tendões, geralmente são extremamente alinhadas para que haja a integridade estrutural e funcional normal do tecido (BIRK *et al.*, 1997).

O tecido tendíneo é envolto por bainhas de tecido conjuntivo. O endotendão nutre o tendão através de suprimento de sangue e inervação e reveste cada uma das fibras colágenas, promovendo a união das mesmas. O epitendão, reveste o feixe de fibras colágenas, sendo revestidos pelo paratendão (KANNUS, 2000). O epitendão, juntamente com as bainhas externas do paratendão, formam o peritendão (NOURISSAT *et al.*, 2015) (Figura 2).

Os músculos sóleo e gastrocnêmio associados ao TA compõem o compartimento posterior superficial da perna. O paratendão é contínuo com o músculo da fáscia e, distalmente, mistura-se ao perióstio do osso calcâneo (DAYTON, 2017). Anterior ao TA e posterior ao calcâneo, está localizado o tecido adiposo de Kager que é responsável por proteger a vasculatura do tendão (BENJAMIN *et al.*, 2004; THEOBALD *et al.*, 2006).

O tendão plantar está inserido paralelamente ao TA em sua parte medial, inserido no calcâneo ou no TA propriamente (VAN STERKENBURG *et al.*, 2011) e já foi reportado como sendo ausente em pequena proporção de pessoas (JACKSON *et al.*, 2014; KOSE *et al.*, 2014; SPANG *et al.*, 2016). O tendão plantar não possui tanta importância nos humanos como em outros primatas, onde este é usado para agarrar objetos com seus pés (WHITE, 1960).

2.2 TENDÃO: DA LESÃO AO PROCESSO DE REPARO

As propriedades anatômicas e histológicas do TA estão diretamente relacionadas à resistência a danos mecânicos, com subsequentes processos patológicos, e posterior reparo tendíneo (DAYTON, 2017).

O tendão é formado por tecido conjuntivo e é o componente do sistema músculo-esquelético que liga o músculo ao osso (NOURISSAT *et al.*, 2015) e contém propriedades mecânicas específicas para responder e se adaptar a carga transmitida pelos músculos (NOURISSAT *et al.*, 2015).

O TA é considerado o tendão mais forte do corpo humano (O'BRIEN, 2005; DORAL *et al.*, 2010) transmitindo a força do músculo ao osso (FOURE, 2016) e exibindo um comportamento viscoelástico (MAGANARIS *et al.*, 2008).

Desordens no TA são comuns em pessoas ativas mas elas podem ocorrer também em pessoas mais sedentárias. O trauma do TA pode ocorrer durante atividades esportivas ou até mesmo em atividades cotidianas, tensão repetitiva com súbita aceleração e desaceleração, sendo por isso suscetível a ruptura e alterações degenerativas (ASPLUND e BEST, 2013).

Tendinopatia ou tendinose são os termos mais precisos para lesões que ocorrem em tendões, sendo tendinopatia o termo clínico e tendinose a patologia equivalente. Tendinite é um termo comum usado em desordens do TA (ASPLUND e BEST, 2013), contudo, nem todas as rupturas são decorrentes de inflamação, uma vez que o papel da inflamação em tendinopatias ainda não está completamente esclarecida e ainda é amplamente debatida (REES *et al.*, 2014).

Na maioria das vezes, nas tendinopatias do TA, o paciente acometido relata dor, sendo possível encontrar espessamento palpável da porção média do TA cerca de 2-8 cm proximal à inserção no calcâneo (THERMANN *et al.*, 2017).

Mesmo parecendo ser uma ocorrência rara, a ruptura no TA tornou-se o tipo mais comum de lesão relacionada ao esporte, tendo uma incidência anual estimada em 8.3 rupturas a cada 100.000 pessoas (SUCHAK *et al.*, 2005). Conforme Hess (2010), a incidência é de sete lesões por 100.000 indivíduos na população geral e doze por 100.000 entre atletas competitivos (HESS, 2010). Contudo, de acordo com Thermann (2017), há uma incidência de rupturas de 0,2% na população em geral, sendo a incidência muito maior em corredores recreativos (9%) (THERMANN *et al.*, 2017).

De acordo com Lantto (2015), um aumento na incidência de rupturas pode ser observado, onde em 1979 era de 2.1 rupturas a cada 100.000 pessoas e em 2011, 21.5 lesões em cada 100.000 pessoas (LANTTO *et al.*, 2015).

Este tipo de lesão tem sido considerada um crescente problema não só para atletas, mas também para toda a sociedade (KANNUS e NATRI, 1997), sendo que 40.6 anos vem sendo considerada a idade média para o acontecimento de rupturas no TA em homens e 44.5 anos para mulheres (SUCHAK *et al.*, 2005).

A incidência de rupturas no TA cresceu consideravelmente nos últimos 30 anos, principalmente em decorrência do incremento da prática de atividades físicas por parte da população idosa (LANTTO *et al.*, 2015), sendo observado aumento na incidência de rupturas no TA em adultos na faixa de 60 anos de idade (THERMANN *et al.*, 2017).

Patologias tendíneas ocorrem constantemente na medicina ortopédica, onde a ruptura total e transecções acidentais do tendão geralmente requerem a indicação de tratamento cirúrgico (CHAN *et al.*, 2005).

Patologias do TA podem ser agudas ou crônicas (EGGER e BERKOWITZ, 2017). As rupturas agudas no TA ocorrem geralmente na porção medial, 2-6 cm proximal do local de inserção do calcâneo. As rupturas crônicas podem levar à perda funcional devido à retração, com fibrose e atrofia do tendão, alongamento do complexo gastrocnêmio-sóleo e a diminuição da força ao realizar movimento (THERMANN *et al.*, 2017). Entretanto, lesões crônicas do tendão sobrecarregado não são causadas por inflamação – ao contrário, histologicamente demonstram tecido degenerado e desorganizado (MAFFULLI *et al.*, 1998).

Contudo, a decisão entre realização ou não de cirurgia no caso de ruptura de TA é complexa e requer uma análise completa dos riscos e benéficos do procedimento (GROSS e NUNLEY, 2016). A maioria dos pacientes com tendinopatia de Aquiles crônica de médio porte pode ser tratada conservadoramente com bons resultados (THERMANN *et al.*, 2017).

Estudos recentes indicam que bons resultados podem ser alcançados sem cirurgia, especialmente com reabilitação funcional acelerada e realização de movimento prematuro (ASPLUND e BEST, 2013). Além disso, casos de infecção foram reportados sendo quatro vezes mais comuns após o tratamento cirúrgico em comparação com o tratamento não-operatório (LANTTO *et al.*, 2015).

A cirurgia para o tratamento de tendinopatias é recomendada para pacientes que não respondem ao tratamento com medidas conservadoras após seis meses (ASPLUND e BEST, 2013). As abordagens cirúrgicas ideais para o reparo de tendão são realizadas a fim de aproximar as duas extremidades, acelerando assim, a cicatrização (CHAN *et al.*, 2005).

A reparação com sutura é comumente empregada a fim de fornecer resistência mecânica suficiente durante a cura do tendão. Contudo, suturas só fornecem a força mecânica para segurar as extremidades tendíneas, não produzindo a ligação de suas extremidades rompidas em nível molecular (CHAN *et al.*, 2005).

Apesar dos avanços no tratamento da ruptura do TA, como sutura percutânea (TOMAK e FLEMING, 2004; MAJEWSKI *et al.*, 2009) ou tratamentos funcionais, o tempo de recuperação ainda é longo e as taxas de re-ruptura são substanciais (MAJEWSKI *et al.*, 2002).

De acordo com Goffi (1996), existe uma intensa preocupação em relação às lesões tendíneas em cirurgias reconstrutivas, pois quando há uma sutura pode haver a aderência,

impedindo a sua recuperação completa (GOFFI, 1996). Além disso, há uma incidência de 2% da necessidade de remoção de suturas, devido a reação de corpo estranho (THERMANN *et al.*, 2017).

Os tendões lesados, quando restaurados por processos de cicatrização da ferida típicos, incluem a infiltração inflamatória, proliferação celular e alteração dos fenótipos de colágeno (ZHANG *et al.*, 2003).

O suprimento vascular do tendão é significativamente reduzido após ruptura (PEACOCK, 1959; GELBERMAN *et al.*, 1991). Conforme Enwemeka (1989a), o reparo primário do tendão ocorre em aproximadamente 6 semanas, o contrário do que ocorre na maioria dos tecidos moles, que, por sua vez, necessitam de 7 a 10 dias (ENWEMEKA, 1989a).

Segundo Enwemeka (1989a), esse período de tempo é de extrema valia para que o tendão adquira a resistência necessária a fim de transmitir, de maneira eficaz, a força gerada pelo músculo homônimo. Nos tratamentos convencionais de lesões tendíneas, a imobilização do tendão é usualmente realizada por meio de gesso durante essa fase da cicatrização (ENWEMEKA, 1989a).

No entanto, longos períodos de imobilização acarretam em diversas complicações, tais como atrofia muscular, tromboflebite, aderências teno-cutâneas, osteoartrite, alterações tróficas neurais, necrose da pele, osteoporose e re-ruptura, prejudicando a reabilitação motora (ENWEMEKA, 1989b). Além disso, a imobilização reduz a circulação sanguínea e a regeneração nervosa no local da lesão, os quais são processos vitais para que ocorra uma cura eficaz (ARNOLD e WEST, 1991).

Quando o tendão é imobilizado, duas semanas pós-ruptura, pode ser observado uma diminuição da velocidade do processo de cicatrização. Isso é acarretado por uma baixa produção de fatores de crescimento, proteínas, colágenos e, posteriormente, redução das propriedades biomecânicas do tecido (YASUDA *et al.*, 2000; BRING *et al.*, 2007).

Esforços têm sido feitos para acelerar a cicatrização do tendão primário, a fim de diminuir as aderências restritivas e aumentar a força de tração (ZHANG *et al.*, 2003). Portanto, se o tempo de imobilização puder ser reduzido, conseqüentemente há uma diminuição de efeitos deletérios aos indivíduos em função da cicatrização acelerada (ENWEMEKA, 1989).

Em ratos, o tendão intacto é praticamente desprovido de fibras nervosas e vasos sanguíneos, sendo estes presentes na camada de tecido conjuntivo que envolve o tecido tendíneo. Porém, após a lesão, novos vasos sanguíneos e fibras nervosas aparecem no tendão

lesionado, fornecendo fatores de crescimento (FCs) e mediadores neuronais, vitais para o reparo (ACKERMANN *et al.*, 2002; ACKERMANN *et al.*, 2003).

Conforme estudo experimental realizado por Eliasson *et al.* (2009), em ratos, o terceiro dia após a lesão corresponde à fase inflamatória, os dias 8 e 14 são referentes à fase proliferativa e o dia 21 relativo a fase de remodelação, sendo portanto, a inflamação a primeira etapa do processo de cicatrização dos tecidos colágenos (ELIASSON *et al.*, 2009).

A cicatrização do tendão é promovida quando os FCs atuam diretamente nas células alvo presentes no local lesionado. Em modelos animais foi demonstrada a super-expressão de diversos FCs e de seus receptores durante o processo de cicatrização do tecido tendíneo (BOYER *et al.*, 2001; DAHLGREN *et al.*, 2005).

Embora o efeito de FCs na cicatrização do tendão sejam relevantes, tornou-se cada vez mais claro que o reparo do tendão não é acionado por um único fator de crescimento (FC), mas requer a interação de vários fatores. Coletivamente eles exercem efeitos poderosos e abrangentes sobre a cicatrização (MAJEWSKI *et al.*, 2009).

Após a lesão, as plaquetas liberam as proteínas bioativas e os FCs necessários para o início e ativação da cascata de coagulação, acelerando assim o processo de reparo. As plaquetas podem ser ativadas por um grande número de moléculas bioativas, sendo a trombina o mais potente ativador. A trombina também é fundamental na formação do coágulo de sangue após uma lesão tecidual (VIRCHENKO *et al.*, 2006). Além disso, esta possui muitas propriedades biológicas em comum com os FCs, tais como quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e macrófagos (CHEN e BUCHANAN, 1975) e estimulação da proliferação de fibroblastos (BAR-SHAVIT *et al.*, 1983; STIERNBERG *et al.*, 2000). A trombina é uma serina protease, sendo responsável pela transformação do fibrinogênio em fibrina (VIRCHENKO *et al.*, 2006).

Uma das funções fisiológicas das plaquetas é o seu papel como “veículo” para o transporte local de FCs na cicatrização das feridas (ANITUA *et al.*, 2004). Em locais de lesão vascular, as plaquetas aderem-se e agregam-se, havendo liberação de trombina, o que desencadeia a produção de uma matriz de fibrina do fibrinogênio (SANCHEZ *et al.*, 2007).

Estudos experimentais têm demonstrado que a inflamação provoca ferimentos e liberação de diversos FCs, onde se incluem os três isômeros de FC derivado de plaquetas (PDGF AA, BB e AB), o FC transformador β (TGF- β 1 e β 2), o FC do endotélio vascular (VEGF) e o FC epitelial (EGF) (MARX, 2001).

O FC vascular endotelial (VEGF) é um estimulador endógeno da angiogênese e auxilia no aumento da permeabilidade vascular (FLAMME *et al.*, 1995; HIPPENSTIEL *et al.*, 1998). Já o fator de crescimento diferenciado (GDF-5), um membro da superfamília do FC transformador (TGF), foi mostrado atuar na aceleração da cicatrização do tendão em vários modelos animais (ASPENBERG e FORSLUND, 1999; RICKERT *et al.*, 2001; FORSLUND *et al.*, 2003).

O FC derivado das plaquetas (PDGF) é responsável por induzir a neovascularização e quimiotaxia de fibroblastos, estimulando assim a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (ABRAHAMSSON e LOHMANDER, 1996; MARUI *et al.*, 1997; CHANG *et al.*, 1998; EVANS, 1999; ZHANG *et al.*, 2003).

O PDGF é um potente ativador de células de origem mesenquimal. Este possui duas cadeias diferentes, A e B, codificadas por diferentes genes, levando a 3 isoformas distintas: os homodímeros AA e BB e o heterodímero AB. Tratando-se de expressão gênica heteróloga, o heterodímero AB é o único dos três isômeros que tem as mais altas exigências em relação aos protocolos de expressão e purificação (MEYER-INGOLD e EICHNER, 1995).

Em suma, os estágios que visam alcançar o reparo tecidual após uma dano ocorrem na seguinte sequência: agregação, ativação plaquetária e subsequente degranulação; atividade inflamatória; deposição de matriz; síntese de colágeno; contração do local lesado; epitelização; e remodelamento (EVERTS, KNAPE, *et al.*, 2006) (Figura 3).

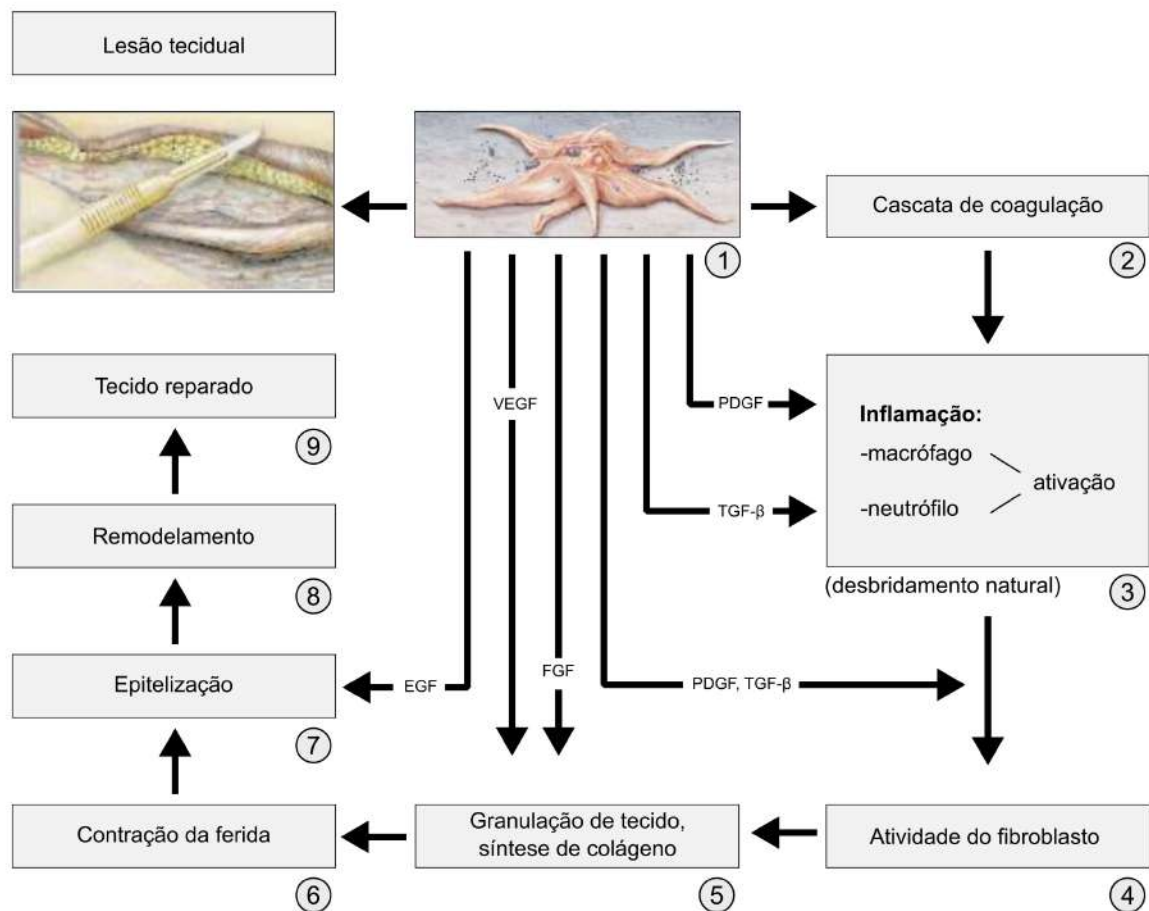


Figura 3. Ilustração esquemática do papel dos fatores de crescimento durante os estágios de cicatrização. Imagem adaptada de Everts *et al.* (2006). Os números referem-se a ordem de acontecimentos. PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas. TGF- β – Fator de crescimento transformador; FGF – Fator de crescimento de fibroblasto; EGF – Fator de crescimento epitelial (EVERTS *et al.*, 2006)

Atualmente, o grande impedimento para o sucesso da cicatrização é a complexidade biológica. O aprimoramento do processo de reparo usando FC, pode auxiliar na regeneração de um tecido funcional, ao contrário do tecido apenas cicatricial (DINES *et al.*, 2007). Portanto, estratégias que visam aumentar a resistência mecânica do tendão rompido após reparação incluem geralmente a suplementação exógena de FC (CHAN *et al.*, 2005).

De acordo com Aspenberg e Virchenko (2004), as injeções de concentrado de plaquetas, os quais contêm uma rica mistura de fatores de crescimento, dentro do hematoma do TA lesionado, aumentaram a resistência e rigidez do tendão no rato. Porém, não foi observado uma melhoria evidente quando os fatores de crescimento TGF- β 1 ou FGF foram injetados individualmente (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004).

Conforme Sanchez *et al.* (2007), o suprimento de sangue em tendões é insuficiente e a renovação celular limitada. Além disso, a lesão no TA cura lentamente, exigindo na maioria

das vezes tratamento constante para que o mesmo obtenha uma completa recuperação funcional. Sua cicatrização é um processo complexo que envolve diversas etapas, incluindo a angiogênese, a proliferação celular, e a deposição de matriz extracelular. Essas etapas são seguidas pela remodelação e maturação, durante a qual o tendão finalmente deve recuperar sua resistência mecânica (SANCHEZ *et al.*, 2007). Um esquema de reparo tendíneo pode ser visualizado na figura 4.

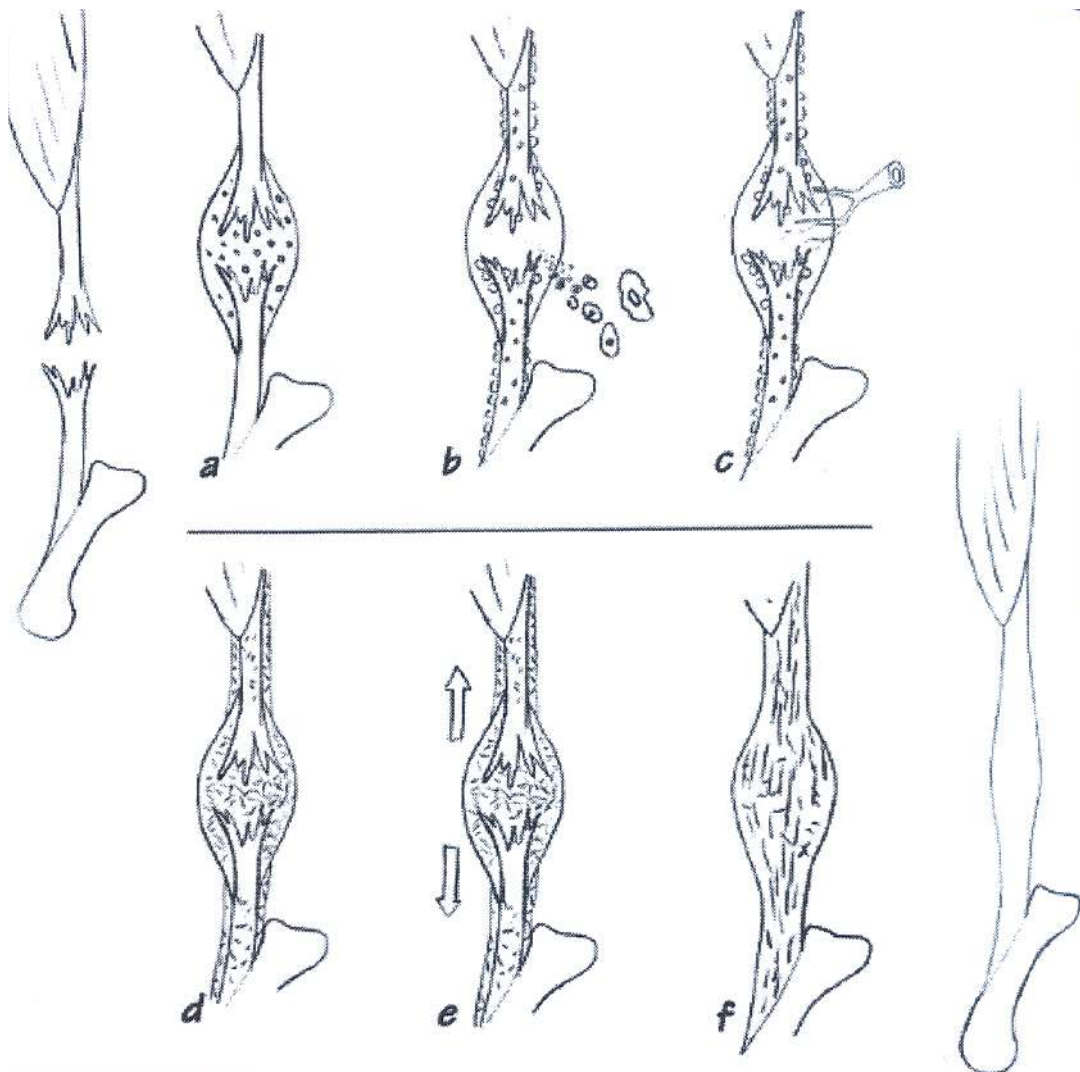


Figura 4. Esquema de reparo tendíneo. Imagem extraída de Virchenko, 2007 (VIRCHENKO, 2007), desenhada por Per Aspenberg. Notem em a – formação de hematoma e consequente ativação plaquetária; b – proliferação do paratendão e invasão celular; c – crescimento vascular e neuronal (Angiogênese); d – formação de calo tendíneo; e – estimulação mecânica; f – maturação e remodelamento.

Conforme Zhang *et al.* (2003), a ativação angiogênica das células endoteliais podem desempenhar um papel importante na promoção e na regulação de outros eventos biológicos importantes para o processo de cicatrização do tendão (ZHANG *et al.*, 2003).

Contudo, esta situação pode ser aperfeiçoada através da utilização da engenharia de tecidos, acelerando assim o processo de reparação do mesmo (SCUTT *et al.*, 2008), atribuindo-se as plaquetas uma linha promissora, já que estas possuem um papel fundamental na homeostasia e são consideradas uma fonte natural de FC (SUNITHA e MUNIRATHNAM, 2008).

