

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA**

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA  
RICO EM PLAQUETAS E FIBRINA RICA EM  
PLAQUETAS NO REPARO DO TENDÃO DE  
AQUILES EM RATOS**

**FRANCIELE DIETRICH**

**PORTO ALEGRE**

**2012**

---

**FRANCIELE DIETRICH**

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E FIBRINA  
RICA EM PLAQUETAS NO REPARO DO TENDÃO DE AQUILES EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

**Orientador**

**Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva**

**Co-orientador**

**Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva**

**PORTO ALEGRE**

**2012**

---

---

## FICHA CATALOGRÁFICA

D566c Dietrich, Franciele  
Comparação do efeito do plasma rico em plaquetas e fibrina rica em plaquetas no reparo do tendão de Aquiles em ratos / Franciele Dietrich.  
- Porto Alegre : PUCRS, 2012.

104 f. : il. graf. tab. Inclui um artigo científico para submissão à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga Silva.  
Co-orientador: Dr. Vinícius Duval da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA. 2. PLASMA.  
3. PLAQUETAS. 4. RATOS. 5. TENDÃO DO CALCÂNEO. I. Silva, Jefferson Braga. II. Silva, Vinícius Duval. III. Título.

C.D.D. 616.75  
C.D.U. 616.75:611-018.5(043.3)  
N.L.M. WE880

---

***Dedicatória,***

*A minha mãe Soeli Fernandes Dietrich que me mostrou o caminho do conhecimento,*

*Ao meu pai Lírio Dietrich que me fez compreender a importância de o tê-lo,*

*A minha irmã, Fabrícia Dietrich que sempre esteve presente em todos os momentos.*

*A Fiona e Mel, que a cada abanar de rabinho me animavam.*

*E ao meu grande amor, Jean Zagonel, por me manter nessa incessante busca pelo*

*aperfeiçoamento!*

---

---

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Jefferson Braga Silva** que oportunizou a ampliação dos meus conhecimentos na área da pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Vinícius Duval**, por sempre estar disposto a me auxiliar e repassar todos os seus conhecimentos.

A **CAPES**, pela concessão da bolsa parcial do meu curso de Mestrado.

A minha irmã, **Fabírcia Dietrich**, por ser meu apoio moral, intelectual e emocional durante estes dois anos de pós graduação.

Ao amigo **Gustavo Lançanova Duré** pelo seu talento na condução das técnicas cirúrgicas e comprometimento inigualável.

A amiga **Caroline Peres Klein** que esteve presente em todas as fases de concretização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica, **Gilmar P. Moreira** e **Juliana O. Rangel** pela dedicação.

A amiga **Juliana Oliveira Rangel** pela amizade, estímulo e confiança.

A **Prof. Dra. Laura Botafogo Oliveira**, pela disposição e dedicação.

Ao técnico do Laboratório de Histologia **Thiago Giulianni** pelo apoio na confecção das lâminas.

As amigas do curso de Mestrado **Fernanda Camargo**, **Fernanda P. Moraes**, **Márcia Donadussi** e **Milene Puffal**, por acreditarmos juntas que tudo isso é possível.

Aos amigos que conquistei durante estes dois anos de curso **Alessandra Sebben**, **Alice C. Pellizari**, **Ana Paula Schmidt** e **Vinícius F. Bampi** que muitas vezes, mesmo sem saber contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos tios **Diane** e **Sedinei Fernandes** e priminho **Matheus** por sempre estarem por perto quando necessário.

E a todos os colegas da **Liga de Pesquisa Cirúrgica** e do **Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica** pelos momentos de aprendizagem que foram compartilhados.

---

---

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar e comparar o efeito do uso de plasma rico em plaquetas (PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF) no reparo do tendão de Aquiles (TA) de ratos.

**Material e Métodos:** Foram utilizados 48 ratos machos adultos distribuídos randomicamente em três grupos experimentais: PRP, PRF e Controle (solução salina 0,9%). Uma incisão longitudinal de 3 cm foi realizada na perna direita de cada rato, a fim de expor o TA. Posteriormente, fez-se uma ruptura horizontal no mesmo, sendo a reparação realizada com sutura do tipo Kessler, onde na sequência foi aplicado 50 µL do tratamento em questão. Passados 14 e 28 dias pós-operatório, a parte segmentada do TA foi removida, inicializando assim o processo histológico (Hematoxilina/Eosina; Picrosírius Red) para obtenção de resultados. Os dados obtidos foram expressos ao nível de 5% de significância ( $p < 0.05$ ) com média  $\pm$  EP.

**Resultados:** Ao comparar os três grupos entre si, quanto ao tempo e área de colágeno tipo I e III, houve diferença estatística somente entre o grupo Controle (16.22%) e o grupo PRP (37.16%) aos 14 dias após o tratamento, não sendo observada diferença estatisticamente significativa nos outros grupos. Da mesma forma, quando comparados intra-grupos em 14 e 28 dias, o grupo PRF apresentou diferença significativa para colágeno I (27.76% e 47.74%) e III (66.94% e 46%) respectivamente. Grupo Controle demonstrou diferença significativa para colágeno tipo I (14.20% e 40.90%), não sendo observada qualquer diferença significativa no grupo PRP. Quando avaliados na coloração Hematoxilina e Eosina, PRP e Controle apresentaram-se semelhantes nos tempos avaliados, diferindo apenas quanto a presença de hemorragia, que foi mais expressa no grupo PRP. Já o grupo PRF demonstrou-se mais organizado, principalmente no tempo de 28 dias quando comparado aos outros dois tratamentos.

**Conclusão:** Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a Fibrina Rica em Plaquetas tem tendência a promover a regeneração acelerada do tendão de Aquiles de ratos, trazendo perspectivas promissoras para futuras utilizações na clínica.

**Palavras-chaves:** reparação tecidual; fatores de crescimento; lesão; tendão; plasma rico em plaquetas; fibrina rica em plaquetas.

---

---

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate and compare the effect of using Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in the repair of the Achilles tendon (TA) of rats.

**Material and Methods:** Forty-eight adult male rats randomized into three experimental groups: PRP, PRF and Control (saline 0.9%). A 3 cm longitudinal incision was made in the right leg of each rat in order to expose the TA. Later, it was a break in the same horizontal, and the repair performed with suture Kessler-type, when the sequence was applied 50  $\mu$ L of the treatment in question. After 14 and 28 days postoperatively, the targeted part of the TA was removed, thus initializing the histological processing (Hematoxylin/Eosin; Sirius Red) to obtain results. The data obtained were expressed at 5% significance level ( $p < 0.05$ ) with mean  $\pm$  SE.

**Results:** When comparing the three groups together, as to time and area of collagen type I and III, only statistical difference between the control group (16.22%) and the PRP group (37.16%) at 14 days after the treatment, no statistically significant difference was observed in the other groups. In the same way, when compared within groups of 14 and 28 days, the PRF group showed a significant difference for collagen I (27.76% and 47.74%) and III (66.94% and 46%) respectively. Control group showed significant difference in collagen type I (14.20% and 40.90%), not observed any significant difference in the PRP group. When evaluated on Hematoxylin/Eosin staining, PRP and control were similar in the times studied, differing only in the presence of hemorrhage, that was more expressed in the PRP group. Already the group PRF has shown to be more organized, especially in time of 28 days compared to the other two treatments.

**Conclusion:** The data from this study suggest that the Platelet-Rich Fibrin tends to promote the accelerated regeneration of the Achilles tendon of rats, bringing promising prospects for future use in the clinic.

**Keywords:** tissue repair, growth factors, injury, tendon, platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin.