Em condições de cura deficientes sem hemorragia, tais como tendinopatias, as injeções de plasma rico em plaquetas (PRP) tornaram-se uma alternativa popular de tratamento (ANDIA *et al.*, 2010).

Os concentrados plaquetários podem melhorar a cicatrização tendínea em ratos. Este efeito pode ser observado quando injetado localmente, 6 horas após a transecção do tendão e bem como após a implantação de um coágulo PRP durante a cirurgia (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004; VIRCHENKO e ASPENBERG, 2006; VIRCHENKO *et al.*, 2006). Foi observado ainda que o efeito estimulatório desaparece quando o membro é descarregado mecanicamente e que esse efeito aumenta quando os ratos são estimulados a aumentar a sua atividade física (VIRCHENKO e ASPENBERG, 2006).

Uma série de experimentos vem demonstrando que a carga mecânica aumenta fortemente a resistência do tendão (ELIASSON *et al.*, 2012a; b; ELIASSON *et al.*, 2013; HAMMERMAN *et al.*, 2014). Foi verificado ainda que um episódio único de carga mecânica, suficiente para melhorar a resistência mecânica do tendão, também ativa genes, relacionados principalmente a inflamação (ELIASSON *et al.*, 2012b), sendo o efeito estimulatório do carregamento mecânico evidente em um ponto de tempo precoce, quando o calo tendíneo é constituído basicamente por leucócitos (BLOMGRAN *et al.*, 2016). Uma outra indicação de que a inflamação desempenha um papel crucial neste processo foi reportado por Hammerman *et al.* (2014), onde micro-danos causados por agulhamento poderiam vir a substituir a carga mecânica, levando a um aumento semelhante na força mecânica (HAMMERMAN *et al.*, 2014).

Células do sistema imunológico, são muito importantes no reparo de tecidos. Além de contribuir na defesa de hospedeiros e na inflamação, as células imunes são reguladoras do

processo cicatricial, atuando através da secreção de citocinas, linfocinas e fatores de crescimento (PARK e BARBUL, 2004).

Os principais intervenientes de respostas imunes celulares adaptativas são os linfócitos T, em geral, e para a função efetora, linfócitos T citotóxicos, em particular (ANDERSEN *et al.*, 2006).

CD45 é uma das mais abundantes glicoproteínas expressadas nas células imunes, sendo estimado que esta ocupa 10% da área de superfície celular de linfócitos B e T. Das oito isoformas expressas, 5 delas são expressadas nos linfócitos T (PATHAK e PALAN, 2005).

As células T CD8⁺ são geralmente linfócitos T citotóxicos respondendo a um desafio antígeno através da lise de células alvo, enquanto células T helper CD4⁺ são células que produzem linfocinas e desempenham um papel na ativação e ou proliferação de células B, linfócitos T citotóxicos e macrófagos. As células T precursoras entrando no timo inicialmente não expressam CD4, CD8 ou CD3 em sua superfície (FUNG-LEUNG *et al.*, 1991).

A cicatrização de fraturas ósseas em camundongos é dependente do ambiente bacteriológico dos departamentos de criação destes animais. A cicatrização da fratura é prejudicada se o sistema imunológico amadureceu como uma consequência de desafios bacterianos, aumentando especialmente os níveis de células T CD8⁺ (REINKE *et al.*, 2013). Além disso, a inibição da formação óssea em camundongos pode ser observada também por Liu (2011), através da infusão de células T CD4⁺, provavelmente devido a citocinas produzidas por esta célula (LIU *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrado que microbiota ou a combinação de hospedeiros e de genomas microbianos influencia muitos órgãos em animais de laboratório, e que isto é dependente de fatores como o ambiente bacteriano, dieta, temperatura e condições de criação dos animais (STAPPENBECK e VIRGIN, 2016).

Animais de laboratório criados em condições sem a presença de agentes patogênicos tem um estado imune que é completamente irrelevante para os seres humanos adultos, uma vez que estes são expostos a um grande número de infecções (BEURA *et al.*, 2016).

De acordo com Stappenbeck e Virgin (2016), é reivindicado que importantes resultados experimentais em condições de instalações de animais modernas, devem ser confirmados em animais com sistema imunológico microbiologicamente mais experiente, antes de quaisquer inferências sobre os seres humanos serem planejadas (STAPPENBECK e VIRGIN, 2016).

2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS - PRP

O sangue é um fluido viscoso, levemente alcalino, composto por eritrócitos, leucócitos e plaquetas em suspensão em um conteúdo fluido, o plasma (GARTNER e HIATT, 2003).

O plasma compreende aproximadamente 55% do volume de sangue total, sendo constituído pelos líquidos sanguíneos que contém além de eletrólitos e íons, moléculas protéicas, tais como albumina, globulinas e fibrinogênio. Os compostos orgânicos como lipídios, vitaminas, hormônios, aminoácidos e cofatores também estão presentes no plasma que, no processo de coagulação, integram-se ao coágulo (GARTNER e HIATT, 2007).

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares arredondados, derivadas dos megacariócitos da medula óssea, com vida útil variando de 7 a 10 dias (EVERTS, BROWN MAHONEY, *et al.*, 2006). No seu interior encontram-se depósitos de glicogênio, peroxissomos e três tipos de grânulos: alfa (α), delta (δ) e lambda (γ) (GARTNER e HIATT, 2007).

Em estudos *in vitro*, a forma mais comum de ativação das plaquetas é realizada através da adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) à trombina. A trombina ativa diretamente as plaquetas e o CaCl_2 atua antagonizando o efeito do anticoagulante presente na amostra (EPPLEY *et al.*, 2006). Uma vez ativadas, as plaquetas passam pelo processo de agregação, liberando FCs e proteínas bioativas necessários para o início e aceleração do reparo e regeneração após a lesão (EVERTS, BROWN MAHONEY, *et al.*, 2006; VIRCHENKO *et al.*, 2006).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um volume de plasma com alta concentração plaquetária (MARX, 2001). Partindo-se do princípio que o sangue normal possui entre $150.000 \pm 350.000 \mu\text{l}$ e em média 200.000 plaquetas por microlitro, a eficácia clínica do PRP pode ser esperada em um aumento de 3 a 5 vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos normais (MARX *et al.*, 1998; GONSHOR, 2002; KEVY e JACOBSON, 2004; MARX, 2004; EVERTS, KNAPE, *et al.*, 2006; MAZZOCCA *et al.*, 2012).

O PRP é extraído do sangue total e é conhecido por possuir diferentes tipos de FCs em altas concentrações (SLATER *et al.*, 1995; LANDESBURG *et al.*, 2000), sendo considerado uma fonte natural de FC, de fácil aquisição e de baixo custo (MAIA *et al.*, 2009). Uma vez

desenvolvido o PRP ele permanece estável e estéril no estado anticoagulado por um período de 8 horas (MARX, 2001).

A porção referida como PRP contém, além da alta concentração plaquetária e de leucócitos, pequena quantidade de plasma e de eritrócitos (MARX *et al.*, 1998). Contudo, o PRP desempenha um importante papel na reparação tecidual devido à sua ação mitogênica, quimiotóxica e neovascular (MAIA *et al.*, 2009).

O PRP por sua vez pode ser classificado de acordo com 3 componentes básicos: número de plaquetas; forma de ativação; presença ou não de leucócitos, sendo nomeado em: PRP rico em leucócitos (L-PRP) e PRP com baixa concentração de leucócitos (PRP, PRP padrão) (DELONG *et al.*, 2012; DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2014).

De acordo com Boswell *et al.* (2014), a preparação ideal de PRP deve respeitar a concentração de plaquetas e a inclusão e exclusão de leucócitos (BOSWELL *et al.*, 2014), uma vez que leucócitos liberam citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, que podem ter um efeito prejudicial nos tecidos injuriados (WROTONIAK *et al.*, 2007). A presença destas citocinas não depende somente da concentração dos leucócitos, uma vez que estas diferem qualitativa e quantitativamente de acordo com a forma de centrifugação (velocidade/tempo) e a maneira individual de preparação do concentrado plaquetário (OH *et al.*, 2015).

Efeitos do L-PRP diferem do PRP sem leucócitos em estudos *in vitro*, pois L-PRP induz alta expressão de colágeno tipo III e ao mesmo tempo baixa expressão de colágeno tipo I quando comparado ao PRP sem leucócitos (ZHOU *et al.*, 2015). Já, células tronco de tendão demonstraram crescimento superior quando tratadas com PRP com baixa concentração de leucócitos, comparado com solução salina e L-PRP. Por outro lado, L-PRP inibe a proliferação de células tronco tendíneas (ZHANG *et al.*, 2016).

Dentre os FC inseridos no PRP, podem-se citar: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB); fator de crescimento transformador beta (TGF β e TGF β_2); fator de crescimento vascular endotelial (VEGF); fator de crescimento epitelial (EGF) (MARX, 2001), estando o TGF β e PDGF em altas concentrações (EPPLEY *et al.*, 2004).

As citocinas desempenham um papel importante no início da cicatrização (RODEO, 2007), e são compreendidas em: (1) Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF β) – considerando TGF β -1 como sua isoforma mais abundante; (2) Fator de Crescimento derivado

de Plaquetas (PDGF); (3) Fator de Crescimento Insulino-Dependente (IGFs) I e II. Estes são reguladores responsáveis respectivamente por (1) induzir a cicatrização fibrosa, (2) regular a migração, proliferação e sobrevivência da linhagem de células mesenquimatosas, e (3) pela proliferação e diferenciação da maioria das células, além de regulação do mecanismo de apoptose (DOHAN *et al.*, 2006). Estudo *in vitro* tem demonstrado que os FCs anabólicos, como PDGF-BB e TGF β 1 aumentam com a maior concentração de plaquetas em 0 e 96 horas após o tratamento com PRP (BOSWELL *et al.*, 2014).

O PRP é uma estratégia muito explorada na prática clínica com o objetivo de providenciar estímulo regenerativo para a cicatrização tendínea (FILARDO *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm demonstrado a efetividade do PRP no reparo e regeneração de diversos tecidos, como osso (HOKUGO *et al.*, 2005; KAWASUMI *et al.*, 2008), cartilagem (AKEDA *et al.*, 2006), tendão (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004; EPPLEY *et al.*, 2004; VIRCHENKO *et al.*, 2006) e ligamentos (MURRAY *et al.*, 2007; SPINDLER *et al.*, 2009).

Porém, alguns estudos recentes explanam que o PRP, apesar de todas as suas propriedades não demonstra superioridade clínica no reparo ou regeneração de alguns tecidos, como tendão (DE JONGE *et al.*, 2011; DE VOS *et al.*, 2011; SCHEPULL *et al.*, 2011; SEN *et al.*, 2016) e nervo (PISKIN *et al.*, 2009).

As inconsistências em testes clínicos e laboratoriais atualmente são atribuídos à carência de padronização nos protocolos de preparação do PRP (OH *et al.*, 2015).

2.4 PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS

As propriedades mecânicas do tendão são únicas e o tendão torna-se plasticamente deformado e mais rígido à medida que são aplicadas cargas rápidas e fortes (KOMI, 1990).

O teste biomecânico é utilizado por providenciar medidas validadas como resultados (ROSENBAUM *et al.*, 2010), sendo que os parâmetros utilizados para mensurar as propriedades mecânicas dos tendões são força, rigidez, tensão, módulo elástico e absorção de energia (MAGANARIS *et al.*, 2008).

Para que o reparo do tendão ideal seja realizado, requer-se concomitantemente elevada expressão de colágeno tipo I (MAJEWSKI *et al.*, 2009), sendo que o *cross-link* do colágeno aumenta o módulo elástico e reduz a tensão na falha (THOMPSON e CZERNUSZKA, 1995).

De acordo com Eliasson (2011), a rigidez descreve a relação entre a força a deformação do tendão. A força descreve a deformação do tendão que é dependente do comprimento do mesmo. As propriedades qualitativas do tendão são verificadas a partir do estresse (é compreendido pela força do tendão, dividida pela sua área transversal), o módulo elástico e absorção de energia que descreve o quanto de energia o tendão é capaz de armazenar e esta é calculada pela área sob a curva de força-distensão (ELIASSON, 2011), conforme figura 5.

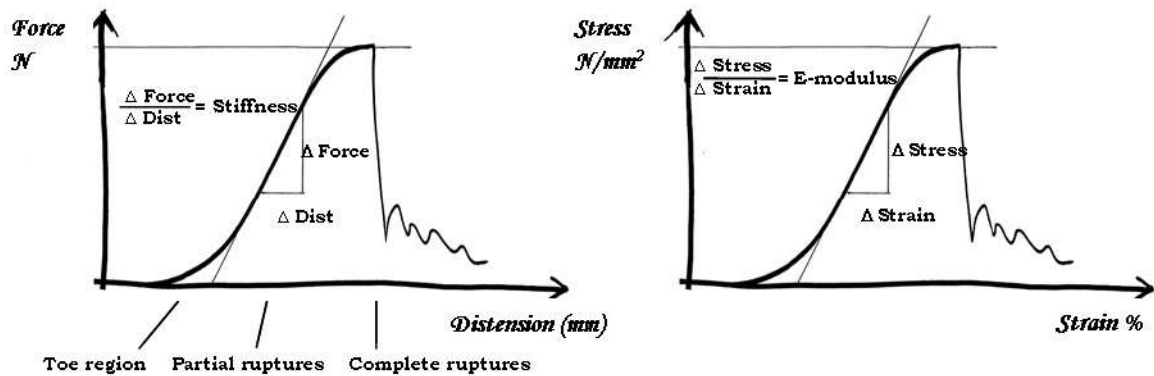


Figura 5. Gráfico de propriedades biomecânicas. Na esquerda, note a força-distensão da curva. Na direita a curva de estresse e tensão. Nestas curvas é possível observar as propriedades mecânicas do tendão (força e rigidez) e propriedades do material tendíneo (stress e módulo elástico). Force: força; Dist: distensão; Stiffness: rigidez; Stress: estresse; Strain: tensão; E-modulus: módulo elástico; Toe region: região de ponta ou pé; Partial ruptures: ruptura parcial; Complete rupture: ruptura completa; mm: milímetros; %: porcentagem; N: Newton; / : dividido; = : igual. Imagem extraída de Eliasson (2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do uso de plasma rico em plaquetas (PRP) no reparo do tendão de Aquiles de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resistência do tendão de Aquiles através de sua força de ruptura, após o tratamento com PRP.
 - Repetir o experimento realizado por Aspenberg e Virchenko (2004).
 - Quantificar o fator de crescimento PDGF presente no concentrado de plaquetas anteriormente a sua utilização como tratamento.
 - Verificar a influência de diferentes concentrações de plaquetas e leucócitos na cicatrização tendínea.
 - Investigar se o efeito do PRP é dependente do *status* bacteriológico do animal.
-
-

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Estudo experimental realizado sob os paradigmas qualitativo e quantitativo, em uma abordagem relacional controlada, comparada e cegada na avaliação dos resultados.

4.2 APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (anexo 2), pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA PUCRS of. 103/2014) (anexo 3) e posteriormente aprovado no exame de qualificação de tese de doutorado (anexo 4).

Além disso, os procedimentos realizados neste trabalho foram previamente aprovados pelo comitê de ética em cuidados animais da Universidade de Linköping na Suécia (LIU, decisão 15-15 e 592) (anexo 5), e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal de acordo com as diretrizes institucionais.

4.3 ACONDICIONAMENTO ANIMAL

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas acrílicas (900cm²) (Figura 6B), contendo não mais que três animais em cada, dispostas em raques ventiladas (Figura 6A), com controle de umidade (55±10%) e temperatura (22±2°C), respeitando o ciclo claro e escuro (controle de luz 12/12 horas). Os animais receberam água e ração padronizada *ad libitum*, e todas as caixas foram enriquecidas com o mesmo material tanto no pré como no pós-cirúrgico: papel picado, estacas de madeira e esconderijos de papel (Figura 6C).

Metodologia

A higienização das caixas, manutenção da alimentação e troca de água foi realizada de acordo com a legislação vigente e por profissionais habilitados, uma vez por semana.



Figura 6. Acondicionamento animal. Note em A – caixas acrílicas dispostas nos racks ventilados; B - caixa padrão com tampa fechada utilizada para manter os ratos durante a realização do experimento. Nesta é possível verificar os espaços onde foram inseridos os bebedouros (localizadas na parte frontal da tampa da caixa, um ao lado direito e outro no lado esquerdo) bem como a ração peletizada (na estrutura de metal aérea localizada aos fundos, no interior da caixa); C - caixa aberta, onde é possível observar o enriquecimento utilizado em cada uma das caixas dos animais.

4.4 PROCEDÊNCIA ANIMAL

Para a concretização deste trabalho, foram utilizados 242 ratos heterogênicos da espécie *Rattus norvegicus*, sendo destes 236 fêmeas adultas, pertencentes à linhagem Sprague-Dawley e 6 machos adultos, pertencentes a linhagem Wistar.

Estes animais foram provenientes de Janvier Labs - *Rodent research models & Associated services* (Le Genest-Saint-Isle, França). Para realização de alguns experimentos, de acordo com a necessidade específica de cada, os ratos foram oriundos de instalações de reprodução distintas (Instalação titulada 8D ou UP1).

Os ratos SOPF, do inglês, *specific-opportunist-pathogen-free*, ratos livres de patógenos específicos oportunos, foram provenientes da instalação nomeada 8D. Previamente a realização do procedimento cirúrgico, estes animais foram testados a fim de confirmar que estavam realmente livres de contaminação por *Staphylococcus aureus*. Já os ratos SPF, do inglês, *specific-pathogen-free*, ratos livres de patógenos específicos, foram provenientes da instalação nomeada UP1. Todos os animais reproduzidos nesta instalação UP1, eram contaminados com *Staphylococcus aureus*. O estado de saúde destes animais pode ser encontrado no anexo 6 e 7.

4.5 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo amostral, para cada um dos experimentos, foi realizado através do Software Estatístico Minitab 16, com padrões de alpha (< 0.05), desvio padrão, diferença máxima e de poder estabelecidos conforme literatura (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004) e sensibilidade da hipótese de cada experimento.

4.6 GRUPOS DE EXPERIMENTAÇÃO

De um total de 242 animais, 181 foram utilizados para realizar o procedimento de transeção tendínea e 49 foram utilizados como doadores de sangue, a fim de obter os derivados de plaquetas. Estes foram randomicamente distribuídos em 6 experimentos. Os demais animais (n=12) foram utilizados para a realização de citometria de fluxo, conforme figura 7. A avaliação do reparo tendíneo foi realizado em diferentes tempos de avaliação, 11 (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004) ou 14 (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004; VIRCHENKO e ASPENBERG, 2006; VIRCHENKO *et al.*, 2006) dias pós-cirúrgico, sendo o dia da cirurgia considerado o dia zero.

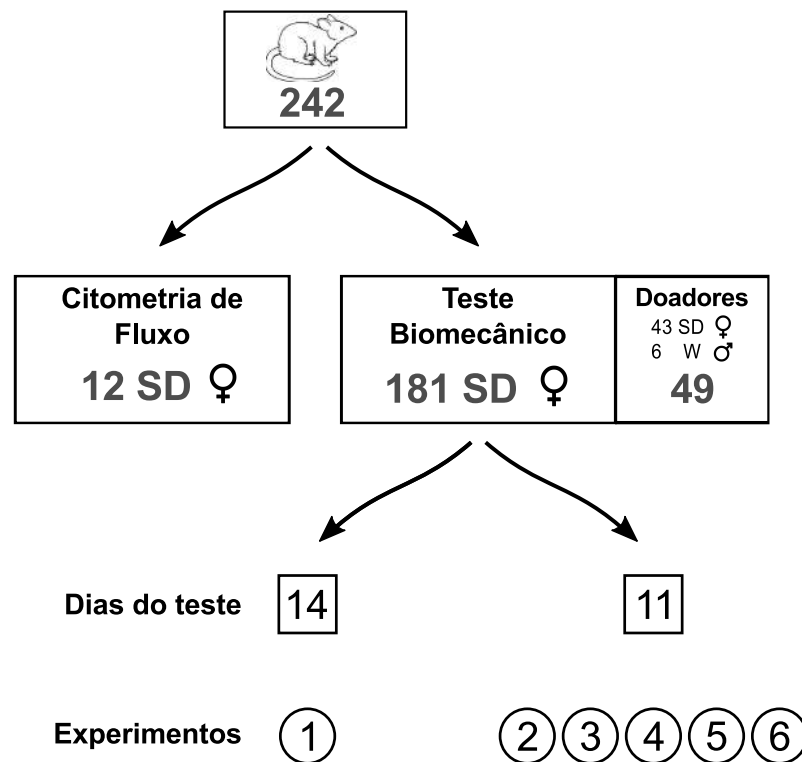


Figura 7. Visão geral do trabalho de pesquisa. De um total de 242 ratos, 12 foram utilizados para a realização de citometria de fluxo. Os demais 230 animais, foram randomicamente distribuídos em 6 experimentos. Destes, 181 foram utilizados para avaliação mecânica e 49 animais utilizados como doadores de sangue. A avaliação do reparo tendíneo foi realizada em 11 ou 14 dias pós-cirúrgico. SD - Sprague Dawley; W - Wistar; ♂ - ratos machos; ♀ - ratos fêmeas.

Em todos os experimentos, os animais foram randomicamente distribuídos nos grupos experimentais, conforme tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de animais utilizados em cada um dos 6 experimentos realizados. Exp: experimento; n: número de animais utilizados; PRP: plasma rico em plaquetas.

Exp.	1	2	3	4	5	6
Doadores (n)	6	5	5	10	10	13
PRP (n)	13	12	10	20	20	25
Salina (n)	14	12	10	10	10	25
Total (n)	33	29	25	40	40	63

Posteriormente à transecção do tendão, o tecido tendíneo reparado foi examinado em diferentes tempos de avaliação e os tratamentos foram injetados em todos os animais seis horas

após o procedimento cirúrgico (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004; VIRCHENKO e ASPENBERG, 2006; VIRCHENKO *et al.*, 2006). Todas as cirurgias, preparação do PRP e injeções foram realizadas pela pesquisadora principal, a fim de evitar qualquer tipo de viés.

4.7 PROCEDIMENTO E TRATAMENTO OPERATÓRIO PADRÃO

4.7.1 Anestesia, analgesia e antibioticoprofilaxia

A anestesia geral foi realizada em todos os animais utilizados através do uso de gás isoflurano (Forene®, Abbot Scandinavia, Solna, Suécia). O antibiótico oxitetraciclina foi ministrado uma única vez no período pré-operatório (25 mg/Kg, Engemycin®; Intervet, Boxmeer, Holanda). A analgesia foi ministrada através de injeções subcutâneas de buprenorfina no período pré e pós-operatório (0.045 mg/Kg, Temgesic®; Schering-Plough, Brussels, Bélgica), de 12 em 12 horas.

4.7.2 Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de microcirurgia do grupo de Ortopedia, estabelecida no Centro de Recursos Biomédicos (CBR) da Universidade/Hospital de Linköping, Suécia.

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais receberam analgésico e foram anestesiados conforme supracitado. Após a anestesia, os ratos foram pesados e identificados. A fim de evitar lesões na córnea, foi aplicado creme ocular em todos os animais. Injeção de antibiótico padrão foi realizada subcutaneamente na região dorsal do rato, seguido por tricotomia com tosquiadeira na região cirúrgica da pata direita. Posteriormente, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica, em decúbito ventral, sob anestesia geral.

A cirurgia foi realizada sob condições assépticas. A pele da perna direita dos ratos foi limpa com clorexidina alcoólica. O complexo tendíneo foi exposto através de uma incisão transversal na pele, lateral ao TA. O tendão plantar foi removido e o TA foi seccionado

Metodologia

transversalmente na porção medial. A pele foi reestabelecida através de sutura (dois pontos) utilizando-se fio Nylon 4-0 (Dafilon Blue Braun, Sidney Austrália) (Figuras 8 e 9).

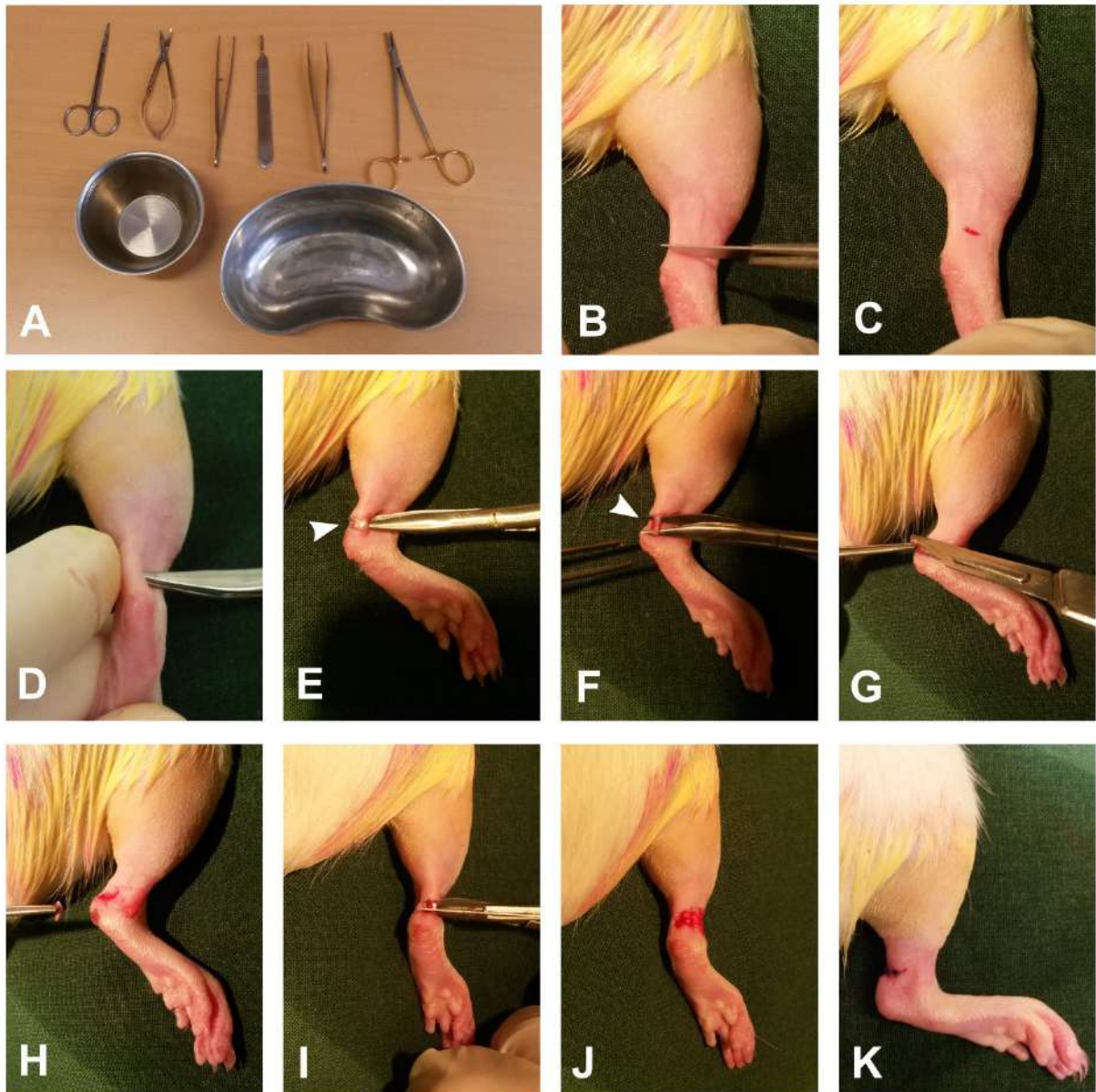


Figura 8. Procedimento cirúrgico. Note em: A - materiais utilizados para realização de cirurgia; B e C - incisão transversal cutânea; D - posicionamento da perna direita do animal durante a realização de procedimento cirúrgico; E - complexo tendíneo exposto (seta branca), (F) com diérese do tendão plantar (seta branca), (G e H) e posterior retirada do mesmo; I - tendão de Aquiles exposto, seguido por secção transversal na porção medial; J - procedimento cirúrgico completo; K - sutura percutânea.

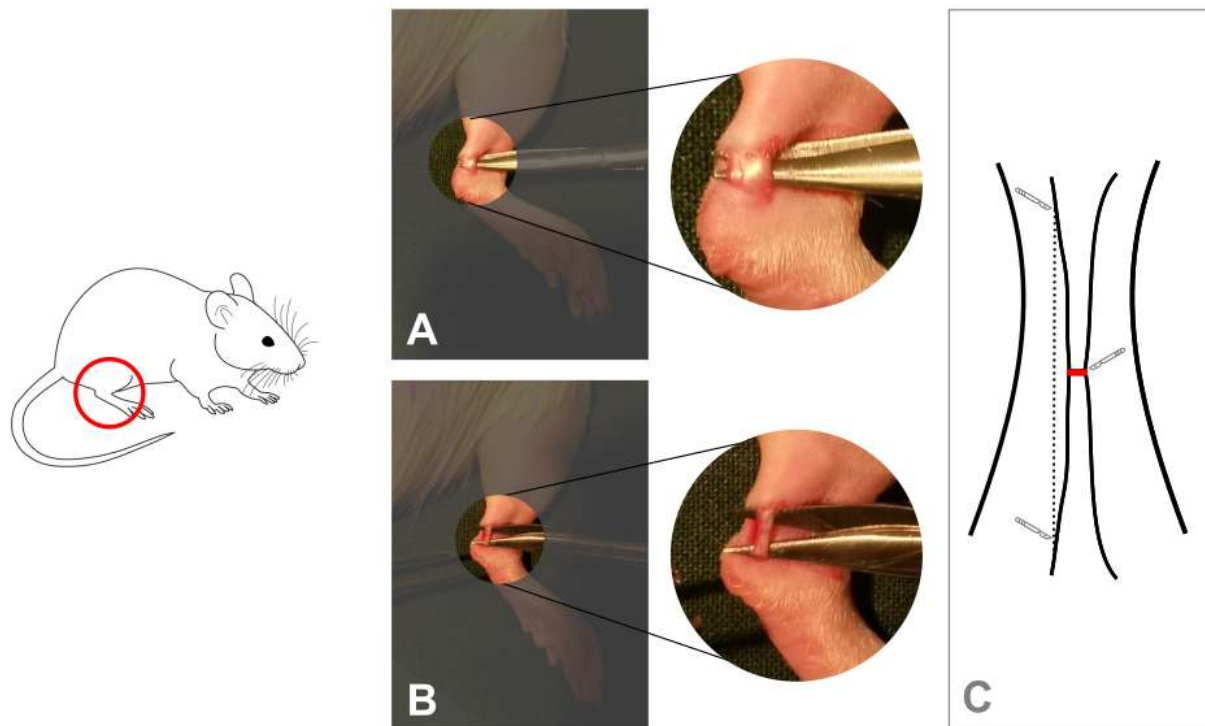


Figura 9. Esquema ampliado de modelo de ruptura padrão realizado no tendão de Aquiles direito dos ratos. Em A é possível verificar o complexo tendíneo exposto. Note a anatomia do tendão de Aquiles juntamente com o tendão plantar (lado esquerdo da imagem). Já em B, é possível verificar a porção do tendão plantar que foi removida anteriormente a realização de secção do tendão de Aquiles. Em C – imagem ilustrativa do procedimento cirúrgico padrão realizado. Em vermelho, corte transversal no tendão de Aquiles, realizado com auxílio de bisturi. Na esquerda, pontilhado, tendão plantar removido no ato cirúrgico em todos os experimentos.

Uma vez finalizado o procedimento cirúrgico, PRP (50 μ L) ou solução salina (50 μ L) foram injetados de forma percutânea na área do defeito tendíneo, seis horas após a cirurgia, utilizando-se uma seringa acoplada em uma agulha 0.25mm.

4.8 PREPARAÇÃO PADRÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

A fim de otimizar a utilização da amostra de sangue de cada animal doador, foi estabelecido que a cada dia de cirurgia fossem operados o número máximo de animais para a quantidade de sangue doador disponível.

No total, 49 ratos Sprague-Dawley fêmeas foram utilizados como doadores, sendo normalmente contabilizado que para cada doador utilizado haviam de 2 a 3 ratos receptores. Após a realização adequada de anestesia geral via inalatória, utilizando-se uma seringa de

Metodologia

10mL contendo citrato de sódio (0.13mol/L) e uma agulha de 1.2mm, foi coletado o sangue do animal doador, através de punção cardíaca. Devido a natureza desse procedimento, os animais foram eutanasiados através da técnica de exsanguinação.

O sangue puncionado foi inserido imediatamente em tubos Falcon. Posteriormente o sangue de todos os doadores foi transferido para um único tubo Falcon, sendo assim misturados (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004). Desta forma, cada receptor obteve exatamente os mesmos componentes sanguíneos dos doadores.

A primeira centrifugação foi realizada a 220x g por 20 minutos (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004), onde o sangue, de acordo com o gradiente de densidade, dividiu-se em três camadas: 1- plasma pobre em plaquetas (PPP); 2- zona de névoa (onde as plaquetas e leucócitos estão localizadas); e 3- hemácias.

O sobrenadante, juntamente com a zona de névoa e pequena quantidade de hemácias foi transferido para outro tubo Falcon, com auxílio de pipeta. Neste momento, evitou-se ao máximo a coleta de eritrócitos. Esse tubo foi imediatamente submetido a uma segunda centrifugação a 480x g por 20 minutos (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004)

A grande quantidade de plasma pobre em plaquetas, resultante do processo de centrifugação, foi aspirado e realocado em um novo tubo Falcon (aproximadamente 2/3 do total que o tubo contém) a fim de realizar a diluição plaquetária posteriormente. Desta forma, obteve-se somente as plaquetas em sua alta concentração – o PRP (Figura 10).



Figura 10. Fração resultante da segunda centrifugação. Neste momento parte do plasma foi coletado e salvo a fim de utilizá-lo posteriormente na diluição das plaquetas. Na porção inferior do tudo, nota-se pequena quantidade de hemácias que foram, em sua maioria, cuidadosamente retiradas.

A contagem plaquetária e leucocitária do sangue periférico dos animais doadores (coletado anteriormente a todo o processo), bem como do tratamento PRP, foi realizada utilizando-se um contador automático de derivados de sangue, baseado em citometria de fluxo.

Em função de a concentração plaquetária ser distinta nos animais doadores, a concentração de plaquetas foi ajustada para cada experimento. Para a obtenção da quantidade ideal, utilizou-se a seguinte fórmula: $C_1.V_1 = C_2.V_2$.

O concentrado de plaquetas foi irradiado a 25 Gy (ASPENBERG e VIRCHENKO, 2004) de acordo com os Padrões Internacionais de bancos de sangue, a fim de inativar qualquer leucócito remanescente.

Em sequência, 50 μ L desse preparado foi aplicado isoladamente em cada lesão (Figura 11). Toda a preparação e aplicação do tratamento foi realizada em todos os experimentos pela pesquisadora principal, sendo o preparo do PRP finalizado em menos de seis horas que antecediam a injeção.



Figura 11. Fração correspondente ao PRP.

Conforme literatura, sabe-se que o PRP corresponde a 10% do volume total de sangue coletado (EBY, 2002). Portanto, em um volume de 8 mL, por exemplo, foi obtido 800 μ L de PRP. Esses 800 μ L foram ressuspensos e homogeneizados. De forma a aumentar a concentração plaquetária das amostras, foi coletado somente uma fração menor (2-300 μ L) após a segunda centrifugação. Conforme mencionado anteriormente, o plasma pobre em plaquetas foi utilizado a fim de ajustar a concentração plaquetária necessária para cada experimento.

4.8.1 Preparação do PRP com alta concentração de leucócitos

A obtenção do PRP com alta concentração de leucócitos (L-PRP), foi realizada de maneira diferenciada. Após a primeira centrifugação, o sangue foi dividido em três camadas. Neste momento, para a produção do L-PRP, foi removido todo o plasma, a camada de névoa e pequena parte da camada de eritrócitos, sendo estes centrifugados posteriormente. Já para produzir o PRP padrão, foi removido plasma e zona de névoa, mas desta vez, evitando-se ao máximo a coleta de eritrócitos. Após a segunda centrifugação, somente a camada mais profunda foi coletada, conforme na preparação do PRP padrão (Figura 12).

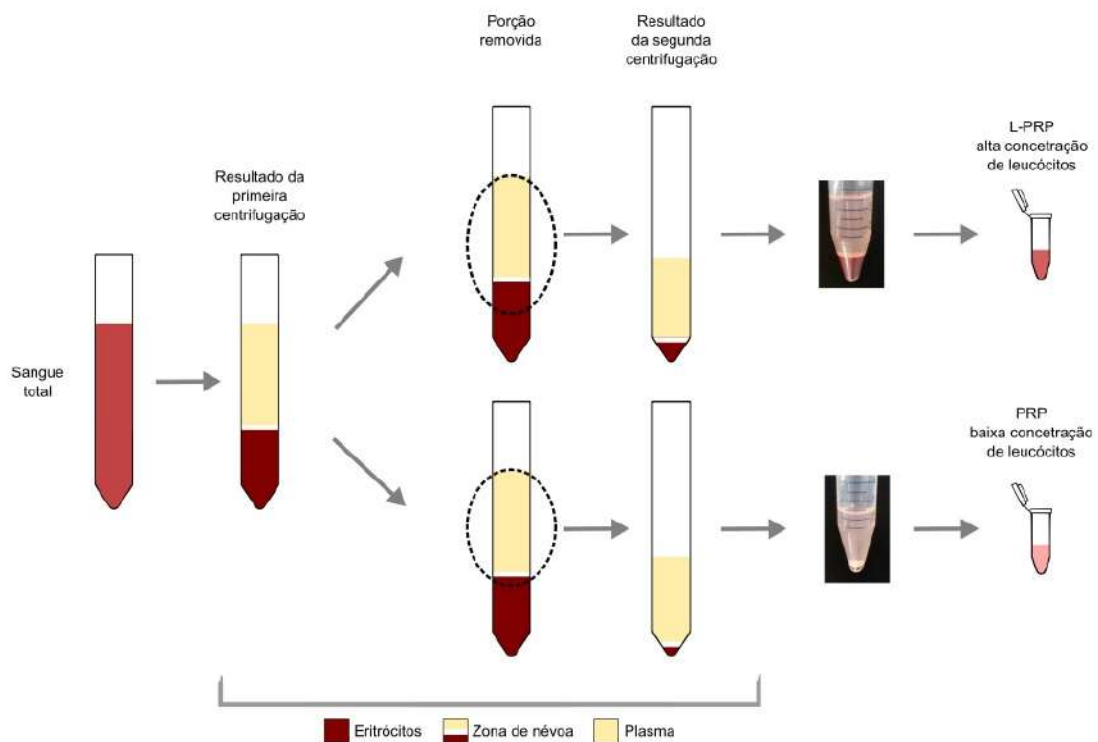


Figura 12. Processo de preparo do PRP padrão e L-PRP. O sangue total, através de punção cardíaca, foi coletado e posteriormente inserido em um tubo Falcon, sendo em seguida realizada a primeira centrifugação. Nesta, os componentes sanguíneos, de acordo com o gradiente de densidade se dividem em três camadas: camada superior - plasma pobre em plaquetas (PPP); camada mediana - zona de névoa (plaquetas e leucócitos); camada inferior – eritrócitos; Neste momento, de acordo com a concentração de leucócitos desejada, com auxílio de pipeta é transferido para outro tubo Falcon para a realização de segunda centrifugação: PRP com alta concentração de leucócitos (L-PRP) – todo o PPP, zona de névoa e maior quantidade de eritrócitos, conforme imagem; PRP com baixa concentração de leucócitos (PRP padrão) – todo o PPP, zona de névoa e menor quantidade possível de eritrócitos, conforme imagem; Como resultado da segunda centrifugação, em ambos os protocolos, parte do PPP é removido, bem como cuidadosamente parte dos eritrócitos. Feito isso, tem-se somente as plaquetas em sua alta concentração, com a quantidade desejada de leucócitos em cada um dos preparados. O PRP é delicadamente homogeneizado, estando desta forma pronto para a utilização. Imagem de caráter ilustrativo.

4.8.2 Preparação de PRP ativado com trombina ou cloreto de Cálcio (CaCl₂)

Todos os procedimentos realizados para a preparação do PRP foram os já descritos. Contudo, quando necessário, previamente a injeção do tratamento, 50 µL do PRP padrão foram inseridos em tubos Eppendorf e, posteriormente, ativados com cloreto de cálcio (0.018mol/L) ou trombina (0.20U;1µL). Em seguida, aplicou-se o PRP na sua forma ativada em cada lesão.

4.9 EUTANÁSIA

Passados 11 dias pós-operatórios, foi realizada a eutanásia dos animais experimentais (n=181) através da utilização de dióxido de carbono. Anteriormente a eutanásia, os animais foram previamente pesados e anestesiados através da utilização de isoflurano por via inalatória. Uma amostra do tecido correspondente à área lesionada do tendão de Aquiles foi removida, iniciando assim o processo de análise para obtenção de resultados. Conforme anteriormente descrito, os animais doadores foram eutanasiados pela técnica de exsanguinação após serem devidamente anestesiados.

4.10 VARIAÇÃO DOS EXPERIMENTOS EM RELAÇÃO AOS PROCEDIMENTOS PADRÕES

A descrição anterior refere-se ao padrão aplicado nos experimentos. De acordo com cada experimento, diferentes procedimentos foram realizados, sendo suas variações descritas sequentemente. Os grupos de experimentação e número de animais utilizados em cada experimento podem ser visualizados na figura 13 e tabela 2.

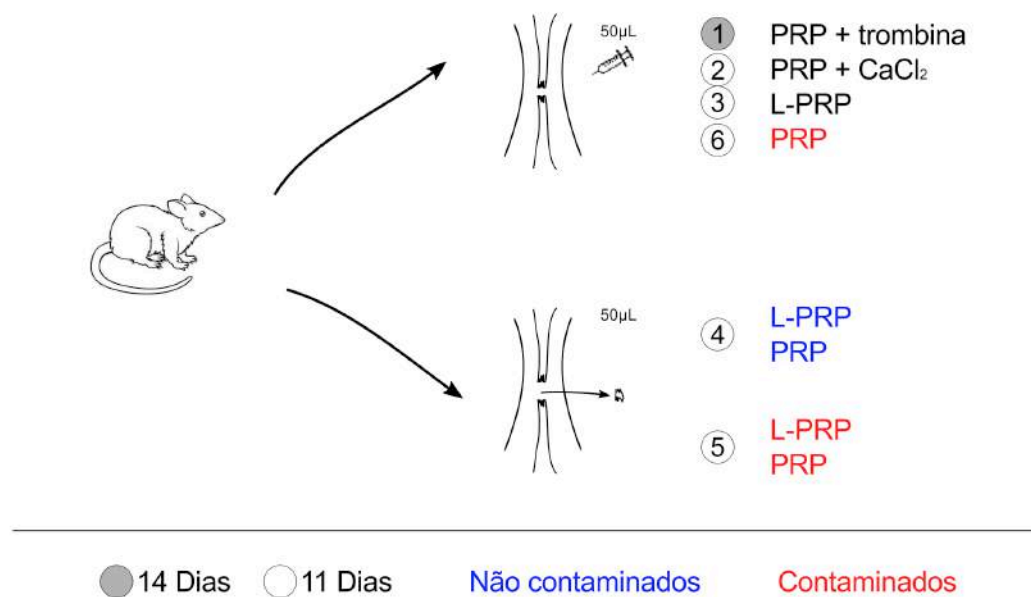


Figura 13. Esquema representativo dos tratamentos utilizados e modelo de ruptura, de acordo com o período de avaliação. CaCl₂: Cloreto de cálcio; PRP: Plasma Rico em Plaquetas; L-PRP: Plasma rico em plaquetas com alta concentração de leucócitos. Note em azul o experimento que utilizou animais provenientes da instalação nomeada 8D e em vermelho experimentos que utilizaram animais procedentes da instalação nomeada UP1, contaminada com *Staphylococcus aureus*.

Experimento 1 – O teste mecânico foi realizado em 14 dias pós-operatório. Todos os animais utilizados neste experimento foram procedentes da empresa Taconic Biosciences (Dalbyvej, Dinamarca). A fim de aumentar a reação inflamatória, através de incompatibilidade sanguínea, ratos machos Wistar foram utilizados como doadores de sangue. O sangue total para preparação do tratamento foi coletado através da utilização de citrato fosfato dextrose (CPD) sendo a primeira centrifugação realizada no tempo de 40 minutos. O PRP, após preparado, foi armazenado por 24h (4°C) antes do uso. Somente a trombina foi utilizada como ativador.

Experimento 2 - O sangue dos animais doadores não foi misturado e desta forma, diferentes recipientes possuíam diferentes doadores. Somente cloreto de cálcio foi utilizado como ativador.

Experimento 3 – O PRP não foi irradiado e a concentração de leucócitos presente no tratamento era alta (L-PRP).

Experimento 4 – Foram utilizadas caixas designadas para aumentar a atividade física dos animais. Em relação as gaiolas padrões, estas tinham uma maior área para circulação (1.900 cm²) e eram equipadas com um segundo andar (figura 14). Um segmento de 3mm do

Metodologia

TA foi removido. Dois grupos de PRP foram estabelecidos neste experimento: L-PRP sem irradiação e PRP padrão com baixa concentração de leucócitos. Esses animais foram testados para contaminação, com achados negativos.



Figura 14. Caixa de dois andares utilizada para estimular o aumento da atividade física dos animais.

Experimento 5 – Na chegada dos animais junto ao departamento CBR, uma verificação de rotina demonstrou que ambos doadores e animais a serem tratados estavam contaminados com *Staphylococcus aureus*. Desta forma, percebeu-se que esses animais haviam sido enviados pelo mesmo fornecedor, contudo, eles haviam sido reproduzidos em outro departamento da companhia. Devido a essa contaminação, tais animais foram transferidos para um departamento da Universidade que permite a entrada dos mesmos. Posteriormente ao procedimento cirúrgico, as caixas nas quais estavam os animais não foram mais limpas até o dia da eutanásia. Um segmento de 2mm foi removido do TA. Dois grupos de PRP foram utilizados: L-PRP sem irradiação e PRP padrão com baixa concentração de leucócitos.

Experimento 6 - Todos os animais doadores e tratados estavam contaminados com *Staphylococcus aureus*. Após o dia da cirurgia, as caixas onde estavam inseridos os animais não foram mais higienizadas.

Tabela 2 - Visão geral de todos os grupos experimentais e suas peculiaridades

Exp.	Ratos (SD ou W)	Grupos	n	Resecção tendínea	Mistura de sangue	Irradi- ação	Contami- nação
1	27 SD + 6 W	1. Salina	14	Não	–	–	Não
		2. PRP + trombina	13		Sim	Sim	
2	24 SD + 5 SD	1. Salina	12	Não	–	–	Não
		2. PRP + CaCl ₂	12		Não	Sim	
3	20 SD + 5 SD	1. Salina	10	Não	–	–	Não
		2. L-PRP	10		Sim	Não	
4	30SD + 10 SD	1. Salina	10	3mm	–	–	Não
		2. L-PRP	10		Sim	Não	
		3. l-PRP	10		Sim	Sim	
5	30SD + 10 SD	1. Salina	10	2mm	–	–	Sim
		2. L-PRP	10		Sim	Não	
		3. l-PRP	10		Sim	Sim	
6	50 SD + 13 SD	1. Salina	25	Não	–	–	Sim
		2. PRP	25		Sim	Não	

Exp: Experimento; SD: Sprague-Dawley; W: Wistar; n: número de animais; PRP: Plasma rico em plaquetas; L-PRP: Plasma rico em plaquetas com alta concentração de leucócitos; l-PRP: Plasma rico em plaquetas e com baixa concentração de leucócitos (padrão).

4.11 TESTE BIOMECÂNICO

Passado o tempo de reparo estabelecido, 11 ou 14 dias do pós-operatório, os animais foram anestesiados com gás isoflurano e eutanasiados com CO₂ (dióxido de carbono). Os animais foram posicionados em decúbito ventral a fim de facilitar a retirada dos tecidos (Figura 15A).

Com auxílio de bisturi, uma incisão cutânea medial foi realizada na pata do animal seguindo lateralmente ao tendão até o joelho. A pele desta região foi cuidadosamente divergida a fim de expor o complexo tendíneo e demais estruturas (figura 15A).