---

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b> Esquema representativo dos grupos animais de acordo com o período de avaliação.....	28
<b>FIGURA 2:</b> Fração resultante da segunda centrifugação. Nota-se pequena quantidade de hemácias na porção inferior do tubo que foram em sua maioria cuidadosamente retiradas.....	29
<b>FIGURA 3:</b> Fração de PRP.....	30
<b>FIGURA 4:</b> Membrana de PRF.....	31
<b>FIGURA 5:</b> Posicionamento dos animais no período cirúrgico.....	32
<b>FIGURA 6:</b> Exposição do TA direito do rato.....	33
<b>FIGURA 7:</b> Modelo de ruptura.....	33
<b>FIGURA 8:</b> Exemplo de captura de imagens em 50X e em 200X no grupo experimental PRF em corte longitudinal profundo.....	38
<b>FIGURA 9:</b> Programa Image Pro Plus 4.5.1® utilizado para demarcar e diferenciar os tipos de colágeno na coloração Picosírius Red.....	40
<b>FIGURA 10:</b> Aumento utilizado no programa Image Pro Plus 4.5.1® para minuciosa busca por coloração.....	40

---



---

<b>FIGURA 11:</b> Verificação quantitativa dos tipos de Colágeno I e III presente nos tratamentos em questão.....	41
<b>FIGURA 12:</b> Computação dos dados provenientes do Programa Image Pro Plus 4.5.1 <sup>®</sup> .....	42
<b>FIGURA 13:</b> Cálculo amostral realizado para a obtenção de um número de animais adequado para os experimentos desenvolvidos nesta pesquisa.....	43
<b>FIGURA 14:</b> Gráfico comparativo entre o número de plaquetas do sangue total (Whole Blood - WB) e nos tratamentos autólogos ( Autologous Treatment - AT).....	45
<b>FIGURA 15:</b> Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental Controle: Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; área hemorrágica; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório. Aumento: 200X.....	47
<b>FIGURA 16:</b> Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental Controle. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório; Granuloma. Aumento: 200X.....	48
<b>FIGURA 17:</b> Imagens capturadas em corte longitudinal aos 14 dias - Grupo experimental PRP. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; área hemorrágica; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório; Granuloma. Aumento: 200X.....	49
<b>FIGURA 18:</b> Imagens capturadas em corte longitudinal aos 28 dias - Grupo experimental PRP. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; área hemorrágica; fibroblastos com núcleo	

---

---

vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório; Granuloma. Aumento: 200X.....50

**FIGURA 19:** Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental PRF. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; fibrilas de colágeno; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares. Aumento: 200X.....51

**FIGURA 20:** Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental PRF. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; fibrilas de colágeno; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares. Aumento: 200X.....52

**FIGURA 21 -** Análises superficiais e profundas do colágeno de tipo I (A, B, C) e do colágeno de tipo III (D, E, F) no tempo de 14 e 28 dias.....54

**FIGURA 22:** Gráficos de comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 *versus* 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo I. \*  $p < 0.05$ .....55

**FIGURA 23:** Gráfico de comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 *versus* 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo III. \*  $p < 0.05$ .....56

**FIGURA 24:** Captura de imagens na coloração Picrosírius nos tempos de 14 (A, B e C) e 28 dias (D, E e F), sendo A e C correspondente ao grupo Controle, B e E ao grupo PRP e C e F referentes ao grupo experimental PRF. Aumento de 50X.....57

**FIGURA 25 –** Comparação entre as áreas de colágeno do tipo I nos diferentes grupos tratados nos tempos 14 e 28 dias. \*  $p < 0.05$ . Controle, PRP e PRF,  $n = 7$ .....58

**FIGURA 26 –** Comparação entre as áreas de colágeno do tipo III dos diferentes grupos tratados nos tempos 14 e 28 dias. \*  $p < 0.05$ . Controle e PRP,  $n = 7$ . PRF,  $n = 8$ .....59

---

---

**FIGURA 27** – Comparação intra-grupos quanto ao tempo e área de colágeno I em III nos grupos. \*  $p < 0.05$ . Controle e PRP, n = 7. PRF, n = 8.....60

---

---

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Quantidade individual de leucócitos/ $\mu\text{L}$ presentes no sangue total e no PRP e o incremento de leucócitos (%) no PRP.....	45
<b>TABELA 2:</b> Quantidade individual de plaquetas/ $\mu\text{L}$ presentes no sangue total e no PRP e o incremento plaquetário (%) no PRP.....	46
<b>TABELA 3:</b> Quantidade individual de plaquetas/ $\mu\text{L}$ presentes no sangue total e no PRF e a supressão plaquetária (%) no PRF.....	46
<b>TABELA 4</b> – Comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 <i>versus</i> 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo I. * $p < 0.05$ .....	55
<b>TABELA 5</b> – Comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 <i>versus</i> 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo III. * $p < 0.05$ .....	56

---

---

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

/	Por
<	Maior
≠	Diferença
=	Igual
>	Menor
±	Mais ou menos
§	Parágrafo
®	Marca registrada
μL	Microlitro
ACD	Ácido citrato dextrose
AT	Autologous Treatment
C	Concentração
Ca Cl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
cm	centímetros
DP	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento epitelial
<i>et al</i>	E demais
FC	Fator de crescimento
g	Gramas
G	Gravidade
GDF	Fator de crescimento diferenciado
h	Hora
IGF	Fator de crescimento insulino dependente
IM	Intramuscular
Kg	Kilograma
mg	Miligrama
min	Minuto

---

---

<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetro
<b>ms</b>	Milissegundo
<b>n° ou N</b>	Número
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PPP</b>	Plasma pobre em plaquetas
<b>PRF</b>	Fibrina rica em plaquetas
<b>PRP</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>PUCRS</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>TA</b>	Tendão de Aquiles
<b>TGF</b>	Fator de crescimento transformador
<b>™</b>	Trademark
<b>V</b>	Volume
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial
<b>WB</b>	Whole Blood
<b>X</b>	Vezes
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>βFGF</b>	Fator de crescimento básico de fibroblastos
<b>γ</b>	Lambda
<b>δ</b>	Delta

---

---

## SUMÁRIO

<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Plasma Rico em Plaquetas.....	21
1.2 Fibrina Rica em Plaquetas.....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Delineamento.....	27
4.2 Animais e grupos de experimentação.....	27
4.3 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas.....	28
4.4 Obtenção da Fibrina Rica em Plaquetas.....	31
4.5 Procedimento cirúrgico.....	31
4.5.1 Procedimento anestésico.....	32
4.5.2 Técnica cirúrgica.....	32
4.5.3 Pós operatório.....	34
4.5.4 Eutanásia.....	34
4.6 Análises histológicas.....	34
4.6.1 Fixação das amostras.....	34
4.6.2 Confeção das lâminas histológicas.....	36

---

---

4.6.3	Colorações.....	36
4.6.3.1	Coloração Hematoxilina e Eosina.....	37
4.6.3.2	Coloração Picrosírius Red.....	37
4.7	Análise das Imagens.....	37
4.7.1	Histomorfometria.....	38
4.7.1.1	Coloração Hematoxilina e Eosina.....	38
4.7.1.2	Coloração Picrosírius.....	39
4.8	Estatística.....	42
4.9	Aspectos Bioéticos.....	43
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1	Clínicos e Cirúrgicos.....	44
5.2	Contagem Plaquetária.....	44
5.3	Histomorfometria.....	46
5.3.1	Coloração Hematoxilina e Eosina.....	46
5.3.2	Coloração Picrosírius Red.....	53
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética para o uso de animais da PUCRS.....</b>	<b>104</b>

---



## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

Formado por tecido conjuntivo denso, o tendão é 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<sup>33</sup>.

O tendão é 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<sup>80</sup>. Segundo Khan *et al.* (1999)<sup>58</sup>, os tendões normais são brancos, possuem aspecto brilhante e textura fibroelástica, demonstrando desta forma, grande resistência a cargas mecânicas<sup>58</sup>.

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<sup>82</sup>. Além destes constituintes, estão presentes ainda aproximadamente 2% de elastina<sup>39,55</sup> e, conforme Ahtikoski *et al.* (2003)<sup>6</sup>, uma pequena quantidade de colágeno tipo IV<sup>6</sup>.

Na síntese de colágeno, a enzima lisil oxidase converte determinados grupos de lisina e hidroxilisina em aldeídos, que espontaneamente formam ligações cruzadas que estabilizam as fibras colágenas<sup>62</sup>. Colágeno tipo I e III são os principais componentes da matriz extracelular em tendões<sup>89</sup>. Para que o reparo do tendão ideal seja realizado, requer-se concomitantemente elevada expressão de colágeno tipo I<sup>67</sup>.

As fibras colágenas dos tendões estão dispostas de maneira a oferecer máxima resistência às forças que atuam sobre o tecido<sup>53</sup>. Em função disso, tais fibras são organizadas

---

longitudinalmente, transversalmente e horizontalmente, com fibrilas de colágeno longitudinais, formando assim, cordões espirais.