O TA direito, juntamente com o osso calcâneo e o complexo muscular gastrocnêmio e sóleo foram livremente dissecados e coletados, sendo mantidos em solução salina a fim de evitar a desidratação (figura 15B, C, D e E).

O diâmetro sagital e transversal da porção média do calo tendíneo foi mensurada com um paquímetro digital (Figura 15 F) e a área calculada assumindo uma geometria elíptica $[(d \text{ sagital} \times d \text{ transversal} \times \pi) / 4]$. A distância entre os cotos do tendão antigo (distância do *gap*) foi mensurada através da visualização do tecido transparente do calo tendíneo, com auxílio de luz.

O músculo foi cuidadosamente “raspado” com o dorso de uma lâmina de bisturi, das fibras tendíneas e essas por sua vez, posteriormente foram fixadas em um *clamp* de metal com auxílio de papel de areia. A distância entre o *clamp* de metal e o osso calcâneo foi mensurada a fim de verificar o comprimento das amostras (Figura 15 H, I, J, K e L).

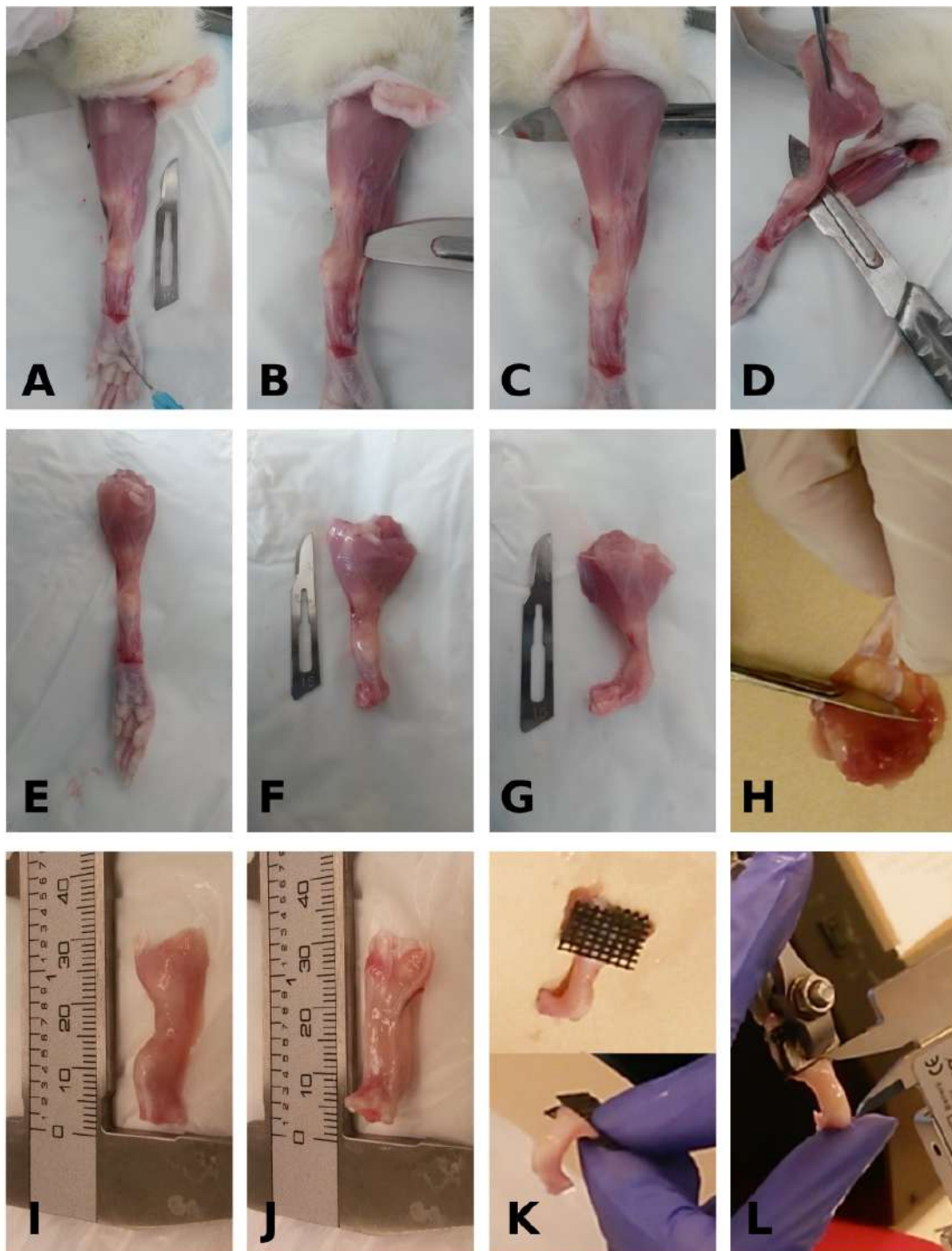


Figura 15. Coleta de material para teste mecânico. Observe em: A - animais posicionados em decúbito ventral, sendo a pata direita fixa com auxílio de agulha. Note a camada cutânea que cuidadosamente foi removida a fim de expor o complexo tendíneo, muscular e osso calcâneo; B, C, D e E – remoção do complexo tendíneo, muscular e osso calcâneo; F e G – amostra pronta para a mensuração da área transversal; H - músculo sendo “raspado” das fibras tendíneas; I e J – amostra pronta para ser posicionada no papel de areia; K - amostra fixa no papel de areia; L – amostra devidamente presa no *clamp* de metal. Após a realização de mensuração, a amostra foi inserida na máquina de tração.

Metodologia

O osso calcâneo foi fixado em um *clamp* customizado para as amostras, verticalmente, a 30° dorsiflexão relativa a direção da tração na máquina de testes mecânicos (100R, DDL Inc. Eden Prairie, MN, USA). A máquina distendeu a amostra em uma velocidade constante de 0.1 mm/s até a ruptura. O local de ruptura foi anotado para cada amostra (Figura 16 e 17).

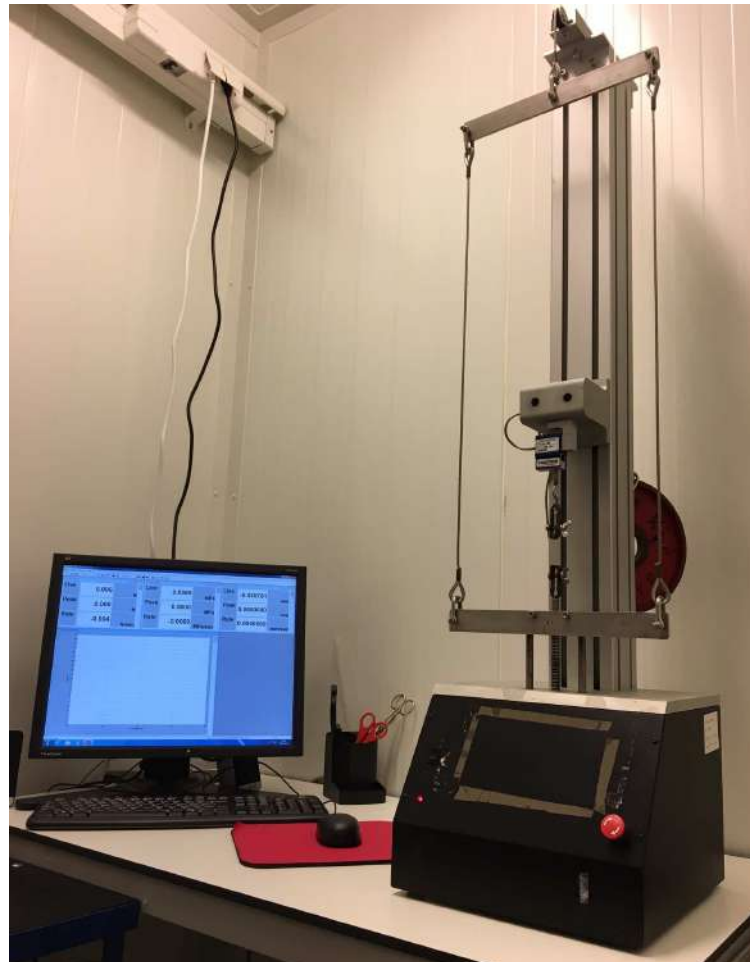


Figura 16. Máquina utilizada para a realização de teste de tração.

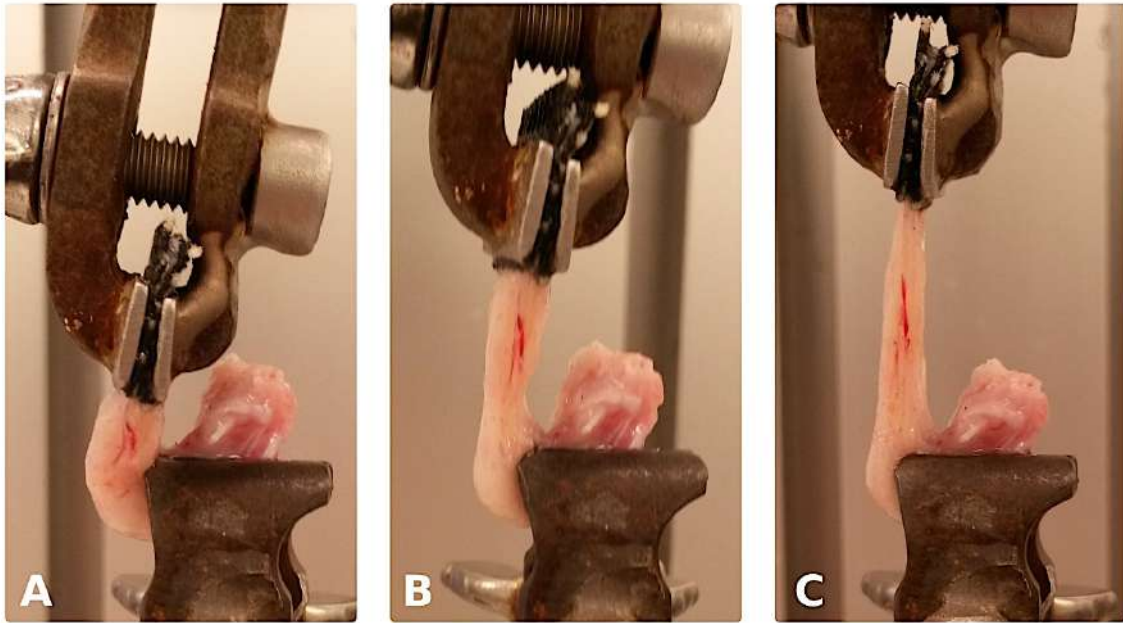


Figura 17. Realização de teste mecânico dos tendões reparados. Observe em: A - amostra presa pelos *clamps* para a realização de teste mecânico; B e C- máquina distendendo as amostras até o momento de ruptura.

O pico de força no momento de ruptura (N), a rigidez (N/mm) e a absorção de energia (Nmm) foram calculados através do software da máquina de tração. O investigador marcou a porção linear correspondente à fase elástica da curva a fim de cálculos de rigidez. O pico de stress (MPa) e a estimativa do módulo elástico foram calculados, assumindo a forma elíptica cilíndrica e propriedades mecânicas homogêneas. Todas as medidas e cálculos foram realizados por um pesquisador cegado (Figura 18).

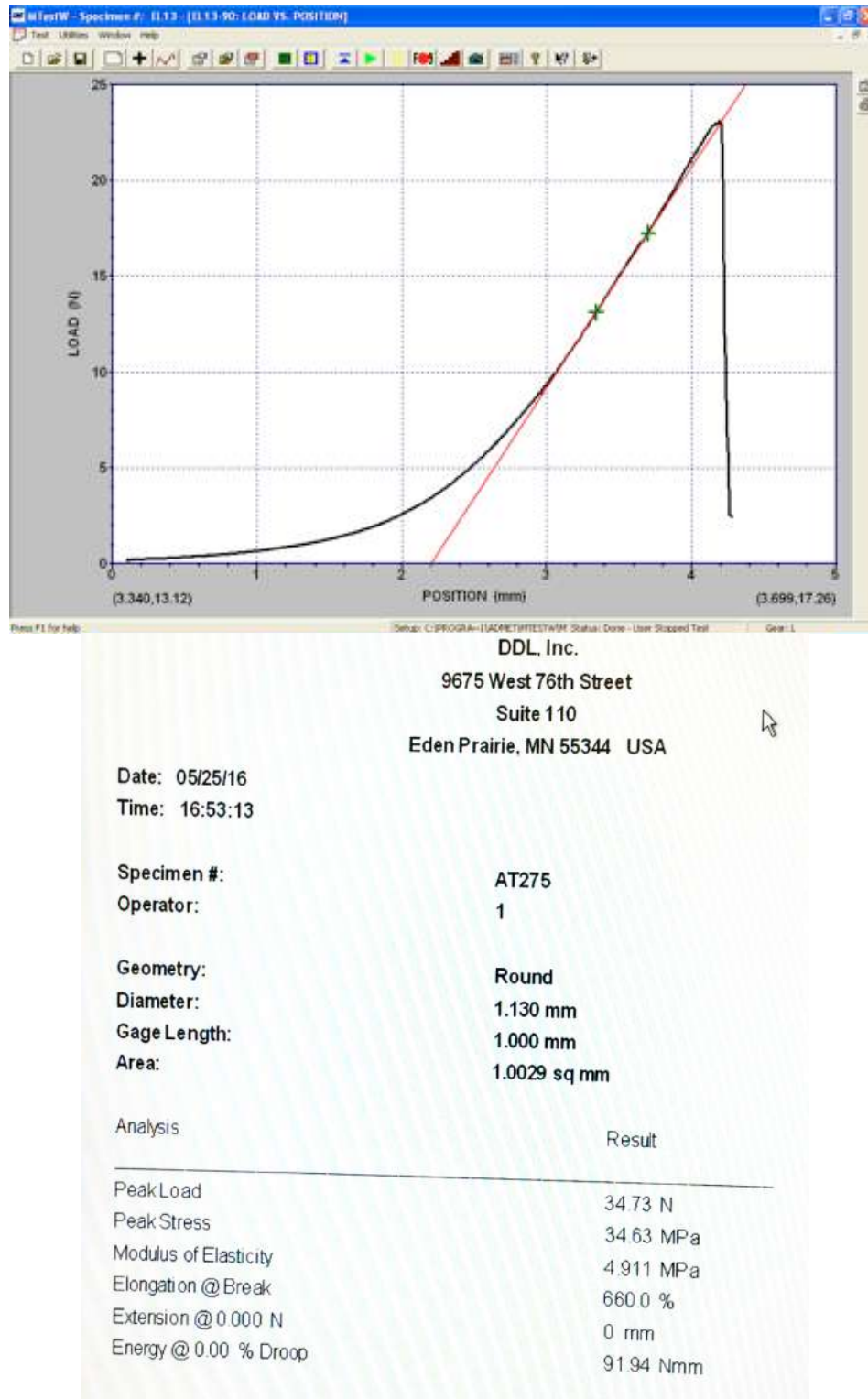


Figura 18. Medidas mecânicas provenientes do software da máquina de tração.

4.12 ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)

A quantificação do fator de crescimento PDGF (Fator de crescimento derivado das plaquetas) presentes no sangue total, no sobrenadante e bem como no PRP foi realizada a fim de verificar se as plaquetas estavam ou não ativadas anteriormente do uso destas como tratamento. Através desse método, foi possível constatar se as plaquetas estavam ativadas previamente ao processo de injeção do tratamento, pois, caso uma ativação não desejada fosse verificada, alta concentração desse fator poderia ser encontrado no plasma pobre em plaquetas.

Para tal, foi utilizado o Kit comercial PDGF-AB ELISA (KBB-177, Nordic Biosite AB, Suécia), de acordo com o protocolo do fabricante, para média concentração de proteínas, sendo todas amostras de PRP verificadas em duplicata.

Um volume de 100 μ L das amostras em questão, juntamente com 100 μ L dos diluentes de ensaio foram colocados em poços, em duplicata, e incubados a 37 °C por 90 minutos. Posteriormente, a solução foi substituída por 100 μ L do anticorpo *biotinylated anti rat* PDGF (solução de trabalho) e incubados novamente a 37 °C por 60 minutos. Os poços foram lavados 3 vezes com solução tampão TBS 0.01 M, incubados a 37 °C por 30 minutos com o complexo Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC) e lavados novamente cinco vezes com diluente tampão. O agente de desenvolvimento de cor Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado em cada poço e incubados no escuro por 25 minutos a 37°C, seguidos por adição de *stop solution* TBM. Absorbância de 450nm foi mensurada com uma máquina leitora de microplacas (VersaMax™ Tunable – Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.13 CITOMETRIA DE FLUXO

A fim de verificar os tipos de células presentes no sistema imunológico de ratos contaminados e não contaminados, o baço de 12 ratos Sprague - Dawley fêmeas (Janvier Labs) foi removido sob anestesia geral, conforme descrito previamente. Destes, 6 ratos foram provenientes da instalação de criação de animais que estava contaminada com *Staphylococcus aureus* (instalação UP1) e os demais (n=6) eram livres de patógenos oportunos específicos (SOPF), provenientes de um criadouro não contaminado (instalação 8D).

A pesquisadora principal, responsável pela coleta das amostras estava blindada em relação a identidade das amostras tanto durante a coleta quanto durante a análise do material.

Logo que removidas, as amostras de baço foram colocadas em solução tampão (RPMI 1641, 4% soro fetal bovino, 5 mM EDTA e 25 mM HEPES).

A citometria de fluxo foi realizada em FACS Aria III (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) equipado com laser de 405nm, 561nm e 633nm. Um bocal de 100µm foi utilizado. Configurações do citômetro e Beads (BD Biosciences) foram utilizados para garantir a estabilidade do citômetro. A compensação foi realizada através de controles celulares do baço de ratos, utilizando-se os mesmos anticorpos que o do experimento.

Os baços foram digeridos com Colagenase IV (300 U/mL) e DNase I (300 U/mL) em solução tampão contendo 20 mM de magnésio, por 20 minutos à 37 °C, e após lavados (600x g por 6 minutos a 4°C durante todas as etapas da centrifugação) e filtrados através do uso de um filtro de nylon de 30µm. Em seguida, o material suspenso foi lavado com tampão de marcação (Biolegend, San Diego, CA). Zoombie Violet e anti-CD6/32 (Biolegend) foram adicionados para a verificação da viabilidade celular (vida/morte celular) e Fc-blocking. A suspensão foi incubada no escuro e no gelo por 20 minutos. Uma alíquota de 1/10 (vol/vol) foi retirada de cada amostra de baço dos ratos contaminados com *Staphylococcus* em ordem a formar uma amostra mista para o *gating* do *fluorescence minus one* (FMO). Esta amostra foi utilizada como FMO para ambos os grupos, sendo o operador blindado em relação a identidade das amostras. O restante do volume 9/10 (vol/vol) de células de cada suspensão de tecido foi dividido igualmente em tubos de marcação a fim de realizar a imunofenotipagem. Os anticorpos utilizados encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Detalhes dos anticorpos utilizados neste estudo para configuração de citometria de fluxo. [] = Concentração. Cat# = Número de catálogo. Lot# = Número do lote.

Antígeno	Fluorocromo	Clone	Estoque [] (g/L)	Espelho:filtro	Fornecedor	CAT#	LOT#
CD45	PE-Cy7	OX-1	0.2	735LP:780/60	Biologend	202214	B151577
CD3	AF647	1F4	0.5	:-660/20	Biologend	201408	B152236
CD4	PE	OX-35	0.2	:-582/15	Biologend	203308	B140103
CD8a	PerCP	OX-8	0.2	502LP:675/20	Biologend	201712	B140789
CD25	Biotin	OX-39	0.5	:-	Biologend	202111	B152501
Biotin	Streptavidin-BV510	N/A	0.1	502LP:510/50	Biologend	405233	B164013

A marcação primária foi realizada em ambiente escuro e no gelo por 30 minutos. Posteriormente as células foram duas vezes lavadas e em seguida, a segunda marcação foi realizada sob as mesmas condições já citadas. As células foram então fixadas em solução de paraformaldeído 2% por 20 minutos a temperatura ambiente, seguida por duas lavagens com tampão de marcação. As células foram armazenadas a temperatura de 8 °C por 1 dia antes do ensaio de citometria de fluxo.

Gating foi definido por FMO para CD25, já que este foi expresso continuamente. *Gatings* de antígenos discretos foram definidos de acordo com a morfologia da população. Em todas as amostras, o *gating* inicial foi feito em células únicas, parâmetros de dispersão, células vivas e células CD45+, a fim de definir leucócitos vivos únicos. *Gating* foi realizado em FlowJo vX.0.7 (Treestar, Ashland, OR).

4.14 ESTATÍSTICA

No presente estudo, o pico de força foi considerado como a principal variável dependente. Cada um dos 6 experimentos foi inicialmente analisado separadamente, e submetidos à análise de variância de uma via (1-way ANOVA) ou através do Welch's T-test (Teste T) com auxílio do software SPSS, versão 21.

Os experimentos número 4 e 5 foram comparados utilizando ANOVA de duas vias tendo como fatores fixos o status bacteriológico do animal e o tratamento PRP.

Ao final, todos os experimentos (menos o experimento número 1, uma vez que foi analisado em outro tempo de reparo) foram analisados através da utilização de ANOVA de duas vias com presença de *Staphylococcus* e tratamento com PRP como valores fixos, verificando-se especificamente a interação entre PRP e status bacteriológico.

A análise estatística do teste de citometria de fluxo foi realizada através do R *programming environment*, sendo células CD45+, CD3+, CD8a+ em relação a CD45+ escolhidas como variável principal. Ratos com e sem *Staphylococcus* foram comparados através do Mann-Whitney U- test.

Todos os resultados foram expressos como média \pm SD e diferenças entre grupos foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

4.15 ASPECTOS BIOÉTICOS

A presente pesquisa foi realizada visando minimizar o sofrimento dos animais que foram utilizados.

A anestesia por via inalatória foi utilizada em todos os procedimentos cirúrgicos. Para a eutanásia, os animais foram anestesiados, sendo em seguida, colocados em contato com dióxido de carbono. Os ratos doadores entretanto, após anestesiados, foram eutanasiados através da técnica de exsanguinação.

O monitoramento diário dos animais foi realizado a partir do momento que os animais chegaram ao centro de pesquisa experimental da Universidade de Linköping na Suécia. Em caso de qualquer anormalidade, de acordo com a gravidade do sinal detectado, foram realizadas ações ou intervenções visando o bem-estar animal, tais como: aumento de frequência no monitoramento, consulta a um veterinário com experiência adequada, aumento/diminuição da dose de analgesia ou administração de um tratamento específico (por indicação veterinária) ou eutanásia do mesmo, dependendo do estado singular de cada animal.

Alice: "This is impossible."

The Mad hatter: "Only if you believe it is."

Alice in Wonderland, 2010.

5 REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, S. O.; LOHMANDER, S. Differential effects of insulin-like growth factor-I on matrix and DNA synthesis in various regions and types of rabbit tendons. **J Orthop Res**, v. 14, n. 3, p. 370-6, May 1996. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676248> >.

ACKERMANN, P. W.; AHMED, M.; KREICBERGS, A. Early nerve regeneration after achilles tendon rupture--a prerequisite for healing? A study in the rat. **J Orthop Res**, v. 20, n. 4, p. 849-56, Jul 2002. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12168677> >.

ACKERMANN, P. W. et al. Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat achilles tendon. **J Orthop Res**, v. 21, n. 3, p. 432-41, May 2003. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706015> >.

AHTIKOSKI, A. M. et al. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, v. 177, n. 4, p. 473-81, Apr 2003. ISSN 0001-6772 (Print) 0001-6772 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648165> >.

AKEDA, K. et al. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 31, n. 9, p. 959-66, Apr 20 2006. ISSN 1528-1159 (Electronic)0362-2436 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641770> >.

ANDERSEN, M. H. et al. Cytotoxic T cells. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 1, p. 32-41, Jan 2006. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16417215> >.

ANDIA, I.; SANCHEZ, M.; MAFFULLI, N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. **Expert Opin Biol Ther**, v. 10, n. 10, p. 1415-26, Oct 2010. ISSN 1744-7682 (Electronic) 1471-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718690> >.

ANITUA, E. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb Haemost**, v. 91, n. 1, p. 4-15, Jan 2004. ISSN 0340-6245 (Print)0340-6245 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691563> >.

ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol Ther**, v. 52, n. 3, p. 407-22, Dec 1991. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1726477> >.

Referências

ASPENBERG, P.; FORSLUND, C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. **Acta Orthop Scand**, v. 70, n. 1, p. 51-4, Feb 1999. ISSN 0001-6470 (Print) 0001-6470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10191749> >.

ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. **Acta Orthop Scand**, v. 75, n. 1, p. 93-9, Feb 2004. ISSN 0001-6470 (Print)0001-6470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15022816> >.

ASPLUND, C. A.; BEST, T. M. Achilles tendon disorders. **BMJ**, v. 346, p. f1262, Mar 12 2013. ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-535X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482943> >.

BAR-SHAVIT, R. et al. Chemotactic response of monocytes to thrombin. **J Cell Biol**, v. 96, n. 1, p. 282-5, Jan 1983. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6826648> >.

BENJAMIN, M. et al. The "enthesis organ" concept: why enthesopathies may not present as focal insertional disorders. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 10, p. 3306-13, Oct 2004. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476254> >.

BEST, T. M. et al. Characterization of the passive responses of live skeletal muscle using the quasi-linear theory of viscoelasticity. **J Biomech**, v. 27, n. 4, p. 413-9, Apr 1994. ISSN 0021-9290 (Print) 0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8188722> >.

BEURA, L. K. et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. **Nature**, v. 532, n. 7600, p. 512-6, Apr 28 2016. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096360> >.

BIRK, D. E. et al. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. **Dev Dyn**, v. 208, n. 3, p. 291-8, Mar 1997. ISSN 1058-8388 (Print) 1058-8388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9056634> >.

BLOMGRAN, P. et al. A possible link between loading, inflammation and healing: Immune cell populations during tendon healing in the rat. **Sci Rep**, v. 6, p. 29824, Jul 13 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27405922> >.

BOSWELL, S. G. et al. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. **Am J Sports Med**, v. 42, n. 1, p. 42-9, Jan 2014. ISSN 1552-3365 (Electronic) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24136860> >.

Referências

- BOYER, M. I. et al. Quantitative variation in vascular endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. **J Orthop Res**, v. 19, n. 5, p. 869-72, Sep 2001. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562135> >.
- BRING, D. K. et al. Physical activity modulates nerve plasticity and stimulates repair after Achilles tendon rupture. **J Orthop Res**, v. 25, n. 2, p. 164-72, Feb 2007. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17068813> >.
- CHAN, B. P. et al. Photochemical repair of Achilles tendon rupture in a rat model. **J Surg Res**, v. 124, n. 2, p. 274-9, Apr 2005. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15820258> >.
- CHANG, J. et al. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. **J Hand Surg Am**, v. 23, n. 6, p. 1052-8, Nov 1998. ISSN 0363-5023 (Print) 0363-5023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9848558> >.
- CHEN, L. B.; BUCHANAN, J. M. Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 1, p. 131-5, Jan 1975. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1054489> >.
- DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED, H. O.; NIXON, A. J. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **J Orthop Res**, v. 23, n. 1, p. 84-92, Jan 2005. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607879> >.
- DAYTON, P. Anatomic, Vascular, and Mechanical Overview of the Achilles Tendon. **Clin Podiatr Med Surg**, v. 34, n. 2, p. 107-113, Apr 2017. ISSN 1558-2302 (Electronic) 0891-8422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28257668> >.
- DE JONGE, S. et al. One-year follow-up of platelet-rich plasma treatment in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Am J Sports Med**, v. 39, n. 8, p. 1623-9, Aug 2011. ISSN 1552-3365 (Electronic) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602565> >.
- DE VOS, R. J. et al. No effects of PRP on ultrasonographic tendon structure and neovascularisation in chronic midportion Achilles tendinopathy. **Br J Sports Med**, v. 45, n. 5, p. 387-92, Apr 2011. ISSN 1473-0480 (Electronic) 0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047840> >.
- DELONG, J. M.; RUSSELL, R. P.; MAZZOCCA, A. D. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. **Arthroscopy**, v. 28, n. 7, p. 998-1009, Jul 2012. ISSN 1526-3231 (Electronic) 0749-8063 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738751> >.
-

Referências

DIETRICH, F. et al. Platelet-Rich Fibrin Promotes an Accelerated Healing of Achilles Tendon When Compared to Platelet-Rich Plasma in Rat. **World J Plast Surg**, v. 4, n. 2, p. 101-9, Jul 2015. ISSN 2228-7914 (Print) 2228-7914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284178> >.

DINES, J. S. et al. The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model. **J Shoulder Elbow Surg**, v. 16, n. 5 Suppl, p. S215-21, Sep-Oct 2007. ISSN 1532-6500 (Electronic) 1058-2746 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507245> >.

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. e37-44, Mar 2006. ISSN 1528-395X (Electronic) 1079-2104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504849> >.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. **Muscles Ligaments Tendons J**, v. 4, n. 1, p. 3-9, Jan 2014. ISSN 2240-4554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932440> >.

DORAL, M. N. et al. Functional anatomy of the Achilles tendon. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 18, n. 5, p. 638-43, May 2010. ISSN 1433-7347 (Electronic) 0942-2056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182867> >.

EBY, B. W. Platelet-rich plasma: harvesting with a single-spin centrifuge. **J Oral Implantol**, v. 28, n. 6, p. 297-301, 2002. ISSN 0160-6972 (Print) 0160-6972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498540> >.

EGGER, A. C.; BERKOWITZ, M. J. Achilles tendon injuries. **Curr Rev Musculoskelet Med**, v. 10, n. 1, p. 72-80, Mar 2017. ISSN 1935-973X (Print) 1935-9748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28194638> >.

ELIASSON, P. **Response to mechanical loading in healing tendons**. 2011. Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, Linköping.

ELIASSON, P.; ANDERSSON, T.; ASPENBERG, P. Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 2, p. 399-407, Aug 2009. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541731> >.

_____. Achilles tendon healing in rats is improved by intermittent mechanical loading during the inflammatory phase. **J Orthop Res**, v. 30, n. 2, p. 274-9, Feb 2012a. ISSN 1554-527X (Electronic) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21809382> >.

Referências

_____. Influence of a single loading episode on gene expression in healing rat Achilles tendons. **J Appl Physiol** (1985), v. 112, n. 2, p. 279-88, Jan 2012b. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998267> >.

ELIASSON, P. et al. Primary gene response to mechanical loading in healing rat Achilles tendons. **J Appl Physiol** (1985), v. 114, n. 11, p. 1519-26, Jun 2013. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519232> >.

ENWEMEKA, C. S. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. **Phys Ther**, v. 69, n. 10, p. 816-25, Oct 1989a. ISSN 0031-9023 (Print) 0031-9023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2780808> >.

_____. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 68, n. 6, p. 283-7, Dec 1989.b ISSN 0894-9115 (Print) 0894-9115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2686717> >.

EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. **Plast Reconstr Surg**, v. 118, n. 6, p. 147e-159e, Nov 2006. ISSN 1529-4242 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051095> >.

EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 6, p. 1502-8, Nov 2004. ISSN 1529-4242 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509939> >.

EVANS, C. H. Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons. **Sports Med**, v. 28, n. 2, p. 71-6, Aug 1999. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492026> >.

EVERTS, P. A. et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. **Growth Factors**, v. 24, n. 3, p. 165-71, Sep 2006. ISSN 0897-7194 (Print) 0897-7194 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079200> >.

EVERTS, P. A. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **J Extra Corpor Technol**, v. 38, n. 2, p. 174-87, 2006. ISSN 0022-1058 (Print) 0022-1058 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921694> >.

EYDEN, B.; TZAPHLIDOU, M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. **Micron**, v. 32, n. 3, p. 287-300, Apr 2001. ISSN 0968-4328 (Print) 0968-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006508> >.

Referências

- FILARDO, G. et al. Platelet-rich plasma in tendon-related disorders: results and indications. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, Sep 24 2016. ISSN 1433-7347 (Electronic) 0942-2056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27665095> >.
- FLAMME, I. et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. **Dev Biol**, v. 171, n. 2, p. 399-414, Oct 1995. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556923> >.
- FORSLUND, C.; RUEGER, D.; ASPENBERG, P. A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats. **J Orthop Res**, v. 21, n. 4, p. 617-21, Jul 2003. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798060> >.
- FOURE, A. New Imaging Methods for Non-invasive Assessment of Mechanical, Structural, and Biochemical Properties of Human Achilles Tendon: A Mini Review. **Front Physiol**, v. 7, p. 324, 2016. ISSN 1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512376> >.
- FUNG-LEUNG, W. P. et al. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. **Cell**, v. 65, n. 3, p. 443-9, May 03 1991. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1673361> >.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 2. Guanabara Koogan, 2003.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**. 4. Guanabara Koogan, 2007.
- GELBERMAN, R. H.; KHABIE, V.; CAHILL, C. J. The revascularization of healing flexor tendons in the digital sheath. A vascular injection study in dogs. **J Bone Joint Surg Am**, v. 73, n. 6, p. 868-81, Jul 1991. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1712787> >.
- GELSE, K.; POSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, n. 12, p. 1531-46, Nov 28 2003. ISSN 0169-409X (Print) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623400> >.
- GOFFI, F. S. **Técnica cirúrgica - Bases anatômicas, fisiopatologias e técnicas da cirurgia**. 4. São Paulo: Atheneu, 1996.
- GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 22, n. 6, p. 547-57, Dec 2002. ISSN 0198-7569 (Print) 0198-7569 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516826> >.
-

Referências

GROSS, C. E.; NUNLEY, J. A., 2ND. Acute Achilles Tendon Ruptures. **Foot Ankle Int**, v. 37, n. 2, p. 233-9, Feb 2016. ISSN 1944-7876 (Electronic) 1071-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26590377> >.

HAMMERMAN, M.; ASPENBERG, P.; ELIASSON, P. Microtrauma stimulates rat Achilles tendon healing via an early gene expression pattern similar to mechanical loading. **J Appl Physiol** (1985), v. 116, n. 1, p. 54-60, Jan 01 2014. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177691> >.

HESS, G. W. Achilles tendon rupture: a review of etiology, population, anatomy, risk factors, and injury prevention. **Foot Ankle Spec**, v. 3, n. 1, p. 29-32, Feb 2010. ISSN 1938-7636 (Electronic) 1938-6400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400437> >.

HIPPENSTIEL, S. et al. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. **Am J Physiol**, v. 274, n. 5 Pt 1, p. L678-84, May 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612282> >.

HOKUGO, A. et al. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. **Tissue Eng**, v. 11, n. 7-8, p. 1224-33, Jul-Aug 2005. ISSN 1076-3279 (Print) 1076-3279 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144458> >.

JACKSON, J. B., 3RD et al. Characterization of plantaris tendon constructs for ankle ligament reconstruction. **Foot Ankle Int**, v. 35, n. 9, p. 922-8, Sep 2014. ISSN 1944-7876 (Electronic) 1071-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920587> >.

JOZSA, L.; KANNUS, P. **Human Tendons: Anatomy, Physiology, and Pathology**. USA: Human Kinetics, 1997. 574.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. Rio de Janeiro: 2004.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports**, v. 10, n. 6, p. 312-20, Dec 2000. ISSN 0905-7188 (Print) 0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085557> >.

KANNUS, P.; NATRI, A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, n. 2, p. 107-12, Apr 1997. ISSN 0905-7188 (Print) 0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211611> >.

KAWASUMI, M. et al. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. **J Bone Joint Surg Br**, v. 90, n. 7, p. 966-72, Jul 2008. ISSN 0301-620X (Print) 0301-620X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591611> >.

Referências

KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **J Extra Corpor Technol**, v. 36, n. 1, p. 28-35, Mar 2004. ISSN 0022-1058 (Print) 0022-1058 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15095838> >.

KHAN, K. M. et al. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. **Sports Med**, v. 27, n. 6, p. 393-408, Jun 1999. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418074> >.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular. Uma introdução a Patologia**. 3. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2012. 752.

KOMI, P. V. Relevance of in vivo force measurements to human biomechanics. **J Biomech**, v. 23 Suppl 1, p. 23-34, 1990. ISSN 0021-9290 (Print) 0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081741> >.

KOSE, O. et al. Prediction of the presence of plantaris tendon through examination of palmaris longus tendon. Is there a link? . **Int. J. Morphol**, v. 32, n. 2, p. 589-592, 2014.

LANDESBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 58, n. 3, p. 297-300; discussion 300-1, Mar 2000. ISSN 0278-2391 (Print) 0278-2391 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716112> >.

LANTTO, I. et al. Epidemiology of Achilles tendon ruptures: increasing incidence over a 33-year period. **Scand J Med Sci Sports**, v. 25, n. 1, p. e133-8, Feb 2015. ISSN 1600-0838 (Electronic) 0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24862178> >.

LIU, S. H. et al. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. **Clin Orthop Relat Res**, n. 318, p. 265-78, Sep 1995. ISSN 0009-921X (Print) 0009-921X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7671527> >.

LIU, Y. et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. **Nat Med**, v. 17, n. 12, p. 1594-601, Nov 20 2011. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101767> >.

MAFFULLI, N.; KHAN, K. M.; PUDDU, G. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. **Arthroscopy**, v. 14, n. 8, p. 840-3, Nov-Dec 1998. ISSN 0749-8063 (Print) 0749-8063 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9848596> >.

MAGANARIS, C. N.; NARICI, M. V.; MAFFULLI, N. Biomechanics of the Achilles tendon. **Disabil Rehabil**, v. 30, n. 20-22, p. 1542-7, 2008. ISSN 0963-8288 (Print) 0963-8288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720120> >.

Referências

MAIA, L. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, 2009.

MAJEWSKI, M. et al. Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. **Am J Sports Med**, v. 37, n. 11, p. 2117-25, Nov 2009. ISSN 1552-3365 (Electronic) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875360> >.

MAJEWSKI, M.; WIDMER, K. H.; STEINBRUCK, K. [Achilles tendon ruptures: 25 year's experience in sport-orthopedic treatment]. **Sportverletz Sportschaden**, v. 16, n. 4, p. 167-73, Dec 2002. ISSN 0932-0555 (Print) 0932-0555 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563559> >.

MARUI, T. et al. Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. **J Orthop Res**, v. 15, n. 1, p. 18-23, Jan 1997. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9066522> >.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dent**, v. 10, n. 4, p. 225-8, 2001. ISSN 1056-6163 (Print) 1056-6163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11813662> >.

_____. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 4, p. 489-96, Apr 2004. ISSN 0278-2391 (Print) 0278-2391 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085519> >.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 6, p. 638-46, Jun 1998. ISSN 1079-2104 (Print) 1079-2104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9638695> >.

MAZZOCCA, A. D. et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. **J Bone Joint Surg Am**, v. 94, n. 4, p. 308-16, Feb 15 2012. ISSN 1535-1386 (Electronic) 0021-9355 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22336969> >.

MEYER-INGOLD, W.; EICHNER, W. Platelet-derived growth factor. **Cell Biol Int**, v. 19, n. 5, p. 389-98, May 1995. ISSN 1065-6995 (Print) 1065-6995 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7640655> >.

MURRAY, M. M. et al. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold. **J Orthop Res**, v. 25, n. 8, p. 1007-17, Aug 2007. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17415785> >.

NOURISSAT, G.; BERENBAUM, F.; DUPREZ, D. Tendon injury: from biology to tendon repair. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, n. 4, p. 223-33, Apr 2015. ISSN 1759-4804 (Electronic) 1759-4790 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734975> >.

Referências

O'BRIEN, M. The anatomy of the Achilles tendon. **Foot Ankle Clin**, v. 10, n. 2, p. 225-38, Jun 2005. ISSN 1083-7515 (Print) 1083-7515 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922915> >.

OH, J. H. et al. Comparison of the Cellular Composition and Cytokine-Release Kinetics of Various Platelet-Rich Plasma Preparations. **Am J Sports Med**, v. 43, n. 12, p. 3062-70, Dec 2015. ISSN 1552-3365 (Electronic) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473014> >.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg**, v. 187, n. 5A, p. 11S-16S, May 2004. ISSN 0002-9610 (Print) 0002-9610 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147986> >.

PATHAK, S.; PALAN, U. **Immunology Essential and Fundamental**. . 2. India: 2005.

PEACOCK, E. E., JR. A study of the circulation in normal tendons and healing grafts. **Ann Surg**, v. 149, n. 3, p. 415-28, Mar 1959. ISSN 0003-4932 (Print) 0003-4932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13627999> >.

PISKIN, A. et al. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. **Microsurgery**, v. 29, n. 2, p. 144-53, 2009. ISSN 1098-2752 (Electronic) 0738-1085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19031394> >.

REES, J. D.; STRIDE, M.; SCOTT, A. Tendons--time to revisit inflammation. **Br J Sports Med**, v. 48, n. 21, p. 1553-7, Nov 2014. ISSN 1473-0480 (Electronic) 0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23476034> >.

REINKE, S. et al. Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 177, p. 177ra36, Mar 20 2013. ISSN 1946-6242 (Electronic) 1946-6234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23515078> >.

RICKERT, M. et al. A growth and differentiation factor-5 (GDF-5)-coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. **Growth Factors**, v. 19, n. 2, p. 115-26, 2001. ISSN 0897-7194 (Print) 0897-7194 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11769971> >.

RILEY, G. P. et al. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. **Ann Rheum Dis**, v. 53, n. 6, p. 359-66, Jun 1994. ISSN 0003-4967 (Print) 0003-4967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8037494> >.

RODEO, S. A. Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. **J Shoulder Elbow Surg**, v. 16, n. 5 Suppl, p. S191-7, Sep-Oct 2007. ISSN 1532-6500 (Electronic) 1058-2746 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574875> >.

Referências

- ROSENBAUM, A. J. et al. Histologic stages of healing correlate with restoration of tensile strength in a model of experimental tendon repair. **HSS J**, v. 6, n. 2, p. 164-70, Sep 2010. ISSN 1556-3324 (Electronic) 1556-3316 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21886531> >.
- RUFAL, A.; RALPHS, J. R.; BENJAMIN, M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. **J Orthop Res**, v. 13, n. 4, p. 585-93, Jul 1995. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7674075> >.
- SANCHEZ, M. et al. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. **Am J Sports Med**, v. 35, n. 2, p. 245-51, Feb 2007. ISSN 0363-5465 (Print) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17099241> >.
- SCHEPULL, T. et al. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. **Am J Sports Med**, v. 39, n. 1, p. 38-47, Jan 2011. ISSN 1552-3365 (Electronic) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051425> >.
- SCUTT, N.; ROLF, C. G.; SCUTT, A. Tissue specific characteristics of cells isolated from human and rat tendons and ligaments. **J Orthop Surg Res**, v. 3, p. 32, 2008. ISSN 1749-799X (Electronic) 1749-799X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652675> >.
- SEN, B. et al. The Effect of Autologous Platelet Rich Plasma in the Treatment of Achilles Tendon Ruptures: An Experimental Study on Rabbits. **Balkan Med J**, v. 33, n. 1, p. 94-101, Jan 2016. ISSN 2146-3123 (Print) 2146-3123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26966624> >.
- SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 1, p. 187-202, Jan 2005. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634833> >.
- SLATER, M. et al. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **J Orthop Res**, v. 13, n. 5, p. 655-63, Sep 1995. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472743> >.
- SPANG, C. et al. The plantaris tendon: a narrative review focusing on anatomical features and clinical importance. **Bone Joint J**, v. 98-B, n. 10, p. 1312-1319, Oct 2016. ISSN 2049-4408 (Electronic) 2049-4394 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27694583> >.
- SPINDLER, K. P. et al. The use of platelets to affect functional healing of an anterior cruciate ligament (ACL) autograft in a caprine ACL reconstruction model. **J Orthop Res**, v. 27, n. 5, p. 631-8, May 2009. ISSN 1554-527X (Electronic) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009602> >.
-

Referências

- STAPPENBECK, T. S.; VIRGIN, H. W. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 191-9, Jun 9 2016. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279212> >.
- STIERNBERG, J. et al. Acceleration of full-thickness wound healing in normal rats by the synthetic thrombin peptide, TP508. **Wound Repair Regen**, v. 8, n. 3, p. 204-15, May-Jun 2000. ISSN 1067-1927 (Print) 1067-1927 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10886811> >.
- SUCHAK, A. A. et al. The incidence of Achilles tendon ruptures in Edmonton, Canada. **Foot Ankle Int**, v. 26, n. 11, p. 932-6, Nov 2005. ISSN 1071-1007 (Print) 1071-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16309606> >.
- SUNITHA, R. V.; MUNIRATHNAM, N. E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. **Indian J Dent Res**, v. 19, n. 1, p. 42-6, Jan-Mar 2008. ISSN 0970-9290 (Print) 0970-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245923> >.
- THEOBALD, P. et al. The functional anatomy of Kager's fat pad in relation to retrocalcaneal problems and other hindfoot disorders. **J Anat**, v. 1, p. 91-97, 2006.
- THERMANN, H. et al. **The Achilles Tendon. An Atlas of Surgical Procedure.** 2017. ISBN 978-3-662-54074-9.
- THOMPSON, J. I.; CZERNUSZKA, J. T. The effect of two types of cross-linking on some mechanical properties of collagen. **Biomed Mater Eng**, v. 5, n. 1, p. 37-48, 1995. ISSN 0959-2989 (Print) 0959-2989 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7773145> >.
- TOMAK, S. L.; FLEMING, L. L. Achilles tendon rupture: an alternative treatment. **Am J Orthop (Belle Mead NJ)**, v. 33, n. 1, p. 9-12, Jan 2004. ISSN 1078-4519 (Print) 1078-4519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14763591> >.
- VAN STERKENBURG, M. N. et al. The plantaris tendon and a potential role in mid-portion Achilles tendinopathy: an observational anatomical study. **J Anat**, v. 218, n. 3, p. 336-41, Mar 2011. ISSN 1469-7580 (Electronic) 0021-8782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21323916> >.
- VIRCHENKO, O. **Stimulation of tendon repair by platelet concentrate, CDMP-2 and mechanical loading in animal models.** 2007. Faculty of Health Sciences, Linköping University
- VIRCHENKO, O.; ASPENBERG, P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. **Acta Orthop**, v. 77, n. 5, p. 806-12, Oct 2006. ISSN 1745-3674 (Print) 1745-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17068715> >.
-

Referências

- VIRCHENKO, O.; GRENEGARD, M.; ASPENBERG, P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. **Acta Orthop**, v. 77, n. 6, p. 960-6, Dec 2006. ISSN 1745-3674 (Print) 1745-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17260208> >.
- WALL, M. E. et al. Connexin 43 is localized with actin in tenocytes. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 64, n. 2, p. 121-30, Feb 2007. ISSN 0886-1544 (Print) 0886-1544 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183550> >.
- WANG, J. H. Mechanobiology of tendon. **J Biomech**, v. 39, n. 9, p. 1563-82, 2006. ISSN 0021-9290 (Print) 0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000201> >.
- WHITE, W. L. The unique, accessible and useful plantaris tendon. **Plast Reconstr Surg Transplant Bull**, v. 25, p. 133-41, Feb 1960. ISSN 0096-8501 (Print) 0096-8501 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13844415> >.
- WROTNIAK, M.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T. S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. **Ortop Traumatol Rehabil**, v. 9, n. 3, p. 227-38, May-Jun 2007. ISSN 1509-3492 (Print) 1509-3492 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721419> >.
- YASUDA, T. et al. Unfavorable effect of knee immobilization on Achilles tendon healing in rabbits. **Acta Orthop Scand**, v. 71, n. 1, p. 69-73, Feb 2000. ISSN 0001-6470 (Print) 0001-6470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10743997> >.
- ZHANG, F. et al. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 112, n. 6, p. 1613-9, Nov 2003. ISSN 0032-1052 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14578792> >.
- ZHANG, L. et al. Harmful Effects of Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma on Rabbit Tendon Stem Cells In Vitro. **Am J Sports Med**, v. 44, n. 8, p. 1941-51, Aug 2016. ISSN 1552-3365 (Electronic) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184544> >.
- ZHOU, Y. et al. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 173, 2015. ISSN 1757-6512 (Electronic) 1757-6512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26373929> >.
-

ANEXOS

Platelet-Rich Fibrin Promotes an Accelerated Healing of Achilles Tendon When Compared to Platelet-Rich Plasma in Rat

Franciele Dietrich^{1*}, Gustavo L. Duré¹, Caroline P. Klein¹, Vinícius F. Bampi¹, Alexandre V. Padoin², Vinícius D. Silva³, Jefferson Braga-Silva^{1,2}

1. Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;
2. Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery, São Lucas Hospital, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil;
3. Service of Pathology Anatomy and Cytopathology, São Lucas Hospital, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil

ABSTRACT

BACKGROUND

Autologous platelet concentrate has been used to improve the function and regeneration of injured tissues. Tendinopathies are common in clinical practice, although long-term treatment is required. On the basis of lead time, we compared the effect of using platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in repairing rat Achilles tendon.