Tal estrutura possibilita ao tendão grande capacidade de equilibrar forças longitudinais, transversais, horizontais e rotacionais durante todas as atividades e movimentos<sup>52</sup>. As fibrilas de colágeno são cristalinas e longas e nos tendões em regra são extremamente alinhadas para que haja a integridade estrutural e funcional normal do tecido<sup>14</sup>.

Mesmo parecendo ser uma ocorrência rara, a ruptura no tendão de Aquiles tornou-se o tipo mais comum de lesão relacionada ao esporte, tendo uma incidência anual estimada em 1 ruptura a cada 10.000 pessoas<sup>94</sup>, sendo considerado um crescente problema não só para atletas, mas também para toda a sociedade<sup>54</sup>.

O suprimento vascular do tendão, mais especificamente no tendão intra-sinovial, é significativamente reduzido após ruptura<sup>77,45</sup>.

Conforme Enwemeka (1989a)<sup>32</sup>, a cicatrização primária 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.

Conforme a autora, tal tempo é de extrema valia para que o tendão adquira a resistência necessária a fim de transmitir de maneira eficaz a força gerada por seu músculo homônimo. Concomitantemente a esse período, é realizada a imobilização do tendão por meio de gesso<sup>32</sup>.

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, que prejudicam a reabilitação motora<sup>34</sup>. Além disso, a imobilização inibe a circulação sanguínea e a regeneração nervosa no local da lesão, que são processos vitais para que ocorra uma cura eficaz<sup>10</sup>.

O tendão imobilizado, duas semanas pós-ruptura, impede o processo de cicatrização, acarretando uma baixa produção de fatores de crescimento, proteínas, colágenos e, posteriormente, reduzidas propriedades biomecânicas do tecido<sup>17,102</sup>.

Em ratos o tendão intacto é praticamente desprovido de fibras nervosas e vasos sanguíneos, que estão localizados no paratenon, em torno do tecido conjuntivo. Porém, após a lesão, novos vasos sanguíneos e fibras nervosas aparecem no tendão lesionado, fornecendo fatores de crescimento (FC) e liberando diferentes mediadores neuronais, vitais para o reparo<sup>4,5</sup>.

---

Patologias tendíneas ocorrem constantemente na medicina ortopédica, onde ruptura total e transecções acidentais do tendão geralmente indicam a prática cirúrgica<sup>19</sup>.

Abordagens cirúrgicas ideais para o reparo de tendão são realizadas a fim de aproximar as duas extremidades, acelerando, assim, a cicatrização<sup>19</sup>. Nas rupturas no tendão de Aquiles, não somente naquelas tratadas cirurgicamente, é necessário um período de imobilização<sup>63</sup>.

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 do tendão, sendo que estas não produzem a ligação de extremidades rompidas a nível molecular<sup>19</sup>.

Apesar dos avanços no tratamento da ruptura do tendão de Aquiles, como sutura percutânea<sup>96,67</sup> ou tratamentos funcionais, o tempo de recuperação ainda é longo e as taxas de re-ruptura são substanciais<sup>68</sup>.

De acordo com Goffi (1996)<sup>46</sup>, existe uma intensa preocupação em relação às lesões tendíneas em cirurgias reconstrutivas, pois quando há uma sutura pode haver, como já citado anteriormente, aderência, impedindo assim, a sua recuperação completa<sup>46</sup>.

Tendões lesados por processos de cicatrização da ferida típicos incluem a infiltração inflamatória, proliferação celular e alteração dos fenótipos de colágeno<sup>104</sup>.

Conforme estudo experimental realizado por Eliasson *et al.* (2009)<sup>31</sup>, em ratos, o terceiro dia após a lesão corresponde à fase inflamatória, sendo os dias 8 e 14 referentes à fase proliferativa e dia 21 de remodelação, sendo a inflamação a primeira etapa do processo de cicatrização dos tecidos colágenos<sup>31</sup>.

A cicatrização do tendão é promovida quando FC atuam diretamente nas células alvo presentes no local lesionado. Em modelos animais foi demonstrada a expressão temporal super regulada de diversos FC e de seus receptores durante o processo de cicatrização do tecido tendíneo<sup>16,27</sup>. Além disso, a cicatrização do tendão também é sensível a FC<sup>3,20,60,73,79,103</sup>.

Após a lesão, as plaquetas liberam as proteínas bioativas e os FC necessários para o início e ativação da cascata de coagulação, acelerando assim a cicatrização e a regeneração. 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<sup>98</sup>. Além disso, esta possui muitas propriedades biológicas em comum com FC, tais como quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e macrófagos<sup>23</sup> e estimulação da

---

proliferação de fibroblastos<sup>13</sup>. A trombina é uma protease serina, sendo responsável pela transformação do fibrinogênio em fibrina<sup>98</sup>.

Uma característica nova e interessante sobre a função fisiológica das plaquetas é o seu papel como “veículo” para o transporte local de FC na cicatrização das feridas<sup>9</sup>. Em locais de lesão vascular, as plaquetas se aderem e se agregam, gerando trombina, o que desencadeia a produção de uma matriz de fibrina do fibrinogênio<sup>83</sup>.

Em resumo, os estágios que visam alcançar o reparo tecidual em consequência de um dano baseiam-se em: agregação, ativação plaquetária e subsequente degranulação; atividade inflamatória; deposição de matriz; síntese de colágeno; contração do local lesado; epitelização; e remodelamento<sup>38</sup>.

Os FC derivados das plaquetas são responsáveis por induzir a neovascularização e quimiotaxia de fibroblastos, estimulando assim a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno<sup>37,22,69,2,104</sup>.

O FC vascular endotelial (VEGF) é um estimulador endógeno da angiogênese e auxilia no aumento da permeabilidade vascular<sup>40,49</sup>. Já o fator de crescimento diferenciado (GDF-5), um membro da superfamília do FC transformador (TGF), foi mostrado para acelerar a cicatrização do tendão em vários modelos animais<sup>11,41,79</sup>.

Atualmente, o grande impedimento para o sucesso da cicatrização é a biologia. Aprimoramento do processo de reparo usando FC como papéis documentados, pode auxiliar na regeneração do tecido funcional, ao contrário do tecido cicatricial<sup>29</sup>.

Portanto, segundo CHAN *et al.* (2005)<sup>19</sup>, estratégias que visam aumentar a resistência mecânica do tendão rompido após reparação incluem geralmente a suplementação exógena de FC<sup>19</sup>.

Conforme Sanchez *et al.* (2007)<sup>83</sup>, o suprimento de sangue é insuficiente e a renovação celular limitada. Além disso, a lesão no tendão de Aquiles 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, sendo seguidas pela remodelação e maturação, durante a qual o tendão finalmente deve recuperar sua resistência mecânica<sup>83</sup>.

---

Conforme Zhang *et al.* (2003)<sup>104</sup>, 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.

Contudo, esta situação pode ser aperfeiçoada através da utilização da engenharia de tecidos, acelerando assim o processo de reparação do mesmo<sup>87</sup>, atribuindo-se as plaquetas uma linha promissora, já que estas possuem um papel fundamental na homeostasia e uma fonte natural de FC<sup>95</sup>.

### **1.1 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<sup>43</sup>.

Constituindo aproximadamente 55% do volume de sangue total, o plasma, constituinte líquido do sangue contém além de eletrólitos e íons, moléculas protéicas, tais como albumina, globulinas e fibrinogênio. Compostos orgânicos como lipídios, vitaminas, hormônios, aminoácidos e co-fatores também estão presentes no plasma, que na coagulação, integram-se ao coágulo<sup>42</sup>.

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares arredondados, derivadas dos megacariócitos da medula óssea com vida útil variando de 7 a 10 dias<sup>38</sup>. No seu interior encontram-se depósitos de glicogênio, peroxissomos e três tipos de grânulos: alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) e lambda ( $\gamma$ ) (lisossomos)<sup>42</sup>.

Um vasto número de moléculas bioativas pode ativar as plaquetas, sendo a trombina o mais poderoso ativador. A trombina é uma protease serina, sendo uma das responsáveis para que ocorra a coagulação sanguínea, bem como pela transformação de fibrinogênio em fibrina<sup>98</sup>.

A trombina tem muitas propriedades biológicas em comum com os FC, tais como quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e macrófagos<sup>23</sup> e estimulação da proliferação fibroblástica<sup>93</sup>.