METHODS

The effectiveness of using PRP and PRF was evaluated after 14 and 28 postoperative days by histological analysis. The quantification of collagen types I and III was performed by Sirius red staining. Qualitatively, the data were verified with hematoxylin-eosin (H&E) staining.

RESULTS

In Sirius red staining, no significant treatment differences were found between groups. Statistical difference was observed only between PRP (37.2% collagen) and the control group (16.2%) 14 days after treatment. Intra-groups compared twice showed a difference for collagen I (27.8% and 47.7%) and III (66.9% and 46.0%) in the PRF group. The control group showed differences only in collagen I (14.2% and 40.9%) and no other finding was observed in the PRP group. In H&E staining, PRF showed a better cellular organization when compared to the other groups at 28 days.

CONCLUSION

Our study suggests that PRF promotes accelerated regeneration of the Achilles tendon in rats, offering promising prospects for future clinical use.

KEYWORDS

Healing; Platelet-rich fibrin; Achilles tendon; Platelet-rich plasma

Please cite this paper as:

Dietrich F, Duré GL, Klein CP, Bampi VF, Padoin AV, Silva VD, Braga-Silva J. Platelet-Rich Fibrin Promotes an Accelerated Healing of Achilles Tendon When Compared to Platelet-Rich Plasma in Rat. *World J Plast Surg* 2015;4(2):101-109.

INTRODUCTION

Tendon injuries are a challenge in orthopedic medicine, with an

* Corresponding Authors:

Franciele Dietrich, MSc,
Laboratory of Medical Abilities and
Surgical Research,
School of Medicine,
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul (PUCRS),
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
Tel: +55-51-993323-76
Fax: +55-51-37161599
E-mail: francidi05@gmail.com
Received: Jan. 5, 2015
Revised: March 9, 2015
Accepted: April 2, 2015

102 **Platelet-rich fibrin in tendon healing**

annual incidence estimated at one break per 10,000 people,¹ affecting the whole population and athletes.² Total rupture or accidental tendon transects, generally indicate surgery and ideal surgical approach is to bring the two stumps, accelerating the healing,³ however a long time of immobilization⁴ and recovery⁵ is required. This scenario has prompted the development of research aimed at the improvement and acceleration of the repair and regeneration of injured tendons, and tissue engineering has given rise to a way to accelerate the repair process⁶ for tendons and other tissues, attributing to platelets a promising role, since they play a key role in homeostasis.⁷

Platelet-rich plasma (PRP) is a plasma volume with a high platelet count,⁸ and it is known to have high concentrations of different growth factors,^{9,10} Therefore, it is seen as a natural source of growth factors, with easy acquisition and low cost.¹¹ Several studies have demonstrated the efficacy of PRP in the repair and regeneration of various tissues¹²⁻¹⁵ including tendons.¹⁶⁻¹⁸ In contrast, other studies have not shown the clinical superiority of PRP in the repair or regeneration tissues such as nerves¹⁹ and tendons.^{20,21}

Platelet-rich fibrin (PRF) consists of a concentrate of autologous platelets on a fibrin membrane without added external factors²² and has a high potential for tissue repair.^{23,24} In angiogenesis, PRF acts in stimulation phase, then occurring vascular growth and increased collagen synthesis throughout fibroblast proliferation.²⁵ So, its use has been proposed as a strategy to enhance the cellular response to tendon injury and the quality of repair.²⁶ The aim of this study was to compare the effect of PRP and PRF in repair of rat Achilles tendon injuries.

MATERIALS AND METHODS

Animal Model

Fifty-four adult male Wistar rats, weighing approximately 280 g, were used in this study. Achilles tendon (AT) was transected in forty-eight rats, and the six remaining animals were used as blood donors to obtain PRP and PRF. All the procedures carried out and listed below were previously approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (no. 10/00191 CEUA-PUCRS) and all efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. The

animals were maintained in ventilated racks under controlled temperature (22°C) and with a 12 h light/dark cycle.

The rats were anesthetized with ketamine hydrochloride (Dopamin®, Cristália, São Paulo, Brazil 60 mg.kg⁻¹ of animal weight) and meperidine (Dornot®, União Química, São Paulo, Brazil 20 mg.kg⁻¹) both given intramuscularly (IM) in the left hind leg. The right hind leg was shaven, and the AT was then exposed. Using a surgical microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), the AT was cut transversely in the middle portion, and the two severed ends were ligated with a Kessler-type suture,²⁷ using mononylon 7-0 (Ethicon® Somerville, Johnson and Johnson, São Paulo, Brazil).

At the lesion site, immediately following suturing, 50 µL²⁸ of the treatments related to each experimental group (n=16) were applied: PRP, PRF and control (saline). The skin was sutured, using Vicryl 5-0 (Ethicon®, Johnson and Johnson, São Paulo, Brazil). Ketoprofen (Cetoprofen®, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, Brazil 5 mg/kg, I.M.) was administered subcutaneously once daily for 3 days as analgesic and anti-inflammatory. The assessments were performed at 14 (n=8) and 28 days (n=8) for each group, following euthanasia performed by intra-cardiac injection with a lethal dose of thiopental (Thiopental, Cristália, São Paulo, Brazil). The AT injured area was removed for histological evaluation.

Platelet-Rich Plasma Preparation

Blood was collected into a syringe containing acid citrate dextrose anticoagulant (ACD Solution A-Becton Dickinson, NJ, USA) from donor animals via cardiac puncture. The blood sample was centrifuged (Centrifuge Centribio-80-2B, Rio de Janeiro, Brazil) twice²⁹ at 250 g for 10 minutes and then 1000 g for 10 minutes. The platelets were obtained in high concentration (600 µL, PRP). A 50-µL portion of PRP was activated with calcium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) plus thrombin and applied to each lesion. The platelet count was determined with an automatic blood counter (Vet Abc Plus+Horiba Medical, Gurnee, IL, USA).

Platelet-Rich Fibrin Preparation

The blood used to obtain the PRF was collected without addition of anticoagulant and was submitted to one centrifugation, at

400 g for 10 minutes.²⁴ The PRF membrane was immediately withdrawn from the tube and separated from the remaining blood. A platelet count was obtained and a 50- μ L volume of PRF was applied to the lesion.

Histological Analysis

The tissues removed were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, dehydrated, cleared in xylene and embedded in paraffin. Two longitudinal sections (4 μ m) were made from the peripheral and central areas of each animal. The depth of the cut was established after the block was sectioned 15 times. It was selected 9 representative fields from each section in hematoxylin-eosin (HE) and Sirius red staining (SRS). Three blind observers examined each histologic parameter independently.

SRS was visualized under polarized light microscopy (Zeiss Axioskop 40 optical Cool SNPAP™ Pro cf, Göttingen, Germany) and used to quantify the different types of collagen present in the AT: yellowish-red color associated with thick type I collagen fibers and greenish color with thin type III collagen fibers.³⁰ Pixel counts were obtained from the three selected fields for each animal (both central and peripheral) and converted to percentages. All histological images were analyzed with Image Pro Plus® 4.5.1 software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). HE was used to determine qualitatively vascular proliferation, mononuclear and polymorphonuclear cells, and fibroblastic and epithelial cells, which were visualized by light microscopy.

Statistical Analysis

The quantitative results were expressed as mean \pm standard error (SE), and analyzed by one-way ANOVA and two-way repeated measures followed by Bonferroni *post hoc* test, using the software Graph Pad Prism (La Jolla, CA, USA). The significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Platelet Count

The platelet count in whole blood ranged from 286,000 to 502,000/ μ L. The platelet count in the PRP group increased up to 12 times (2,616,000 to 4,080,000/ μ L) corresponding to increased platelet aggregation (676 to 1136%). The leukocyte count also increased in PRP

group (36 to 125%). In the PRF, the platelet count decreased, ranging from 14,000 to 55,000/ μ L.

Sirius Red Staining

The intra-group analysis for the two types of collagens showed no significant difference with regard to the central and peripheral cuts, at either evaluation time ($p \geq 0.05$) (Figure 1). Thus, central and peripheral cuts were joined to analysis. In relation to type I collagen area, post-hoc analysis identified a statistical difference only between the control and PRP groups at 14 days after treatment ($p = 0.01$). Comparisons at 28 days indicated no statistically significant difference between all groups (control, PRP and PRF) ($p > 0.05$) (Figure 2).

The same analysis was performed for type III collagen and showed statistical difference between the PRP and control groups ($p = 0.034$) at 14 days. However, there was no significant difference between the control and PRP groups at 28 days. At both times, there was no significant difference between the control and PRF groups or between the PRF and PRP groups ($p > 0.05$) (Figure 2).

Comparing type I collagen areas at the two times (14 and 28 days), a statistical difference was noticed in the control ($p = 0.01$) and PRF ($p < 0.05$) groups. The PRP group remained stable for the collagen type I and III indices over time. However, only the PRF group showed a statistical difference both to type I as to type III collagen indices between the two evaluated time periods ($p < 0.05$) (Figure 3), and this can also be checked in the SRS images (Figure 4). Checking this information, there was a significant type I collagen increase and a type III collagen decrease in PRF group over time, suggesting a better healing process.

Hematoxylin-Eosin Staining

Hematoxylin-eosin staining confirmed the quantitative data previously obtained (Figure 5).

Histological analysis showed no difference between the groups at either time (14 or 28 days) with regard to the central and peripheral cuts. Qualitatively, the cellularity level showed to be similar in the PRP and control groups at 14 days. The PRP group displayed an active granulation tissue and large hemorrhagic area. However, the PRF compared to the control group showed an advanced process of neovascularization and a reduced inflammatory infiltrate, without the presence of granuloma. A qualitative difference

104 Platelet-rich fibrin in tendon healing

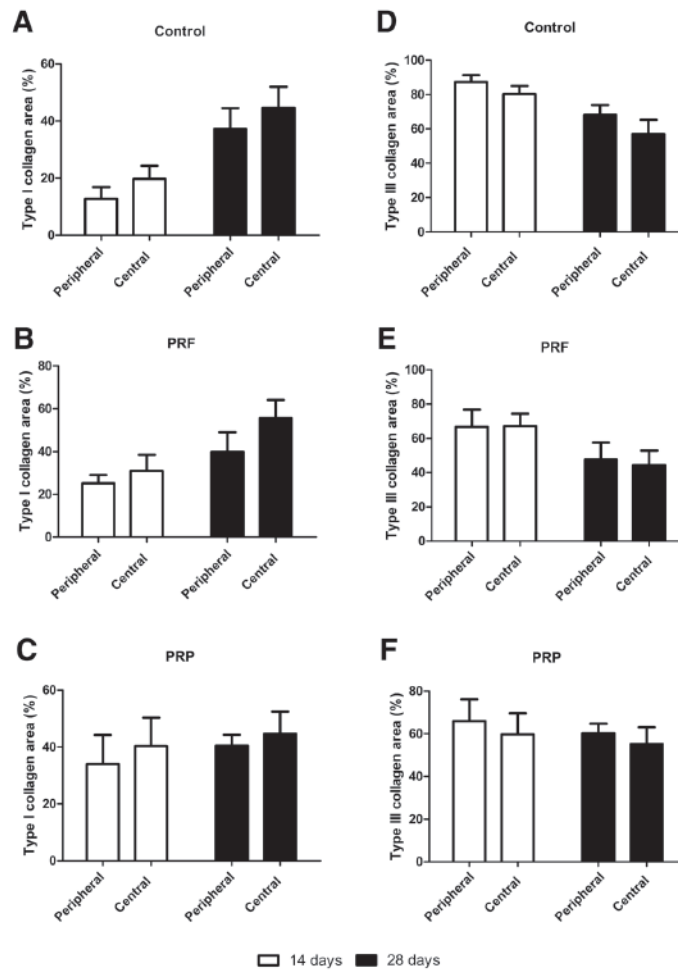


Fig. 1. Central and peripheral analysis of type I collagen (A, B, C) and type III collagen (D, E, F) at 14 and 28 days (n=8).

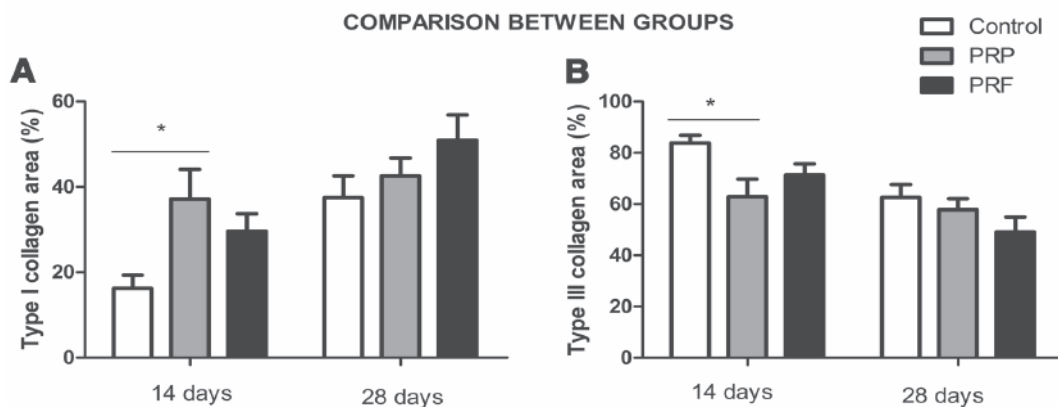


Fig. 2. Comparison between type I and III collagen areas in different groups at 14 and 28 days. * p < 0.05 (n=8).

was observed between the PRP and PRF groups: the first group showed tissue disorganization, an abundant inflammatory infiltrate, hemorrhagic area and mononuclear and polymorphonuclear

cells, while the formation of new vessels was more prevalent in the latter.

At 28 days, despite the hemorrhagic area in the PRP group, comparison with the control

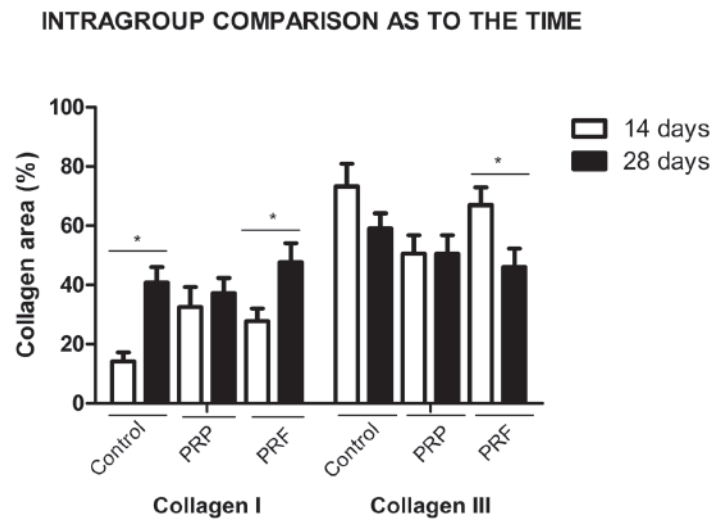


Fig. 3. Intragroup comparison as to time and area of type I and III collagen. * $p < 0.05$ ($n=8$).

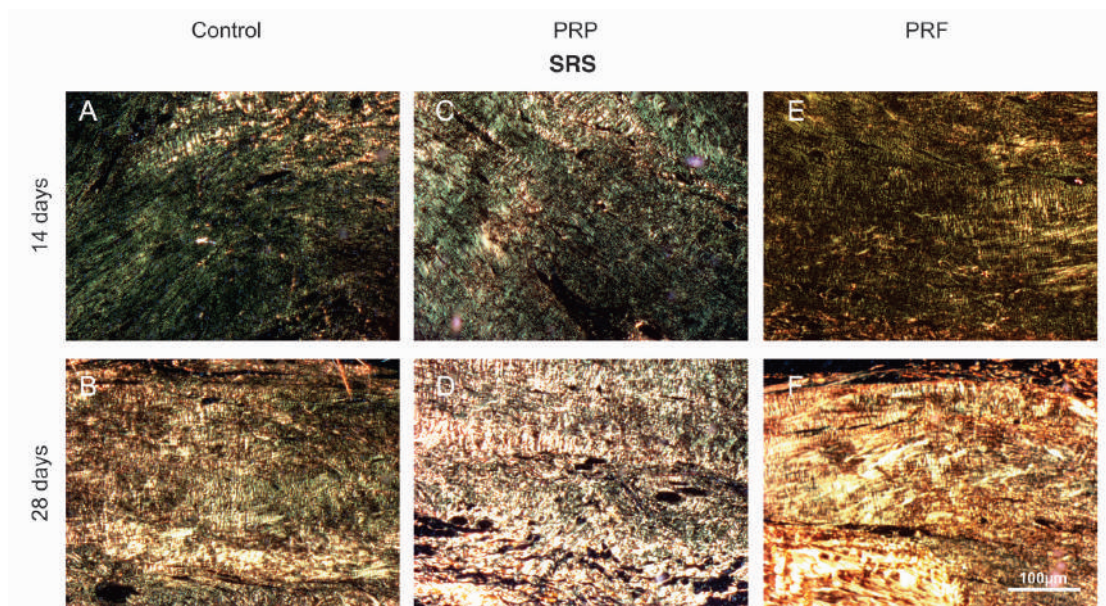


Fig. 4. Images captured with Sirius red staining (SRS) in a longitudinal section after treatments, at 14 (A, C, E) and 28 (B, D, F) days. Magnification: X50 Bar: 100 μm .

group showed microscopic similarities: an enhanced cellularity with a substantial amount of young fibroblasts, less collagen fibers, fibrocytes and fibrosis. On comparing the three groups, a qualitative difference was observed in the PRF group, as it showed a more organized tissue, a large number of fibrocytes and a low amount of fibroblasts, characterizing a partially healed tissue. On the basis of the presence of different cell types, the number of blood vessels and the arrangement of collagen fibers at 14 and 28 days, it can be indicated that there was a more

progressive tissue repair in the PRF and control groups than in the PRP group (Figure 5).

DISCUSSION

There have been published studies aimed at improving tissue repair in tendon injuries, since tendon has a low capacity for regeneration due to low oxygenation and nutrition.³⁰ It is known that tendon repair is not controlled by a single growth factor, but rather it requires the interaction of various factors.³¹ The true effectiveness is

106 Platelet-rich fibrin in tendon healing

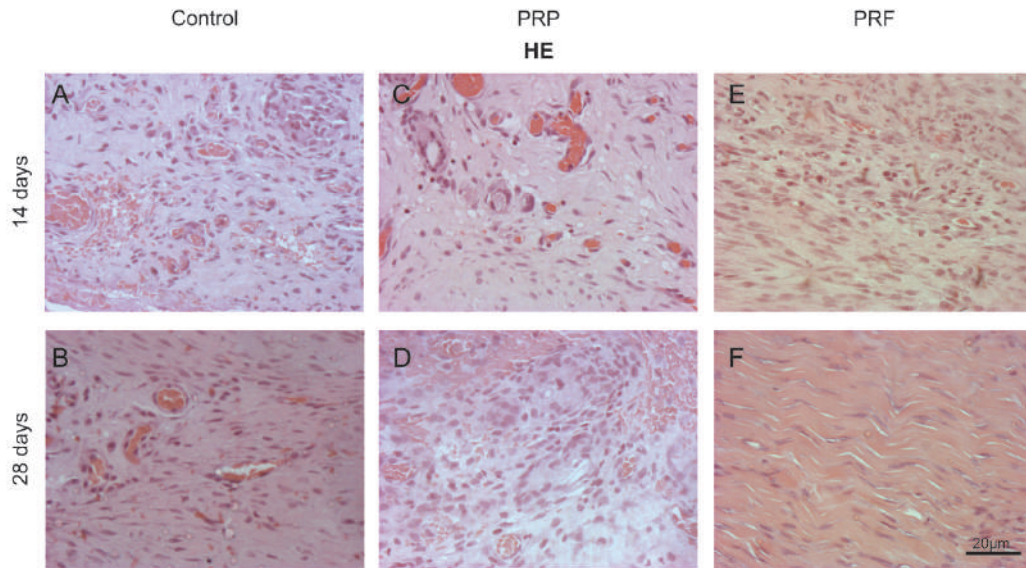


Fig. 5. Images captured with Hematoxylin-eosin (HE) in a longitudinal section after treatments, at 14 (A, C, E) and 28 (B, D, F) days. Magnification: X200 Bar: 20 μm .

dependent on their concentration,³² prompting the evaluation of two different platelet concentrates in order to obtain a suitable concentrate for a quicker tendon repair and regeneration. However, to the best of our knowledge, there are no studies available in the current literature that evaluated and compared the effect of PRP and PRF on tendon regeneration.

Marx and coworkers (1998)³³ proposed that PRP must have an increased platelet count of more than 338%, with basal concentrations of 300,000 platelets/ μL ,³⁴ which is considered an ideal number for treatment with beneficial effects.³⁵ In our study, the platelet count average in PRP reached 906.26% compared to the average basal count. At low concentrations (<1,000,000 platelets/ μL), PRP has less notable effects, and paradoxically, at high concentrations (>1,000,000 platelets/ μL), it seems to exert an inhibitory effect.³² According to Marx (2001),⁸ the concentration of platelets used as reference for the therapeutic use of PRP is 1,000,000 platelets/ μL ; we used this platelet count in our study.

Even though there are studies showing enhanced regeneration and repair in tendinopathy,¹⁶ the true effectiveness of PRP is still controversial.³³ Our study showed that the use of PRP, when applied immediately after the lesion, is not effective in accelerating the regeneration process of the AT in rats. Unlike PRP, PRF (a natural part of fibrin) is prepared

usually without the addition of thrombin, which may protect growth factors from proteolysis.³⁶ Therefore, it is possible to suggest that PRF had a continuous action, noted by a presenting no significant improves in AT repair after 14 days.

The PRF production protocol is an attempt to accumulate platelets and release cytokines in a clot fibrin²³ so the basal count must be diminished. Our data support these precepts, showing a suppression of platelets in the fibrin clot ranging from 89.04 to 95.10% of the theoretical basal concentrations in whole blood. Growth factors present in the fibrin clot are incorporated during the process of polymerization within the platelets and fibrin.²³ These factors have controlled effects, since they are gradually released over the time.³⁷

The number of fibroblasts and the proliferation of new vessels decreases, while the extracellular matrix deposition increases in the healing process.³⁸ Hence, it was possible to notice that after 28 days, only the PRF group (Figure 1) exhibited a vascular regression. At 14 days, the lesion site was highly vascularized. According to Abbas (2008),³⁸ growth factors stimulate the proliferation of some cells and inhibit others, and thus, depending on their concentrations, they can have opposite effects in the same cell. These concentrations were not measured in this study, so this missing information could have explained the inefficacy of PRP. The growth factors involved in tissue repair are synthesized

by leukocytes recruited and activated at the injury site, as part of the inflammatory process.³⁸ Prior to PRP treatment, the blood cell counts showed an increase of 33 to 125% in leukocytes in relation to whole blood, suggests the presence of growth factors within PRP prepared by our group, excluding the possibility of a lack of effect of PRP on tendon a more organized tissue, a more organized tissue repair.³⁸

Autologous PRF has been proposed to improve the cellular response to tendon injury as well as the quality of repair,²⁵ corroborating with the analyses of our study. We demonstrated that the PRP and the control group showed similar effects in rat AT regeneration at 28 days in relation to collagen type I and III areas (Figure 2 and 4), while the PRF treatment accelerated the healing process since the type I collagen area was greater than in the other groups at 28 days, although without significance (Figure 2).

The PRF treatment showed a delay in the peak of growth factor release of over 14 days, compared to PRP. PRF showed a release peak after 14 days, where levels remained higher than in the PRP group,³⁸ explaining the stagnation of the appearance of type I collagen at 28 days in the PRP group. Thus, the data demonstrated that the PRF group had a tendency toward enhanced healing, since the type I collagen area was greater at 28 days when compared to the PRP and the control groups, although without significance. The PRP group at 14 days demonstrated a greater type I collagen area and smaller type III collagen area, significantly different compared to the control group (Figure 2). However, at 28 days, the type III collagen area remained the same as at 14 days in the PRP group (Figure 3), explained by the massive and uncontrollable effect in the short term, in which the release of growth factors peaks on the first day, resulting in rapid collagen polymerization because of the high thrombin levels.²³

On the basis of microscopic analysis with H&E (Figure 5), the PRF group demonstrated better healing at both assessment times, compared to the PRP and the control groups, where the latter groups showed no difference. In addition, hemorrhagic areas were noted in the PRP group at both times and in the control group at only 14 days.

Type I and III collagen are the main components of the extracellular matrix in tendons, corresponding to 65-95% and 10% of

the composition, respectively. The synthesis of type III collagen increases during the early repair stages, and it is believed that when it decreases, type I collagen is synthesized and organized.³⁹ The intra-group analysis with SRS (Figure 3), at 14 and 28 days, showed a significant difference in the PRF group between type I and III collagen areas ($p < 0.05$), similar to the normal tendon healing. The same occurred with type I collagen in the control group ($p < 0.05$). On the contrary, type I and III collagen areas in the PRP group at 14 and 28 days did not differ significantly, explaining the delayed healing. Our findings allowed us to conclude that PRF has a trend towards improvement and acceleration of healing when compared to PRP, in an animal model of AT repair. It is possible to suggest the use of PRF may be a promising alternative in orthopedic surgery, although further experiments are required to support our results.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) for financial support. Dr. A. Leyva helped for English editing of this manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Suchak AA, Bostick G, Reid D, Blitz S, Jomha N. The incidence of Achilles tendon ruptures in Edmonton, Canada. *Foot Ankle Int* 2005;**26**:932-6.
- Kannus P, Natri A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scand J Med Sci Sports* 1997;**7**:107-12.
- Chan BP, Amann C, Yaroslavsky AN, Title C, Smink D, Zarins B, Kochevar IE, Redmond RW. Photochemical repair of Achilles tendon rupture in a rat model. *J Surg Res* 2005;**124**:274-9.
- Longo UG, Ronga M, Maffulli N. Acute ruptures of the achilles tendon. *Sports Med Arthrosc* 2009;**17**:127-38.
- Majewski M, Widmer KH, Steinbruck K. Achilles tendon ruptures: 25 year's experience in sport-orthopedic treatment. *Sportverletz Sportschaden* 2002;**16**:167-73.

108 Platelet-rich fibrin in tendon healing

- 6 Scutt N, Rolf CG, Scutt A. Tissue specific characteristics of cells isolated from human and rat tendons and ligaments. *J Orthop Surg Res* 2008;**3**:32.
- 7 Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res* 2008;**19**:42-6.
- 8 Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;**10**:225-8.
- 9 Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;**58**:297-300.
- 10 Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995;**13**:655-63.
- 11 Maia L, Souza MV, Alves GES, Júnior JIR, Oliveira AC, Silva YFRS, Zandim BM. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultrassonográfica. *Pesq Vet Bras* 2009;**29**:241-45.
- 12 Modarressi A. Platelet rich plasma (PRP) improves fat grafting outcomes. *World J Plast Surg* 2013;**2**:6-13.
- 13 Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br* 2008;**90**:7:966-72.
- 14 Manafi A, Kaviani far K, Moradi M, Manafi A, Manaf F. Effects of Platelet-Rich plasma on cartilage grafts in rabbits as an animal model. *World J Plast Surg* 2012;**1**:91-8.
- 15 Spindler KP, Murray MM, Carey JL, Zurakowski D, Fleming BC. The use of platelets to affect functional healing of an anterior cruciate ligament (ACL) autograft in a caprine ACL reconstruction model. *J Orthop Res* 2009;**27**:631-8.
- 16 Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 2004;**75**:93-9.
- 17 Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;**114**:1502-8.
- 18 Rajabi H, Sheikhani Shahin H, Norouziyan M, Mehrabani D, Dehghani Nazhvani S. The healing effects of aquatic activities and allogenic injection of platelet-rich plasma (PRP) on injuries of achilles tendon in experimental rat. *World J Plast Surg* 2015;**4**:66-73.
- 19 Piskin A1, Kaplan S, Aktaş A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt HH, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery* 2009;**29**:144-53.
- 20 de Jonge S, de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, Tol JL. One-year follow-up of platelet-rich plasma treatment in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Sports Med* 2011;**39**:1623-9.
- 21 Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med* 2011;**39**:38-47.
- 22 Buchaim, Daniela Vieira. Reparo do nervo facial com sutura epineural térmico-terminal e coaptação com adesivo de fibrina em ratos associado ou não a laserterapia. Diss Universidade de São Paulo.
- 23 Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;**101**:e56-60.
- 24 Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;**101**:e37-44.
- 25 Modarressi A. Platelet rich plasma (PRP) improves fat grafting outcomes. *World J Plast Surg* 2013;**2**:6-13.
- 26 Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007;**35**:245-51.
- 27 Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, Beck J, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plast Reconstr Surg* 2003;**112**:1613-19.
- 28 Virchenko O, Grenegard M, Aspenberg P. Independent and additive stimulation of

- tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop* 2006;**77**:960-6.
- 29 Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, Sakamoto H, Tabata Y, Kawata M, Kubo T. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng* 2007;**13**:147-58.
- 30 Malkusch W, Rehn B, Bruch J. Advantages of Sirius Red staining for quantitative morphometric collagen measurements in lungs. *Exp Lung Res* 1995;**21**:67-77.
- 31 Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther* 1989;**69**:816-25.
- 32 Majewski M, Ochsner PE, Liu F, Fluckiger R, Evans CH. Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *Am J Sports Med* 2009;**37**:2117-25.
- 33 Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004;**34**:665-71.
- 34 Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;**85**:638-46.
- 35 Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;**91**:4-15.
- 36 de Obarrio JJ, Arauz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;**20**:486-97.
- 37 Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen* 2008;**16**:356-63.
- 38 He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;**108**:707-13.
- 39 Abbas AK, Kumar V, Fausto N, Mitchell RN. Robbins Patologia Básica. 8th ed., São Paulo, 2008.

ANEXO 2 - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 5919

Porto Alegre, 6 de novembro de 2014.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "COMPARAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS NO REPARO DO TENDÃO DE AQUILES EM RATOS." coordenado por JEFFERSON LUIS BRAGA DA SILVA. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA

ANEXO 3 - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 103/2014 - CEUA

Porto Alegre, 11 de dezembro de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 14/00426, intitulado **“Comparação do efeito do Plasma rico em plaquetas e fibrina rica em plaquetas no reparo do tendão de Aquiles em ratos”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
160	Ratos	12/2014 – 08/2017

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jefferson Braga Silva
FAMED
Neste Hospital



Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

**ANEXO 4 - DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DE
TESE DE DOUTORADO**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

DECLARAÇÃO

Declaramos que em 12 de setembro de 2016, no Curso de Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Clínica Cirúrgica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, foi realizado o Exame de Qualificação da tese intitulada **"EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO REPARO DO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS"** de autoria da pós-graduanda **Franciele Dietrich** sob orientação do **Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva**. A comissão examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Eduardo Goldani, Dr. Jorge Antonio Pastro Noronha, Dr. Lucio Sarubbi Fillmann e Alexandre Voltobel Padoin (Suplente). A aluna foi **APROVADA**.

Porto Alegre, 24 de abril de 2017.

Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

PUCRS ESCOLA DE
MEDICINA

Av. Ipiranga, 6681 – Predio 60 – Hospital São Lucas | CEP 90610-000 | Porto Alegre, RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3318 - Fax: (51) 3320-3316 | E-mail: medicina-pg@pucrs.br | www.pucrs.br/medicina

ANEXO 5 - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM CUIDADOS ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE LINKÖPING NA SUÉCIA.**Komplettering till ansökan dnr 15-15 (inkom 2015-03-25)**

Antalet djur som räknas upp (1200 st.) stämmer inte överens med antalet som söks (1500 st.). Förklara/justera.

Svar: vi ändrar till 1200.

Träning: vad menas med tidigare rutiner?

Svar: Illa formulerat, vi menar enligt samma rutiner som vi använt i tidigare studier.

Har råttorna tränats på löpband innan ingreppet med senan?

Svar: Ja, de får träna under en vecka före ingreppet, för att vänja sig vid löpbandet.

Hur motiveras djuren att gå på löpbandet?

Svar: De brukar gå spontant. Vi står bredvid hela tiden. Vid behov kan man puffa på dem lite med handen. Elstimulering eller annan smärtstimulering används inte.

Gör en schematisk sammanställning: vad kan de olika djurindivider utsättas för?

Svar: Sen-avskärning 1200, avlastning med botox 500, avlastning med gips 100, avlastning med både gips och botox 80, avlastning med botox och nålstick, 150. Behandling med läkemedel (med eller utan avlastning) 400, blodprovstagning (med eller utan övriga behandlingar) 200.

Linköpings djurförsöksetiska nämnd

Beslutsbilaga

Ansökan: dnr 15-15

Projektets titel: Stimulering och hämning av senläkning rått

Beredningsgruppens förslag till nämndens ställningstagande

Beredningsgruppen föreslår att ansökan

- Godkänns
 Godkänns efter komplettering
 Avslås
 Annat:

Motivering: Under förutsättning att sökanden kompletterar sin ansökan med tillfredställande svar anser beredningsgruppen att förutsättningar föreligger att godkänna ansökan.

2015-03-24

Datum

Ronny Idstrand

Underskrift

Ronny Idstrand

Namnförtydligande

Den djurförsöksetiska nämndens beslut

Om inte annat sägs i beslutet gäller detta under fem år från dagen för beslutet.

Nämnden beslutar att ansökan

- Godkänns
 Godkänns med följande villkor
 Avslås
 Bordläggs
 Avskrivs

Nämndens beslutar att fastställa försökets svårhetsgrad till

- Ringa svårhet
 Måttlig svårhet
 Avsevärd svårhet
 Terminal
 Terminal/organ

Nämnden fastställer avgiftsbeloppet till

- 1 500 kr
 3 000 kr
 6 000 kr

2015-04-01

Datum

Ronny Idstrand

Underskrift

Ronny Idstrand

Namnförtydligande

Anexo 6 - Estado de Saúde dos Ratos SOPF, Procedentes 8D

ANEXO 6 - ESTADO DE SAÚDE DOS RATOS SOPF, PROCEDENTES DA INSTALAÇÃO NOMEADA 8D.



scientificsupport@janvier-labs.com
Tel. : +33 (0)2 43 02 11 91

CONTRÔLE SANITAIRE HEALTH MONITORING REPORT

Espèce : Rat SOPF
Species: Rat SOPF

LIGNEE / STRAIN SPRAGUE DAWLEY - RjHan:SD		* Le délai entre le prélèvement et le résultat validé est compris entre 1 et 3 semaines selon la méthode * The time between sampling and valid result is 1 to 3 weeks depending on analysis method.			
UNITÉ DE PRODUCTION / BARRIER 8D-1		Confidential Document- Disclose in whole or in part of this document is strictly prohibited without the prior written consent of J.			
	Fréquence des contrôles Test frequency	Date du dernier prélèvement * Date of last sampling*	Derniers résultats Last results number positive / number tested	Laboratoire Laboratory	Méthode Test method
BACTÉRIE et CHAMPIGNONS / BACTERIA and FUNGI					
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
CAR bacillus	Annually	07/12/2015	0 / 6	BD	ELISA
<i>Clostridium piliforme</i> (tyzzer)	12 weeks	29/02/2016	0 / 6	BD	IFA
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
Dermatophytes	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Lesion/Culture
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Annually	07/12/2015	0 / 6	BD	IFA
<i>Helicobacter</i> spp	12 weeks	29/02/2016	Negative (pool)	BD	PCR
<i>Klebsiella oxytoca/pneumoniae</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
Microorganismes associés à des lésions	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	12 weeks	29/02/2016	0 / 6	BD	IFA
<i>Pasteurellaceae</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Actinobacillus</i> spp.	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Haemophilus</i> spp.	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Mannheimia haemolytica</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Pasteurella</i> spp.	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Pasteurella multocida</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Pasteurella trehalosi</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Pneumocystis</i> spp.	6 months	12/04/2016	0 / 6	IDEXX	PCR
<i>Proteus</i> spp (<i>mirabilis</i> , <i>vulgaris</i>)	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Salmonella</i> spp.	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 weeks	19/04/2016	0 / 6	IDEXX / INOVALYS	PCR / Culture
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Streptococci</i> β -hemolytic					
<i>Streptococci</i> β -hemolytic groupe A	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Streptococci</i> β -hemolytic groupe C	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Streptococci</i> β -hemolytic groupe G	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Culture
ENDOPARASITES / ENDOPARASITES					
<i>Protozoa</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
<i>Entamoeba</i> spp	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
Flagellates	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
<i>Coccidia</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
<i>Helminths</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
Cestodes	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
Nematodes	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
ECTOPARASITES / ECTOPARASITES					
<i>Acariens / Mites</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
Acariens du pelage / Fur-dwelling mites	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
Acariens d'environnement / Surface-dwelling mites	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
Acariens folliculaires/ Follicle-dwelling mites	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
<i>Poux / Lice</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M
<i>Puces / Fleas</i>	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	OD/M

Anexo 6 - Estado de Saúde dos Ratos SOPF, Procedentes 8D

LIGNEE / STRAIN SPRAGUE DAWLEY - RjHan:SD		* Le délai entre le prélèvement et le résultat validé est compris entre 1 et 3 semaines selon la méthode. * The time between sampling and valid result is 1 to 3 weeks depending on analysis method.			
UNITÉ DE PRODUCTION / BARRIER 8D-1		Confidential Document- Disclose in whole or in part of this document is strictly prohibited without the prior written consent of J.			
	Fréquence des contrôles Test frequency	Date du dernier prélèvement * Date of last sampling*	Derniers résultats Last results number positive / number tested	Laboratoire Laboratory	Méthode Test method
EXAMEN NÉCROPSIQUE / NECROPSICAL EXAMINATION					
Pathology associated to histopathological lesions observed	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	LDA	Ob/Hist
VIRUS / VIRUSES					
Rat coronavirus (RCV/SDAV Sialodacryoadenitis)	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	BD	IFA
Hantaviruses	Annually	07/12/2015	0 / 6	BD	IFA
Mouse adenovirus (MAD) type 1 (FL)	Annually	07/12/2015	0 / 6	BD	IFA
Mouse adenovirus (MAD) type 2 (K87)	Annually	07/12/2015	0 / 6	BD	IFA
Rat parvoviruses	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	BD	IFA
Kilham rat parvovirus (KRV)	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	BD	IFA
Rat Minute virus	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	BD	IFA
Rat parvovirus (RPV)	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	BD	IFA
Toolan's H-1 virus	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	BD	IFA
Pneumonia virus of mice	12 weeks	29/02/2016	0 / 6	BD	IFA
Reovirus type 3 (Reo 3)	Annually	07/12/2015	0 / 6	BD	IFA
Sendai virus	12 weeks	29/02/2016	0 / 6	BD	IFA
Theiler-like virus ('Rat Theilovirus')	6 weeks	11/04/2016	0 / 6	BD	IFA
Commentaires : / Comments:					

Abcd... : contrôle supplémentaire à la liste SPF / additional test to SPF list

ABREVIATIONS POUR LES LABORATOIRES : / ABBREVIATIONS FOR LABORATORIES:

BD : BioDoc Hannover - Dr Michael Mähler - HANNOVER - Deutschland
 IDEXX : IDEXX BioResearch Europe - LUDWIGSBURG - Germany
 LDA : Laboratoire Départemental d'Analyse de la Mayenne - 53000 LAVAL - France
 LF : Laboratoire à façon interne- JANVIER LABS - 53940 LE GENEST ST ISLE - France
 QM : QM Diagnostics - NIJMEGEN - The Netherlands

ABREVIATIONS POUR LES METHODES : / ABBREVIATIONS FOR METHODS:

CM : Coloration de Mann / Mann coloration
 IFA : Immunofluorescence assay
 HAI : Test d'inhibition d'hémagglutination / Inhibition of the hemagglutination
 ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
 Enzym. : taux enzymatique / Enzyme rate
 MIA : Multiplex Immuno Assay
 Ob/Hist : Observation clinique + histopathologie si lésion / Clinical observation + histopathology if lesion
 OD/M : Observation directe et microscopique / Direct microscopic observation
 PCR : Polymerase Chain Reaction

Anexo 6 - Estado de Saúde dos Ratos SOPF, Procedentes 8D

z d'analyse

ANVIER LABS company.

Historique des résultats concernant la souche sur 18 mois Historical results concerning the strain since 18 months

0 / 24

0 / 24
0 / 6
0 / 6
0 / 6
0 / 24
0 / 24
0 / 24
0 / 24
0 / 24
0 / 24
0 / 12
0 / 6
0 / 12
0 / 24

Anexo 7 - Estado de Saúde dos Ratos SPF, Procedentes UP1

ANEXO 7 - ESTADO DE SAÚDE DOS RATOS SPF, PROCEDENTES DA INSTALAÇÃO NOMEADA UP1.



CONTRÔLE SANITAIRE COMPLEMENTAIRE ADDITIONAL HEALTH MONITORING REPORT



Espèce : Rat SPF
Species: Rat SPF

scientificsupport@janvier-labs.com
Tel. : +33 (0)2 43 02 11 91

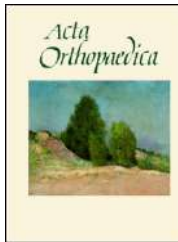
LIGNEE / STRAIN SPRAGUE DAWLEY - RjHan:SD		* Le délai entre le prélèvement et le résultat validé est compris entre 1 et 3 semaines selon la méthode d'analyse * The time between sampling and valid result is 1 to 3 weeks depending on analysis method.			
UNITÉ DE PRODUCTION / BARRIER UPI		Confidential Document- Disclose in whole or in part of this document is strictly prohibited without the prior written consent of JANVIER LABS company.			
	Fréquence des contrôles Test frequency	Date du dernier prélèvement * Date of last sampling*	Derniers résultats Last results number positive / number tested	Laboratoire Laboratory	Méthode Test method
<i>Klebsiella oxytoca/pneumoniae</i>	6 weeks	26/09/2016	Negative	LDA	Culture
<i>Pneumocystis spp.</i>	6 month	12/09/2016	Negative	IDEXX	PCR
<i>Proteus spp (mirabilis, vulgaris)</i>	6 weeks	26/09/2016	Negative	LDA	Culture
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 weeks	26/09/2016	Positive	LDA	Culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 weeks	26/09/2016	Positive	LDA	Culture

ABBREVIATIONS POUR LES LABORATOIRES : / ABBREVIATIONS FOR LABORATORIES:

BD : BioDoc Hannover - Dr Michael Mähler - HANNOVER - Deutschland
IDEXX : IDEXX BioResearch Europe - LUDWIGSBURG - Germany
LDA : Laboratoire Départemental d'Analyse de la Mayenne - 53000 LAVAL - France
LF : Laboratoire à façon interne- JANVIER LABS - 53940 LE GENEST ST ISLE - France
QM : QM Diagnostics - NIJMEGEN - The Netherlands

ABBREVIATIONS POUR LES METHODES : / ABBREVIATIONS FOR METHODS:

CM : Coloration de Mann / Mann coloration
IFA : Immunofluorescence assay
HAI : Test d'inhibition d'hémagglutination / Inhibition of the hemagglutination
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Enzym. : taux enzymatique / Enzyme rate
MIA : Multiplex Immuno Assay
Ob/Hist : Observation clinique + histopathologie si lésion / Clinical observation + histopathology if lesion
OD/M : Observation directe et microscopique / Direct microscopic observation
PCR : Polymerase Chain Reaction

ANEXO 8 - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ACTA ORTHOPAEDICA**Acta Orthopaedica**ISSN: 1745-3674 (Print) 1745-3682 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ior20>**Effect of platelet-rich plasma on rat Achilles tendon healing is related to microbiota****Franciele Dietrich, Malin Hammerman, Parmis Blomgran, Love Tätting, Vinicius Faccin Bampi, Jefferson Braga Silva & Per Aspenberg**

To cite this article: Franciele Dietrich, Malin Hammerman, Parmis Blomgran, Love Tätting, Vinicius Faccin Bampi, Jefferson Braga Silva & Per Aspenberg (2017): Effect of platelet-rich plasma on rat Achilles tendon healing is related to microbiota, Acta Orthopaedica, DOI: [10.1080/17453674.2017.1293447](https://doi.org/10.1080/17453674.2017.1293447)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/17453674.2017.1293447>



© 2017 The Author(s). Published by Taylor & Francis on behalf of the Nordic Orthopedic Federation.



View supplementary material [↗](#)



Published online: 15 Mar 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 419



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ior20>

Download by: [Linköping University Library]

Date: 22 June 2017, At: 02:48

Effect of platelet-rich plasma on rat Achilles tendon healing is related to microbiota

Franciele DIETRICH^{1,2,3}, Malin HAMMERMAN¹, Parmis BLOMGRAN¹, Love TÄTTING¹, Vinicius Faccin BAMPI³, Jefferson Braga SILVA³, and Per ASPENBERG¹

¹ Department of Clinical and Experimental Medicine, Orthopedics, Linköping University, Linköping, Sweden; ² CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília; ³ Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence: per.aspenberg@liu.se

Submitted 2016-09-27. Accepted 2017-01-16.

Background and purpose — In 3 papers in Acta Orthopaedica 10 years ago, we described that platelet-rich plasma (PRP) improves tendon healing in a rat Achilles transection model. Later, we found that microtrauma has similar effects, probably acting via inflammation. This raised the suspicion that the effect ascribed to growth factors within PRP could instead be due to unspecific influences on inflammation. While testing this hypothesis, we noted that the effect seemed to be related to the microbiota.

Material and methods — We tried to reproduce our old findings with local injection of PRP 6 h after tendon transection, followed by mechanical testing after 11 days. This failed. After fruitless variations in PRP production protocols, leukocyte concentration, and physical activity, we finally tried rats carrying potentially pathogenic bacteria. In all, 242 rats were used.

Results — In 4 consecutive experiments on pathogen-free rats, no effect of PRP on healing was found. In contrast, apparently healthy rats carrying *Staphylococcus aureus* showed increased strength of the healing tendon after PRP treatment. These rats had higher levels of cytotoxic T-cells in their spleens.

Interpretation — The failure to reproduce older experiments in clean rats was striking, and the difference in response between these and *Staphylococcus*-carrying rats suggests that the PRP effect is dependent on the immune status. PRP functions may be more complex than just the release of growth factors. Extrapolation from our previous findings with PRP to the situation in humans therefore becomes even more uncertain.

unloaded and increased if the rats were stimulated to increase their physical activity (Virchenko and Aspenberg 2006). These studies were the first to show effects of platelets in tendon healing, and might in part be responsible for the unfortunate surge in clinical use of PRP, especially in sports medicine.

After these studies, we left the PRP field and focused on the role of mechanical stimulation of tendon healing, using the same rat model. A series of experiments showed that mechanical loading strongly increased tendon strength (Eliasson et al. 2012a, Eliasson et al. 2013, Hammerman et al. 2014). A single episode of mechanical loading, sufficient to improve mechanical strength, also activated genes primarily related to inflammation (Eliasson et al. 2012b). The stimulatory effect of loading was evident at an early time point, when the tendon callus largely consists of leukocytes (Blomgran et al. 2016). This suggested that the mechanical improvement after loading was mediated via these leukocytes, i.e. through inflammation. A further indication that inflammation plays a crucial role was the finding that micro-damage caused by needling could substitute for mechanical loading, leading to a similar increase in mechanical strength (Hammerman et al. 2014).

In an attempt to find a “unifying theory” for this model, we speculated that all positive effects on healing are due to inflammation, including the previous positive effects with PRP. In order to show this, we needed to repeat the old PRP experiments. However, it turned out that we were unable to reproduce our previous results. While desperately trying to find what was different between the old successful experiments and the new failing ones, we finally considered the observation that fracture healing in mice is dependent on the bacteriological environment of the breeding facilities (Reinke et al. 2013). Fracture healing is impaired if the immune system has matured as a consequence of bacterial challenges, raising the levels of CD8+ T-cells especially. By coincidence, routine screening of a batch of rats delivered to us showed growth of *Staphylococcus aureus*. These animals were denied access to

We have previously shown that platelet concentrates (platelet-rich plasma (PRP)) can improve tendon healing in a rat Achilles tendon model. This effect was seen after local injection 6 h after tendon transection and also after implantation of a PRP coagulum during surgery (Aspenberg and Virchenko 2004, Virchenko and Aspenberg 2006, Virchenko et al. 2006). The stimulatory effect disappeared if the limb was mechanically

the animal facility. This gave an unexpected opportunity to test the role of the bacteriological status. The rats were transferred to another facility, and then, for the first time, the old effects of PRP appeared again.