Em estudos *in vitro*, a forma mais comum de ativação das plaquetas, é adicionar trombina e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ). A trombina ativa diretamente as plaquetas e o  $\text{CaCl}_2$  atua antagonizando o efeito do anticoagulante presente na amostra<sup>35</sup>.

---

As plaquetas, uma vez ativadas, passam pelo processo de agregação, liberando FC e proteínas bioativas necessários para o início e aceleração do reparo e regeneração após a lesão<sup>98,38</sup>.

O plasma rico em plaquetas é um volume de plasma com alta concentração plaquetária<sup>72</sup>, podendo conter de 3 a 5 vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos normais<sup>70,47,57</sup>.

Partindo-se do princípio que o sangue normal possui entre  $150.000 \pm 350.000 \mu\text{L}$  por mL e em média 200.000 de plaquetas por microlitro, conforme Marx (2004)<sup>71</sup>, a eficácia clínica do PRP pode ser esperada a um aumento mínimo de 4 vezes a linha de base, ou seja, 1 milhão de plaquetas por  $\mu\text{L}$ .

O PRP é extraído do sangue total autólogo e é conhecido por possuir diferentes tipos de FC em altas concentrações<sup>61,91</sup>, sendo considerado, portanto, uma fonte natural de FC, de fácil aquisição e de baixo custo associado<sup>66</sup>.

A porção referida como PRP contém, além da alta concentração plaquetária, os leucócitos, pequena quantidade de plasma e de eritrócitos<sup>70</sup>. Este desempenha um importante papel na reparação tecidual devido à sua ação mitogênica, quimiotáxica e neovascular<sup>66</sup>.

Dentre os FC inseridos no PRP, pode-se citar: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF $\alpha\alpha$ , PDGF $\beta\beta$  e PDGF $\beta\alpha$ ); fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta_1$  e TGF $\beta_2$ ); fator de crescimento vascular endotelial (EGF); fator de crescimento epitelial (EGF)<sup>72</sup>, estando o TGF $\beta_1$  e PDGF em altas concentrações<sup>36</sup>.

Uma vez desenvolvido o PRP, ele permanece estável e estéril no estado anticoagulado por um período de 8 horas<sup>72</sup>.

Diversos estudos têm demonstrado a efetividade do PRP no reparo e regeneração de diversos tecidos, como osso<sup>50,56</sup>, cartilagem<sup>7</sup>, tendão<sup>12,98,36</sup> e ligamentos<sup>74,92</sup>.

Porém, estudos recentes estão explanando que o PRP, apesar de todas as suas propriedades não demonstra superioridade clínica no reparo ou regeneração de alguns tecidos, como tendão<sup>28,85</sup> e nervo<sup>78</sup>.

---

## 1.2 Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

A Fibrina rica em plaquetas foi descrita pela primeira vez na França por Choukroun *et al.* (2000)<sup>26</sup> e colaboradores. Ela consiste em um concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com elevado potencial de reparação tecidual<sup>30,25</sup>.

O PRF é formado por uma matriz de fibrina polimerizada em uma estrutura tetramolecular com a incorporação de plaquetas, leucócitos, citocinas e de células tronco circulantes<sup>30</sup>, sendo obtida a partir de sangue autólogo e sem adição de fatores externos<sup>97</sup>.

Devido à ausência de anticoagulante, a cascata de coagulação passa a ser ativada rapidamente, bem como a síntese de trombina, induzindo a formação de fibrina e ativação das plaquetas. Um coágulo de fibrina é obtido no meio do tubo, depositando-se entre a camada inferior (eritrócitos), e superior (plasma acelular) do tubo<sup>25</sup>.

O PRF tem sua origem na polimerização natural, progressiva e relativamente lenta, a qual ocorre durante sua centrifugação e permite a incorporação aumentada de citocinas circulantes nos emaranhados de fibrina<sup>48</sup>, conferindo à sua membrana uma arquitetura fisiológica favorável para suportar o processo de cura tecidual<sup>30</sup>.

A ativação de plaquetas é crucial para o início e sustentação da hemostasia devido não somente a sua agregação no local lesado e a interação com mecanismos de coagulação, mas também por sua degranulação que implica na liberação de citocinas capazes de estimular a migração e proliferação celular no interior da matriz de fibrina<sup>30</sup>.

Citocinas desempenham um papel importante no início da cicatrização<sup>81</sup>, e são compreendidas em: (1) Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF $\beta$ ) – considerando sua isoforma mais abundante TGF $\beta$ <sub>1</sub>; (2) Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF); (3) Fator de Crescimento Insulino-Dependente (IGFs) I e II. Estas 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<sup>30</sup>.

O PRF tem demonstrado ser uma membrana eficiente para a regeneração tecidual em sítios cirúrgicos. Na angiogênese os FC atuam na fase de estimulação, ocorrendo então crescimento vascular e aumento da síntese de colágeno através da proliferação dos fibroblastos<sup>97</sup>.

---

Em função de todas suas propriedades, o uso da fibrina rica em plaquetas autólogo tem sido proposto como uma estratégia para melhorar a resposta celular à lesão no tendão e, finalmente, a qualidade de reparação<sup>83</sup>.

---



## 2. JUSTIFICATIVA

Lesões tendíneas constituem um desafio constante na medicina ortopédica, o que estimula o desenvolvimento de pesquisas que visem o aperfeiçoamento e aceleração do processo de reparo e regeneração do tendão lesionado.

Diversos biomateriais vem sendo investigados com esse intuito, porém resultados amplamente satisfatórios ainda não foram encontrados, instigando assim a busca por novas alternativas.

Credita-se ao uso do Plasma Rico em Plaquetas e a Fibrina Rica em Plaquetas a promoção de uma cicatrização acelerada, o que diminuiria o tempo de cura do tendão lesado, a provável inutilização de qualquer material imobilizador e consequente bem estar do paciente.

Por serem fontes naturais de fatores de crescimento, de fácil obtenção e com baixo valor agregado, espera-se definir o tratamento ideal as lesões no TA, extrapolando futuramente a estudos clínicos.

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar e comparar o efeito do uso de plasma rico em plaquetas (PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF) no reparo do tendão de Aquiles de ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar qualitativamente os dados histológicos obtidos através da coloração Hematoxilina-Eosina entre os grupos experimentais (PRP e PRF) e Controle.
  
  - Comparar quantitativamente os dados histológicos obtidos através da coloração Picrosírius Red entre os grupos experimentais (PRP e PRF) e Controle.
-

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento:

Estudo experimental, controlado, comparado e cego na avaliação dos resultados.

### 4.2 Animais e grupos de experimentação

Para a concretização deste trabalho, foram utilizados 54 ratos da espécie *Rattus norvegicus* machos adultos, pertencentes à linhagem Wistar, com peso aproximado de 280g.

Os ratos foram provenientes do Vivário do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica (LHMPC) do Hospital São Lucas da PUCRS, onde eram mantidos em caixas plásticas, medindo 40x30x17 cm, e contendo 4 animais em cada.

Conforme estabelecido pela Lei Arouca, nº. 11.794, de 08 de outubro de 2008, tais animais, receberam água e ração padronizada *ad libitum*, sendo o ciclo claro-escuro (controle de luz 12/12 horas) e temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  respeitado.

De um total de 54 animais, 6 foram utilizados como doadores de sangue a fim de obter-se os tratamentos utilizados neste trabalho: PRP e PRF. Os demais animais (48) foram randomicamente distribuídos em 3 grupos:

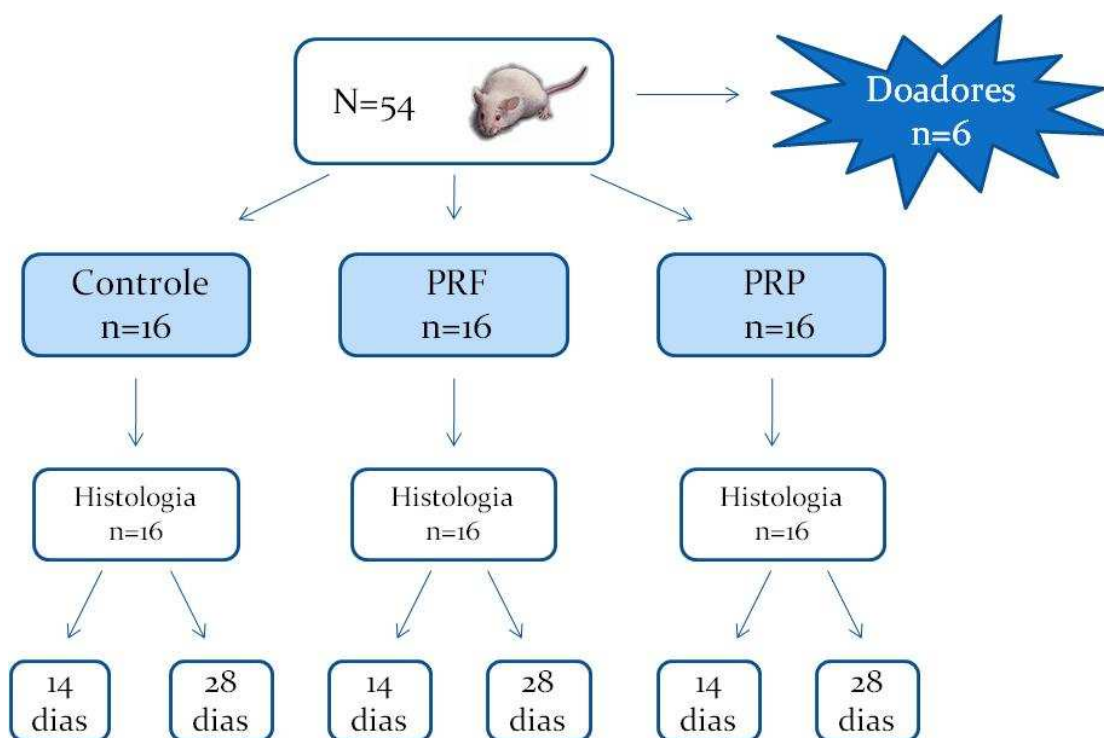
---

Grupo I – Controle; Aplicação de solução salina 0,9%;

Grupo II – Fibrina rica em plaquetas;

Grupo III – Plasma rico em plaquetas;

Os tratamentos foram realizados imediatamente após a realização da lesão e a avaliação ocorreu em dois períodos distintos, conforme organograma abaixo. (Figura 1)



**Figura 1:** Esquema representativo dos grupos animais de acordo com o período de avaliação.

No pós-operatório, os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas acima, porém em caixas individualizadas medindo 40x21x19 cm.

### 4.3. Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

Após a realização de anestesia geral dissociativa de Cloridrato de Cetamina ( $60 \text{ mg.kg}^{-1}$ )

<sup>1</sup>) e Meperidina ( $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) ambos via IM nos animais doadores, através de punção cardíaca, foi coletado aproximadamente 6 mL de sangue dos mesmos, ocorrendo então a morte por exsanguinação.

O sangue puncionado foi inserido imediatamente em tubos contendo anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD Solution A – Becton Dickinson and Company Broken Bow, BJ, USA). Para cada 6 mililitros de sangue foi necessário 20% do anticoagulante, ou seja, 1,2 mL.

Posteriormente a amostra foi submetida a uma centrifugação (Centrífuga Centribio-Modelo 80-2B) por 10 minutos a 1800 RPM ( $250 \times g$ )<sup>75</sup> 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 (plaquetas e leucócitos); 3- hemáceas.

O sobrenadante, juntamente com a zona de névoa e pequena quantidade de hemácias, com auxílio de pipeta, foi transferido para outro tubo que foi submetido a uma segunda centrifugação por 10 minutos a 3.600 RPM ( $1.000 \times g$ )<sup>75</sup>. A grande quantidade de plasma pobre em plaquetas resultante do processo foi aspirado e realocado em outro tubo Falcon (aproximadamente 2/3 do total que o tubo continha) a fim de mais tarde ser realizada a diluição plaquetária. Desta forma, obteve-se somente as plaquetas em sua alta concentração (PRP). (Figura 2).



**Figura 2:** Fração resultante da segunda centrifugação. Nota-se pequena quantidade de hemácias na porção inferior do tubo que foram em sua maioria cuidadosamente retiradas.

Uma alíquota das amostras de sangue (200µL) foi enviada ao LACVET (Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS) para contagem plaquetária, sendo 100µL do sangue total (coletado anteriormente a todo processo) e 100µL do PRP. Tal procedimento foi realizado a partir da Automatic Blood Counter – ABC Vet<sup>TM</sup> – Horiba Medical.

Em função da concentração plaquetária ser distinta nos animais doadores, foi estabelecido a utilização de 1.000.000 de plaquetas por microlitro de amostra<sup>72</sup>. Para a obtenção da quantidade ideal, foi utilizada a fórmula descrita abaixo com o intuito de obter a diluição plaquetária desejada:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Sabe-se que do sangue total, apenas 10% corresponde ao PRP. Portanto, em um volume de 6 mL, obteve-se 600 µL de PRP, conforme figura 3. Estes 600 µL foram ressuspensos e homogeneizados, sendo posteriormente inserido 25 µL desta amostra em microtubos tipo Eppendorf e ativados com 25µL de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e trombina combinados (1.000U/mL em 100mg de cloreto de cálcio) formando assim um coágulo de PRP. Posteriormente foi aplicado 50 µL isoladamente em cada lesão.



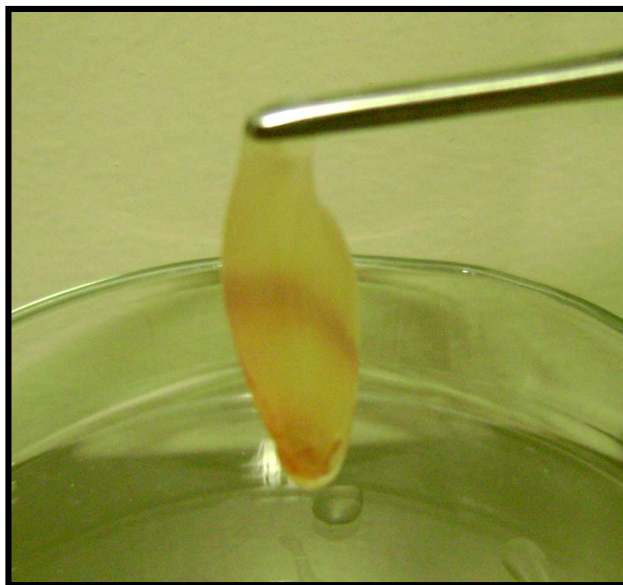
**Figura 3:** Fração de PRP

#### **4.4 Obtenção da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)**

Seguindo os mesmos procedimentos e cuidados empregados na produção do PRP, foram coletados aproximadamente 6 mL de sangue de cada animal doador, através de punção cardíaca.

Tal amostra de sangue foi inserida em tubos Falcon sem adição de anticoagulante. O sangue foi centrifugado somente uma vez, a 3.000 RPM (400 X g)<sup>30</sup> durante 10 minutos, dividindo a amostra em 3 segmentos. Na parte inferior do tubo estava depositada a camada de células vermelhas, na superior o plasma pobre em plaquetas e na camada intermediária, o coágulo de PRF propriamente dito.

A membrana de PRF foi imediatamente retirada do tubo com pinça e separada dos remanescentes sanguíneos com auxílio de tesoura cirúrgica conforme demonstra figura 4. Uma amostra equivalente a 50µL de PRF foi aplicada em seguida na lesão.



**Figura 4:** Membrana de PRF

#### **4.5 Procedimento Cirúrgico**

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de microcirurgia do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS.

---

#### 4.5.1. Procedimento anestésico

Foi realizada anestesia geral em todos os animais utilizados neste trabalho, através da injeção intramuscular de Cloridrato de Cetamina ( $60 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e Meperidina ( $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) associados. Para tal foi utilizada um seringa de insulina (1 mL). A administração das doses foi sempre realizada por profissional capacitado.

A fim de manter os animais anestesiados, quando necessário, foi utilizada a mesma injeção, porém com metade da dose de indução.