Methods

Overview

242 rats were used in 6 experiments. In all experiments, PRP in some form (always 50 μ L) was compared with saline (Table 1). All experiments were evaluated mechanically, using peak force as the primary effect variable. Flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests were performed in complementary experiments. All the surgery, PRP preparation, and injection was performed by FD.

Animals and housing

We used outbred female Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). They were derived from different breeding facilities, one of which had been contaminated with *Staphylococcus aureus*.

The animals were kept in acrylic cages (900 cm²) with not more than 3 animals in each cage, and placed on ventilated racks under controlled humidity (55%) and temperature (22°C) with a 12-hour light-dark cycle. Water and pellets were provided *ad libitum*. All cages were provided with shredded paper, wooden pegs, and hiding places.

Standard treatment

The Achilles tendon was transected in 181 rats weighing on average 245 g (SD 25). The rats were anesthetized with isoflurane gas. Antibiotic was given preoperatively (25 mg/kg oxytetracycline). Analgesics were given subcutaneously pre- and postoperatively (0.045 mg/kg buprenorphine). Surgery was performed under aseptic conditions. The skin on the right lower leg was shaved and cleaned with chlorhexidine ethanol. The tendon complex was exposed through a transverse skin incision lateral to the Achilles tendon. The plantaris tendon was removed and the Achilles tendon was cut transversely in the middle part. The skin was closed with 2 stitches.

PRP (50 μ L) or saline (50 μ L) was injected percutaneously into the tendon defect using a 0.25-mm needle, 6 h after surgery.

Standard preparation of PRP

We used 49 donors. Whole blood was collected from anesthetized rats by cardiac puncture using a 10-mL syringe con-

Table 1. Overview of the experimental groups

Exp.	Rats (SD or W)	Groups	n	Tendon resection	Pooled blood	Irradiation	Contaminated
1	27 SD + 6 W male donors	1. Saline	14	No	–	–	No
		2. PRP + thrombin	13		Yes	Yes	
2	24 SD + 5 SD	1. Saline	12	No	–	–	No
		2. PRP + CaCl ₂	12		No	Yes	
3	20 SD + 5 SD	1. Saline	10	No			No
		2. PRP	10		Yes	No	
4	30 SD + 10 SD	1. Saline	10	3 mm	–	–	No
		2. L-PRP	10		Yes	No	
		3. PRP low	10		Yes	Yes	
5	30 SD + 10 SD	1. Saline	10	2 mm	–	–	Yes
		2. L-PRP	10		Yes	No	
		3. PRP low	10		Yes	Yes	
6	50 SD + 13 SD	1. Saline	25	No	–	–	Yes
		2. PRP	25		Yes	No	

Exp: experiment; SD: Sprague-Dawley; W: Wistar; L-PRP: high-leukocyte PRP; PRP low: low leukocyte concentration.

taining 1.1 mL of sodium citrate (0.13 mol/L) with a 1.2-mm needle. The rats were killed by exsanguination. The blood samples for each experiment were pooled and then centrifuged at 220 \times g for 20 min and then the supernatant at 480 \times g for 20 min. Platelets were counted using a clinical, automatic blood cell counter, and the concentration was adjusted for each experiment. Similarly to the old original experiments, the platelet concentrate was irradiated at 25 Gy to inactivate remaining white blood cells. The volume of PRP injected was always 50 μ L. The PRP was used in less than 6 h and was not activated by added factors.

PRP with high leukocyte content (L-PRP) and standard PRP were prepared. To produce L-PRP, we took all the plasma and the buffy coat, including a small part of the erythrocyte layer for the second centrifugation. To produce standard PRP, we took the plasma and buffy coat, avoiding any part of the erythrocyte layer. After the second centrifugation, only the deepest tenth of the total volume was collected (200–300 μ L). We used plasma to adjust the platelet concentration as necessary.

Variations in the standard procedure

Experiment 1 – All rats were delivered from Taconic (Denmark). Mechanical analysis was performed on day 14 instead of day 11. Blood was collected using citrate phosphonate dextrose anticoagulant (CPD) and the first centrifugation was performed for 40 min. Male Wistar rats were used as blood donors in order to provoke inflammation, by blood incompatibilities. PRP was stored for 24 h at 4°C before use and thrombin (0.20 U; 1 μ L) was used as activator.

Experiment 2 – Donor blood was not pooled, and thus different recipients had different donors. Calcium chloride (0.018 mol/L) was used as activator.

Experiment 3 – PRP was not irradiated, and the concentration of leukocytes was high (L-PRP).

Experiment 4 – We use cages designed for increased physical activity. These cages were larger (1,900 cm²) and were equipped with a second floor. 3 mm of the Achilles tendon was removed. We made 2 PRP groups: L-PRP without irradiation and standard PRP. These rats were checked for pathogen contamination, with negative findings.

Experiment 5 – On arrival, a routine check showed that both treated and donor animals carried *Staphylococcus aureus*. These animals turned out to have come from the same breeder, but from a different breeding house. Due to the positive cultures, the animals were transferred to a less clean animal facility and the cages were not cleaned from the day after surgery. A 2-mm tendon segment was removed. There were 2 PRP groups: L-PRP without irradiation and standard.

Experiment 6 – All rats (donors and treated) came from the breeding house where the animals carried *Staphylococcus aureus* (as confirmed by the breeder) and were taken directly to the less clean facility. The cages were not cleaned from the day after surgery. The PRP was not irradiated.

Evaluation—mechanical testing

11 days after surgery, the rats were anesthetized with isoflurane gas and killed with CO₂. The right Achilles tendon with the calcaneal bone and muscles was harvested. The sagittal and transverse diameter of the midpart of the callus tissue was measured with a slide calliper, and the cross-sectional area was calculated by assuming an elliptical geometry. The distance between the old tendon stumps was measured, as seen through the partly transparent callus tissue. The muscles were scraped off from the tendon, and it was fixed in a metal clamp with sandpaper. The bone was fixed in a custom-made clamp at 30° dorsiflexion relative to the direction of traction in the materials-testing machine (100R; DDL, Eden Prairie, MN). The machine pulled at 0.1 mm/s until failure. Peak force at failure (N), stiffness (N/mm), and energy uptake (Nmm) were calculated by the software of the machine. The investigator marked a linear portion of the elastic phase of the curve for modulus calculation. Peak stress (MPa) and an estimate of Young's modulus (MPa) were calculated assuming an elliptical cylindrical shape and homogenous mechanical properties. All measurements and calculations were carried out by investigators who were blinded (FD, MH, PB).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

In order to confirm that our platelets were not activated before use, we quantified the platelet derived growth factor (PDGF-AB) in the platelet-poor supernatant after the second centrifugation. We similarly analyzed peripheral blood and different preparations of PRP.

We used a rat PDGF-AB ELISA kit (KBB-177; Nordic BioSite AB, Täby, Sweden). 100 µL from the test samples and 100 µL of assay diluent were placed in the wells in duplicate and incubated at 37°C for 90 min. This solution was replaced with 100 µL of biotinylated anti-rat PDGF antibody work-

ing solution and incubated again at 37°C for 60 min. The wells were washed 3 times with 0.01 M Tris-buffered saline, incubated at 37°C for 30 min with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and washed again 5 times with the diluents. Tetramethylbenzidine color-developing agent was added, with incubation at 37°C in the dark for 25 min followed by addition of TMB stop solution. The absorbance at 450 nm was measured with a microplate reader.

Flow cytometry

The spleen from 12 female Janvier Sprague-Dawleys rats was removed under anesthesia as above. 6 rats were derived from the breeding facility that was contaminated with *Staphylococcus aureus*. The other 6 rats were specific opportunistic pathogen-free (SOPF), from the uncontaminated breeding house. The operator (FD) was blinded regarding sample identity during collection of the data and analysis.

Spleens were placed in support buffer (RPMI 1641, 4% fetal bovine serum, 5 mM EDTA, and 25 mM HEPES).

Flow cytometry was performed on a FACS Aria III (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) equipped with a 405-nm, 561-nm, and 633-nm laser. A nozzle of 100 µm was used. Cytometer Setup & Tracking Beads (BD Biosciences) were used to ensure stability of the cytometer. Compensation was performed with cellular controls from rat spleens with the same antibodies as in the experiment.

The spleens were digested with collagenase IV (300 U/mL) and DNase I (300 U/mL) in support buffer containing 20 mM magnesium, for 20 min at 37°C, and then washed (600× g for 6 min at 4°C for all centrifuge steps) and filtered through a 30-µm nylon strainer. The suspension was then washed with staining buffer (Biolegend, San Diego, CA). Zombie Violet and anti-CD6/32 (Biolegend) were added for live/dead discrimination and Fc-blocking. The suspension was incubated in the dark on ice for 20 min. An aliquot of 1/10 (vol/vol) was taken from each suspension of the *Staphylococcus*-carrying rats' spleens to form a pooled sample for "fluorescence minus one" (FMO) gating. This sample was used as FMO for both groups, but the operator did not know the group identity. The remaining 9/10 (vol/vol) of cells from each tissue suspension was divided equally to staining tubes for immunophenotyping.

The antibodies are listed in Table 2 (see Supplementary data). Primary staining was performed in the dark on ice for 30 min. The cells were then washed twice and secondary staining was performed under equivalent conditions. They were then fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, followed by washing twice with staining buffer. Cells were stored at 8°C for 1 day before flow cytometry.

Gating was set by FMO for CD25, as it was continuously expressed. Gatings of discrete antigens were set on population morphology. In all samples, initial gating was done on singlet cells, scatter parameters, live cells, and CD45+ cells to define single living leukocytes. Gating was performed in FlowJo vX.0.7 (Treestar, Ashland, OR).

Table 4. Mechanical evaluation from experiment 5. Values are mean (SD)

	Saline	PRP	Difference, 95% CI expressed as % of saline		
			lower	mean	upper
Peak force	38 (5.8)	44 (10)	0.9	17	33
Peak stress	1.6 (0.4)	2.1 (0.8)	1.6	31	58
Energy uptake	87 (17)	104 (23)	2.3	20	38
Stiffness	5.5 (0.9)	5.9 (1.4)	-7.1	7	24
Cross-sectional area	25 (5.9)	23 (5.1)	-27	-8	10

Statistics

The peak force was the primary dependent variable. Each experiment was first regarded separately, and tested with 1-way ANOVA or Welch's t-test using SPSS version 21. In the first experiments, the null hypotheses could not be refuted. We then tried to improve the experiments to mimic the old original experiments as much as possible, until we arrived at a final version (experiment 4) that we regarded as definite. Although the different experiments all had their own hypothesis, in retrospect we have regarded experiments 1–3 as being explorative and experiment 4 as being the definitive test for the effect on PRP in clean animals. This experiment was then repeated using *Staphylococcus*-carrying rats (experiment 5), and experiments 4 and 5 were compared using 2-way ANOVA with bacterial status and PRP treatment as fixed factors. We then had a new hypothesis, namely that bacterial status would influence the response to PRP (significant interaction). The PRP treatment comprised 2 subgroups, with high or low leukocyte content. As these subgroups did not show any statistically significant differences in any experiment, they were combined to one group in the final analysis.

Having seen a statistically significant interaction between bacterial status and response to PRP according to the pre-specified hypothesis, the study could be regarded as being complete. However, because we found the result to be so important, we repeated experiment 5, just to feel more confident. After this repeat (experiment 6), we entered all experiments (except experiment 1, which had a different healing time) into a 2-way ANOVA with presence of *Staphylococcus* and PRP treatment as fixed factors, specifically looking for an interaction between PRP and bacterial status. This analysis was regarded as the final hypothesis test.

Statistical analysis of flow cytometry was performed in the R programming environment. CD45+/CD3+/CD8a+ in relation to CD45+ was chosen as the primary variable. Clean and *Staphylococcus*-carrying rats were compared using the Mann-Whitney U-test.

Ethics

All procedures were approved by the regional ethics committee (entry no. 15-15).

Results

16 rats were excluded due to technical problems at mechanical testing. 11 of these belonged to experiment 6 (5 PRP, 6 saline). Thus, 165 rats were tested successfully.

Platelet and leukocyte counts

The standard PRP had a platelet concentration at least 5 times higher than that of peripheral blood, and it was possible to have either a high or a low leukocyte count (Table 3, see Supplementary data).

able to have either a high or a low leukocyte count (Table 3, see Supplementary data).

PDGF-AB quantification

ELISA revealed PDGF-AB concentrations in the supernatant plasma samples (n = 4) below the level of detection (0.03 ng/mL). In inactivated PRP, the PDGF-AB concentration was 7.3 µg/mL (SD 6.0; n = 4). This confirms that the PRP production process did not cause activation and loss of growth factors into the supernatant.

Mechanical analysis

Experiments 1–4 failed to show any statistically significant effect of PRP on peak force. None of the experiments showed a significant difference between high and low leukocyte content of the PRP, and these groups were therefore combined to a single PRP group. A 2-way ANOVA of all experiments showed a significant variation in peak force between different experiments (p = 0.001), but there was no effect of PRP. The group mean difference between PRP and saline had a 95% confidence interval (CI) of -4.3 to 2.7 N, corresponding to -10% to 6% of control mean (p = 0.9), indicating that any meaningful effect could be excluded.

The first experiment on *Staphylococcus*-carrying rats showed increased peak force by 17% (p = 0.04), but also increased peak stress and energy uptake (Table 4).

Comparing experiment 4 (the "final" clean experiment) and experiment 5 (*Staphylococcus*), there was an interaction between bacterial status and PRP treatment (p = 0.03) (Figure 1). There was also an interaction for peak stress (p = 0.003) and cross-sectional area (p = 0.03), but not for stiffness (p = 0.2).

The sixth, confirmatory experiment on *Staphylococcus* carriers showed an increased peak force by 16%, but this time it was not statistically significant (p = 0.1).

The ANOVA on all experiments with an 11-day duration showed an interaction between the effects of bacterial status and PRP on peak force (p = 0.003). Post hoc, we also analyzed peak stress, stiffness, and cross-sectional area, which showed similar interactions (p < 0.001, p = 0.01, and p = 0.05) (Figure 2).

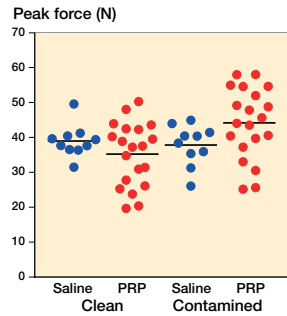


Figure 1. Peak force for contaminated and uncontaminated rats using PRP or saline as treatment (groups 4 and 5). Contaminated means carrying *Staphylococcus aureus*.

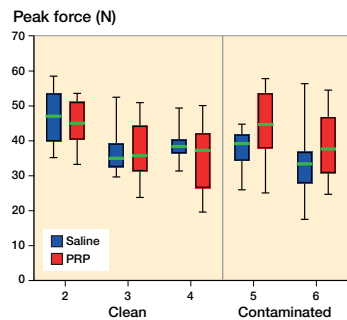


Figure 2. Peak force for saline (blue) and PRP (red) groups in 11-day experiments. The graph shows median, interquartile range, and total range (whiskers). Contaminated means carrying *Staphylococcus aureus*.

Flow cytometry

The CD45 labeling failed for unknown technical reasons, so we used live/CD3+/CD8a+ in relation to live cells instead. The ratio of CD3+/CD8a+ cells was higher in the pathogen-free rats (Mann-Whiney test, $p = 0.03$). The CD3+/CD4+/CD8a+ (double-positive T-cells) was severalfold higher in the pathogen-free rats (Mann-Whitney test, $p = 0.009$) (Figure 3).

Discussion

The clinical experience with PRP is disappointing (Schepull et al. 2011, de Vos et al. 2014), and there is no convincing evidence for a positive effect on clinical tendon healing, tendinopathy, or enthesis problems—despite the fact that some papers have claimed so (Aspenberg and Ranstam 2014). We therefore set out to show that the stimulatory effects of PRP on tendon healing in our model were due to perturbation of the inflammatory reaction after trauma, making them less relevant to the human situation. Initially, we were unable to reproduce our old results. We prepared to report this failure, but then a new hypothesis emerged: we learned that bacteriological breeding conditions, reflected by presence of CD8 T-cells, had

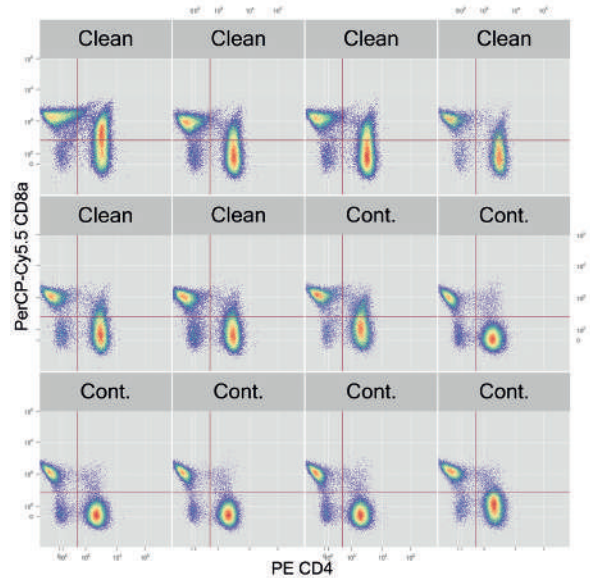


Figure 3. T-cells in all samples. In some samples, the CD4+ cells can be seen to have a tail upwards, indicating double positivity for CD4 and CD8a. Cont. means carrying *Staphylococcus aureus*.

a strong influence on fracture healing in mice (Reinke et al. 2013). We could then show that the effect of PRP was indeed linked to inflammation: The effect was dependent on bacteriological breeding conditions, and appeared to be related to the prevalence of CD8a T-cells.

A recent overview has shown that microbiota or the combination of host and microbial genomes influences many organs in laboratory animals, and that this is dependent on factors such as bacterial environment, diet, temperature, and breeding conditions (Stappenbeck and Virgin 2016). Thus, it is not surprising that animal experiments with 10 years between them can yield different results.

Laboratory animals raised under pathogen-free conditions are thought to have an immune status that is rather irrelevant to adult humans, who have been exposed to a large number of infections (Beura et al. 2016). It has been claimed that important experimental results from modern animal facility conditions should be confirmed in animals with a more microbiologically experienced immune system, before any inferences regarding humans are drawn (Stappenbeck and Virgin 2016). It is therefore tempting to suggest that our results from *Staphylococcus*-carrying rats might be more relevant to humans.

On the other hand, the role of the immune status in the present study suggests that the mechanisms of action are more complex than previously thought. PRP has been described as a cocktail of growth factors that simply accelerate growth. This theory is refuted by our failure to produce an effect in clean animals, in which we can readily accelerate healing by load-

ing or trauma (Aspenberg and Virchenko 2004, Virchenko and Aspenberg 2006, Virchenko et al. 2006, Hammerman et al. 2014). The facts that the early tendon callus consists mainly of leukocytes, and that other means of stimulating healing have strong effects on inflammation-related genes and leukocyte composition, also make a direct growth factor effect unlikely. A new model to explain the effect of PRP in tendon healing requires that inflammation is taken into account in ways that we do not know. This makes it difficult to translate results in our model to humans.

A weakness of this study is that the positive response to PRP in the *Staphylococcus* carriers was not confirmed, even though the interaction between bacterial status and PRP was highly significant. The rats were not randomized between bacterial contamination or not, as this was the result of different breeding conditions, but the breeder took measures to keep the different breeding houses genetically similar. The analysis of CD8a T-cells was less comprehensive than that of Reinke et al. (2013), and differences between mice and rats preclude direct comparisons. Still, the immune system in the contaminated and the pathogen-free rats was clearly different.

This is the first study to suggest a possible interaction between microbiota and tendon healing. The effect of PRP in human conditions remains dubious.

Supplementary data

Tables 2 and 3 are available as supplementary data in the online version of this article <http://dx.doi.org/10.1080/17453674.2017.1293447>.

FD and PA planned the study with some contributions from JBS and VFB. FD, MH, and PB conducted the animal experiments. LT analyzed and interpreted the flow cytometry. PA and FD did the data analysis and wrote the manuscript.

We conducted this study during a scholarship supported by CAPES—the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil, at Linköping University.

The study was funded by the Swedish Research Council (VR 02031-47-5), Centrum för idrottsforskning, Linköping University, and Östergötland County Council.

No competing interests declared.

- Aspenberg P, Ranstam J. Platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: letters to the editor. *Am J Sports Med* 2014; 42 (1): NP1-2.
- Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop* 2004; 75 (1): 93-9.
- Beura L K, Hamilton S E, Bi K, Schenkel J M, Odumade O A, Casey K A, Thompson E A, Fraser K A, Rosato P C, Filali-Mouhim A, Sekaly R P, Jenkins M K, Vezys V, Haining W N, Jameson S C, Masopust D. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* 2016; 532 (7600): 512-6.
- Blomgran P, Blomgran R, Ernerudh J, Aspenberg P. A possible link between loading, inflammation and healing: Immune cell populations during tendon healing in the rat. *Sci Rep* 2016; 6: 29824.
- de Vos R J, Windt J, Weir A. Strong evidence against platelet-rich plasma injections for chronic lateral epicondylar tendinopathy: a systematic review. *Br J Sports Med* 2014; 48 (12): 952-6.
- Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P. Achilles tendon healing in rats is improved by intermittent mechanical loading during the inflammatory phase. *J Orthop Res* 2012a; 30 (2): 274-9.
- Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P. Influence of a single loading episode on gene expression in healing rat Achilles tendons. *J Appl Physiol* (1985) 2012b; 112 (2): 279-88.
- Eliasson P, Andersson T, Hammerman M, Aspenberg P. Primary gene response to mechanical loading in healing rat Achilles tendons. *J Appl Physiol* (1985) 2013; 114 (11): 1519-26.
- Hammerman M, Aspenberg P, Eliasson P. Microtrauma stimulates rat Achilles tendon healing via an early gene expression pattern similar to mechanical loading. *J Appl Physiol* (1985) 2014; 116 (1): 54-60.
- Reinke S, Geissler S, Taylor W R, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, Dahne M, Hartwig T, Akyuz L, Meisel C, Unterwalder N, Singh N B, Reinke P, Haas N P, Volk H D, Duda G N. Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci Transl Med* 2013; 5 (177): 177ra36.
- Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med* 2011; 39 (1): 38-47.
- Stappenbeck T S, Virgin H W. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science. *Nature* 2016; 534 (7606): 191-9.
- Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop* 2006; 77(5): 806-12.
- Virchenko O, Grenegard M, Aspenberg P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop* 2006; 77 (6): 960-6.

Supplementary data**Table 2. Details of antibodies used in this study, and flow cytometer setup**

Antigen	Fluorochrome	Stock Clone	[] (g/L)	Mirror:filter	CAT#	LOT#
CD45	PE-Cy7	OX-1	0.2	735LP:780/60	202214	B151577
CD3	AF647	1F4	0.5	--660/20	201408	B152236
CD4	PE	OX-35	0.2	--582/15	203308	B140103
CD8a	PerCP	OX-8	0.2	502LP:675/20	201712	B140789
CD25	Biotin	OX-39	0.5	--	202111	B152501
Biotin	Streptavidin-BV510	N/A	0.1	502LP:510/50	405233	B164013

[]: concentration; CAT#: catalog number; LOT#: lot number.

Table 3. Concentration of platelets and leukocytes in each experiment. PRP/WB means ratio

Exp.	Platelets ($\times 10^9/L$)	PRP/WB	Leukocytes ($\times 10^9/L$)	Leukocytes: PRP/WB
1	3,400	5.1	0.7	-0.2
2	5,230	11	5.8	1.4
3	3,285	7.8	20	3.5
4	3,170	8.5	L-PRP = 21 7	L-PRP = 5.0 1.7
5	3,190	7.5	L-PRP = 23 11	L-PRP = 4.7 2.2
6	3,190	7.5	9.6	2.3

PRP: platelet rich plasma; WB: whole blood.