#### 4.5.2 Técnica cirúrgica

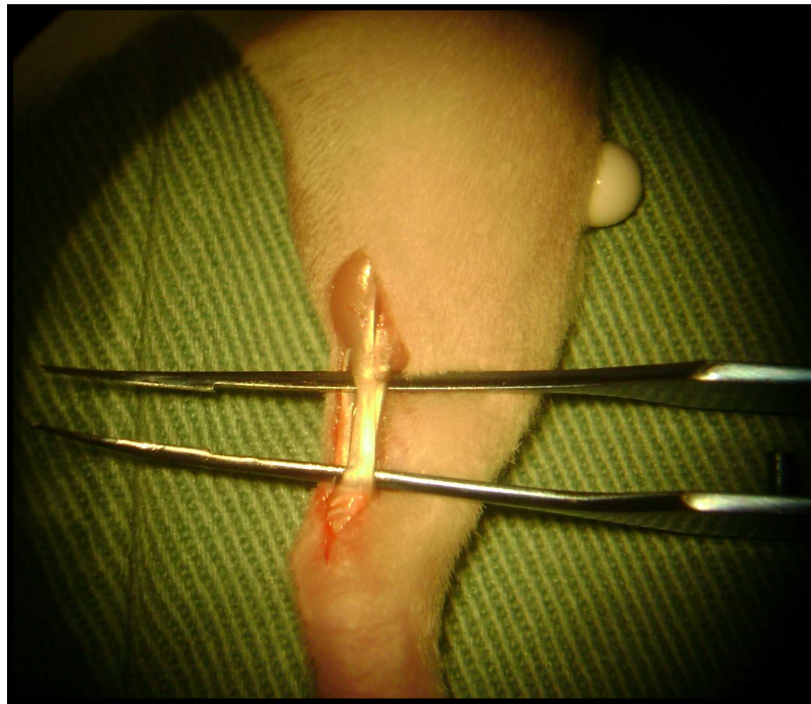
Anteriormente ao procedimento cirúrgico, foi realizada a tricotomia na região cirúrgica dos ratos, com auxílio de tosquiadeira elétrica bem como a pesagem de todos os ratos. Os animais foram posicionados em decúbito ventral, sob anestesia geral, conforme figura 5.



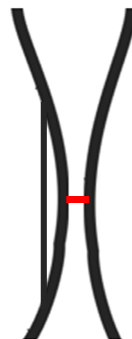
**Figura 5:** Posicionamento dos animais no período cirúrgico



A assepsia foi realizada com álcool 70%. Uma incisão longitudinal de 3 cm foi feita na perna direita de cada rato, expondo assim o Tendão de Aquiles (Figura 6). Logo após, com microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos) foi realizada uma ruptura horizontal no Tendão de Aquiles dos ratos dos grupos experimentais, conforme figura 7. A reparação foi empregada com sutura do tipo Kessler utilizando-se fio Mononylon 7-0 (Ethicon Somerville, N.J.)<sup>104</sup>.



**Figura 6:** Exatuação do TA direito do rato.



**Figura 7:** Modelo de ruptura.

Sobre a lesão foi aplicado 50µL dos tratamentos em questão: PRP, PRF e solução salina 0,9%. A pele foi restabelecida através de sutura, utilizando-se fio Vicryl 5-0 (Ethicon)<sup>104</sup>.

A fim de otimizar a utilização de amostra de sangue de cada animal doador, foi estabelecido que a cada dia de cirurgia fossem operados a mesma quantidade de ratos do grupo experimental I e grupo experimental II, bem como em outro momento, a mesma quantidade de animais do grupo experimental I e III.

#### **4.5.3 Pós operatório**

Conforme já mencionado anteriormente, os animais, imediatamente após a cirurgia foram mantidos em caixas individuais e monitorados diariamente. Foi aplicado Cetoprofeno, via subcutânea uma vez ao dia por 3 dias (5mg kg, IM) como medicação analgésica e antiinflamatória. A limpeza das caixas, manutenção da alimentação e troca de água foi realizada 3 vezes por semana por profissional habilitado.

#### **4.5.4 Eutanásia**

De um total de 54 animais, 6 deles, correspondentes aos doadores, morreram pela técnica de exsanguinação.

Passados quatorze e vinte e oito dias pós-operatórios, foi realizada a eutanásia dos animais experimentais (n = 48) através de uma injeção intra-cardíaca com dose letal de Tiopental. Uma amostra do tecido correspondente à área lesionada do Tendão de Aquiles foi removido, iniciando assim o processo histológico para obtenção de resultados.

### **4.6 Análises histológicas**

#### **4.6.1 Fixação das amostras**

As amostras retiradas foram fixadas em formalina tamponada 10% por um período de 48 a 72 horas, a fim de que suas estruturas morfológicas se mantivessem preservadas.

---

Posteriormente as amostras foram processadas manualmente utilizando-se diferentes concentrações crescentes de álcool, ocorrendo a desidratação, seguida pela diafanização por xilol e inclusão em parafina, conforme protocolo a seguir:

### 1. DESIDRATAÇÃO

Álcool 70%	}	30 min
Álcool 80%		
Álcool 90%		
Álcool 100% I	}	60 min
Álcool 100% II		
Álcool 100% III		

### 2. DIAFANIZAÇÃO

Xilol (P.A.) I	}	30 min
Xilol (P.A.) II		
Xilol (P.A.) III		

### 3. INCLUSÃO EM PARAFINA

Parafina I	}	30 min
Parafina II		
Parafina III	}	60 min

O tendão foi posicionado longitudinalmente no processo de inclusão em parafina. Tais procedimentos foram realizados na sala de Histologia do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica (PUCRS).

#### 4.6.2 Confeção das lâminas histológicas

Os cortes das amostras foram realizados no Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS. O bloco de parafina contendo a amostra foi desbastado até o local onde se encontrava o tendão de Aquiles. Os cortes foram feitos longitudinalmente, possuindo espessura de quatro micrômetros.

Foram realizados 2 cortes superficiais de cada amostra bem como 2 cortes profundos para cada coloração.

Uma vez realizado o corte superficial, a profundidade no corte foi estabelecida após seccionar a amostra por 15 vezes.

No total foram confeccionados 4 cortes superficiais e 4 cortes profundos representativos para cada animal, totalizando em 384 amostras, que foram verificadas.

Conforme já citado anteriormente os cortes e as colorações foram realizados em duplicata. Desta forma, a partir de análise qualitativa, com auxílio de microscópio, determinou-se a amostra a ser utilizada a fim de obterem-se os dados quantitativos.

Todas as lâminas confeccionadas foram classificadas por código.

#### 4.6.3 Colorações

Todas as lâminas confeccionadas foram mantidas por 24 horas em estufa a 60°C. Após secagem completa, foram imersas em xilol 2 vezes por 10 minutos cada. As lâminas recém diafanizadas foram colocadas imediatamente em álcool absoluto por 3 minutos, seguidos de mais 3 banhos em álcool decrescente (90, 80 e 70%) por 3 minutos, desidratando-as.

A fim de hidratá-las novamente as lâminas contendo as amostras ficaram em contato com água destilada por um período de 3 minutos, inicializando-se assim o protocolo de colorações específicas.

---

#### **4.6.3.1 Coloração Hematoxilina e Eosina**

As amostras recentemente hidratadas foram imersas por 1 minuto na Coloração Hematoxilina de Harris. Feito isso, imediatamente foram lavadas por um período de 15 minutos em água corrente, lavadas novamente em água destilada e imersas por 3 minutos na coloração Eosina.

A fim de finalizar o processo, as amostras foram desidratadas novamente, porém desta vez, em concentrações crescentes de álcool: 70, 80 e 90% por 1 minuto; e álcool 100%, em duplicata por 3 minutos cada. A diafanização foi realizada em seguida (3 vezes em xilol absoluto, por 3 minutos cada). A montagem da lâmina foi concluída com a imersão de uma gota de bálsamo de Canadá no centro de onde estava a amostra e posterior aderência da lamínula.

#### **4.6.3.2 Coloração Picrosírius Red**

Na coloração Picrosírius Red (Microscopia de Polarização Cruzada), a preparação das amostras foi realizada utilizando-se o mesmo protocolo da coloração de Hematoxilina e Eosina, diferindo somente a coloração a ser utilizada.

Desta vez, as amostras foram imersas em solução Sirius Red. Logo após foram lavadas em água destilada, desidratadas, diafanizadas e montadas. Tais lâminas foram visualizadas sob microscopia de luz polarizada, onde colágeno tipo I foi demonstrado com coloração vermelho-amarelado e colágeno tipo III com coloração esverdeada.

### **4.7 Análise de Imagens**

As lâminas histológicas, quando analisadas foram tomadas ao acaso. Estas eram codificadas, impedindo assim que os analisadores identificassem a qual grupo a amostra pertencia.

A leitura das lâminas foi realizada com microscópio óptico Zeiss Axioskop 40.

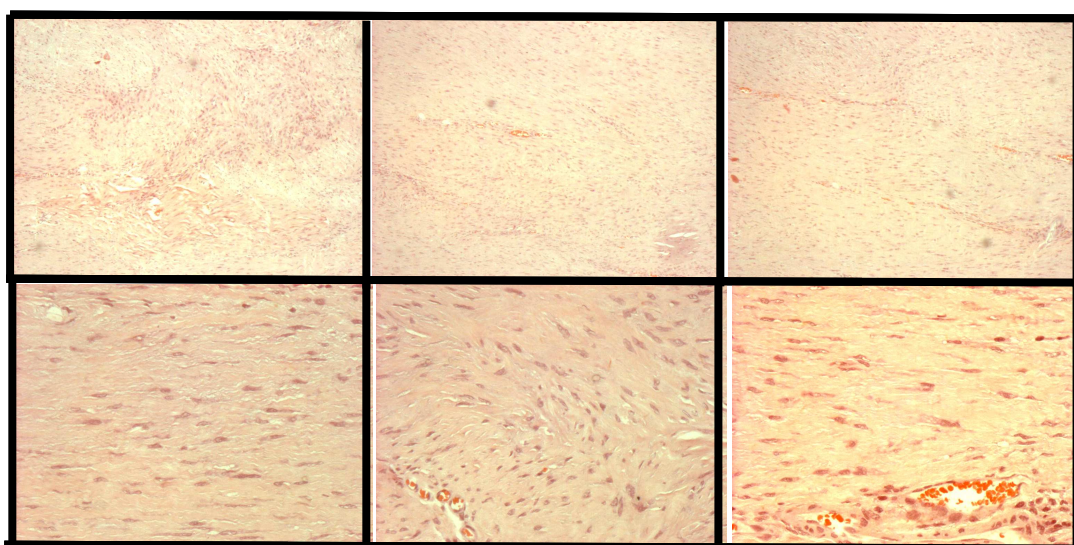
As imagens visualizadas foram fotografadas com câmera CoolSNAP<sup>TM</sup> –Pro *cf* (Media Cybernetics, Inc.), acoplada ao microscópio e a um computador.

---

#### 4.7.1 Histomorfometria

##### *4.7.1.1 Coloração Hematoxilina e Eosina*

Na coloração Hematoxilina e Eosina a objetiva utilizada inicialmente para a captura das imagens foi de 50X, a fim de se obter uma imagem geral do tendão. Posteriormente utilizou-se objetiva de 200X para verificar especificamente a disposição e os tipos de células presente no local da lesão, conforme figura 8.



**Figura 8:** Exemplo de captura de imagens em 50X (superior) e em 200X (inferior) no grupo experimental PRF em corte longitudinal profundo.

Em função de o tendão ser um tecido elástico, a lesão realizada não seguiu o mesmo padrão de cicatrização. Portanto, todas as imagens capturadas no desenvolver do trabalho se basearam, inicialmente, no encontro da lesão propriamente dita. Caso isto não poderia ser visualizado, tomou-se como parâmetro a porção central do tecido, bem como, a desorganização celular do mesmo.

Encontrada a área lesionada do tendão de Aquiles, foi realizada a captura das imagens no aumento de 200X nos cortes superficiais e profundos, que variou de sete a onze imagens cada.

Todas as imagens histológicas foram analisadas a partir do programa Image Pro Plus 4.5.1<sup>®</sup> (Media Cybernetics, Inc.), considerando os seguintes critérios: proliferação vascular, células mononucleares, células polimorfonucleares, proliferação fibroblástica e células epiteliais. Tais aspectos foram verificados através do auxílio do patologista Dr. Vinícius Duval, do Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

Tal coloração foi avaliada somente qualitativamente, com o intuito de corroborar com os resultados obtidos na coloração Picrosírius.

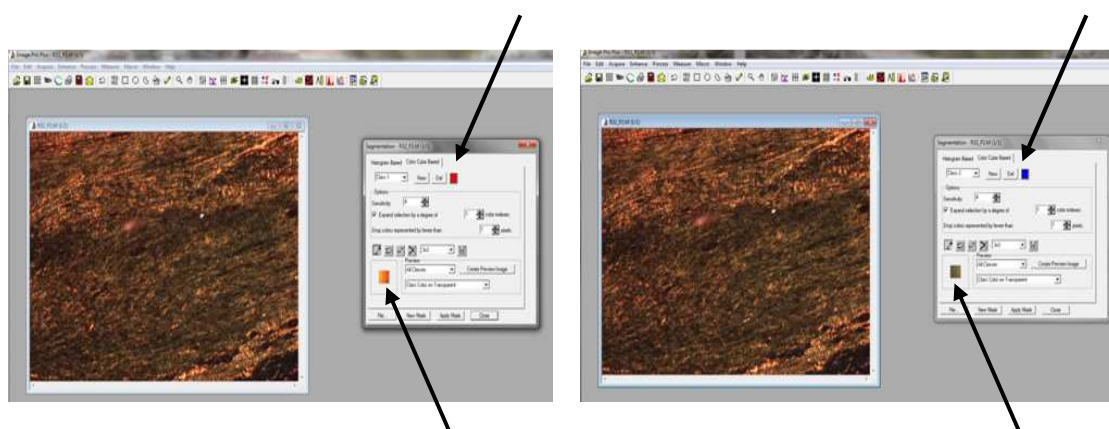
#### **4.7.1.2 Coloração Picrosírius**

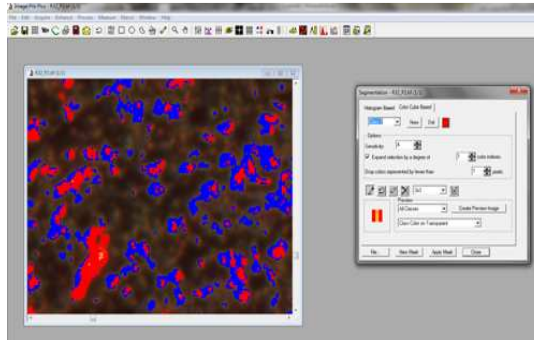
A objetiva utilizada para a captura das imagens nesta coloração foi de 50X, sendo selecionados 3 campos em cada amostra da lâmina, o que representava toda a lesão.

As imagens foram captadas sob luz polarizada, com o microscópio na sua luminosidade máxima e o tempo de exposição variando de 40 a 70 milissegundos.

Para a quantificação dos diferentes tipos de colágeno presentes no tendão de Aquiles, conforme já descrito, tomou-se por base a coloração vermelho amarelada para as fibras fortemente associadas e mais grossas (Colágeno Tipo I) e coloração esverdeada para as fibras finas dissociadas típicas de colágeno III.

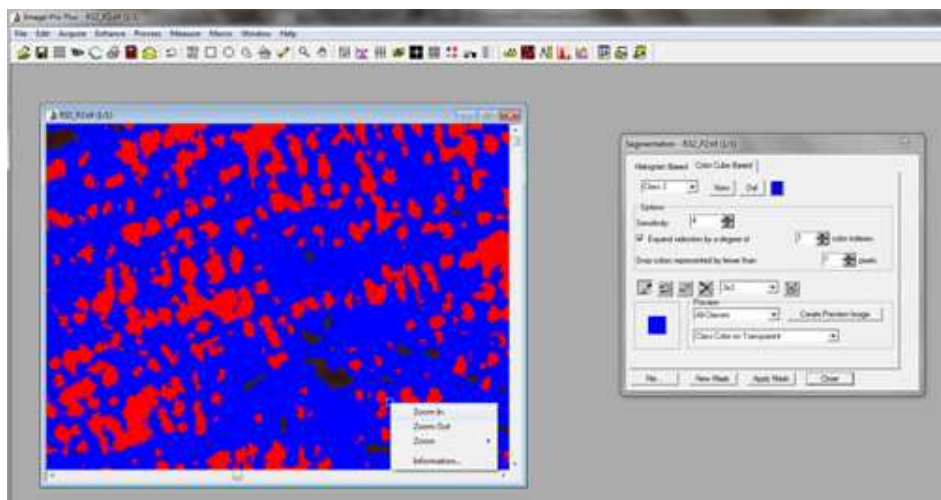
Para tal, fez-se o uso do software Image Pro Plus 4.5.1<sup>®</sup> onde foi estabelecido que Colágeno Tipo I seria marcado com a coloração vermelha e Colágeno tipo III com a coloração azul, podendo-se diferenciar as fibras de forma simplificada. (Figura 9).





**Figura 9:** Programa Image Pro Plus 4.5.1<sup>®</sup> utilizado para demarcar e diferenciar os tipos de colágeno na coloração Picrosírius Red.

As imagens foram verificadas manualmente por dois profissionais capacitados. O aumento (zoom) foi utilizado como ferramenta indispensável para a verificação de todos os pontos conforme segue na figura 10.

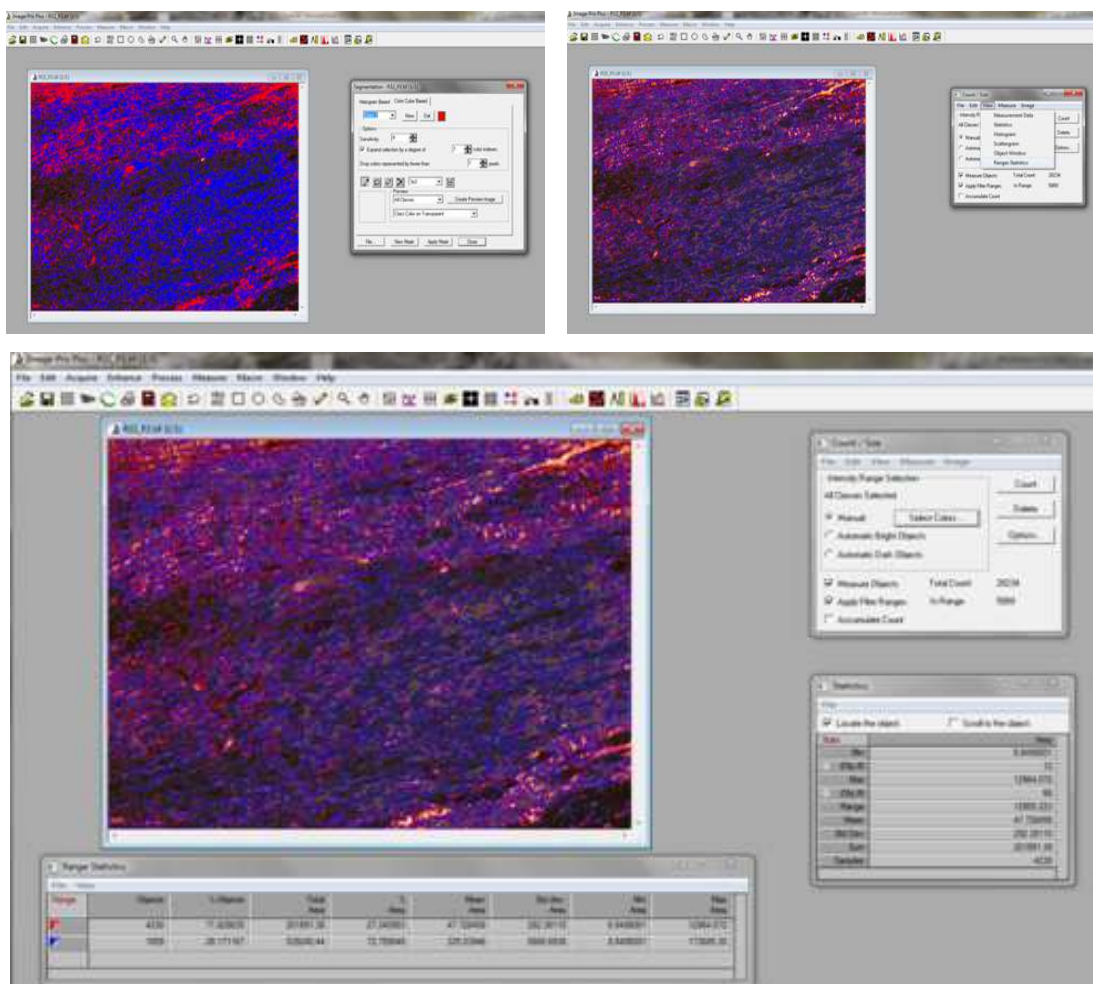


**Figura 10:** Aumento utilizado no programa Image Pro Plus 4.5.1<sup>®</sup> para minuciosa busca por coloração.

Após ter sido selecionada toda a área na qual possuía a coloração estipulada, foi realizada a contagem de colágeno tipo I e III presentes em cada amostra (Figura 11). A partir



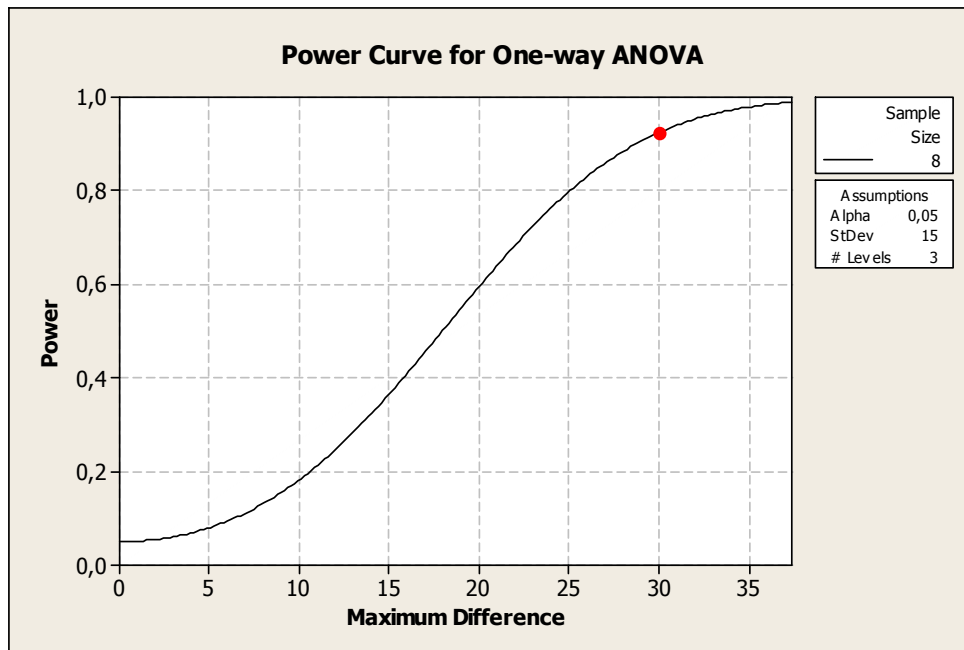
da contagem do número de pixels, obteve-se a área total que foi transformada em porcentagem.



**Figura 11:** Verificação quantitativa dos tipos de Colágeno I e III presente nos tratamentos em questão.

Finalizado este processo, os dados obtidos nos três campos analisados por amostra, foram transferidos para o programa Excel a fim de calcular a média e o percentual exatos de quantidade de Colágeno Tipo I e Tipo III em cada animal experimental, tanto profundo quanto superficialmente, conforme figura 12.





**Figura 13:** Cálculo amostral realizado para a obtenção de um número de animais adequado para os experimentos desenvolvidos nesta pesquisa.

#### 4.9 Aspectos Bioéticos:

A presente pesquisa foi realizada conforme Lei Arouca 2008, nº 11.794/08 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências visando minimizar o sofrimento dos animais que serão utilizados.

Tal pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. (ANEXO A).

Em todos os procedimentos cirúrgicos foi utilizada anestesia com Cloridrato de Cetamina e Meperidina. A eutanásia foi realizada através de injeção intracardíaca com dose letal de Tiopental (20 a 100 mg/kg), conforme Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Tal fármaco foi utilizado por ser um depressor do sistema nervoso central.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Clínicos e Cirúrgicos

O protocolo anestésico empregado foi eficaz, sendo necessária, em apenas alguns animais, a reaplicação da metade da dose anestésica a fim de manutenção.

A medicação analgésica administrada no pós-operatório foi adequada, garantindo o bem estar dos animais.

Não foram notados quaisquer sinais de infecção ou outras complicações clínicas durante o estudo, não havendo perdas de animais.

A sutura realizada na pele dos animais foi bem executada, sendo que no período de uma semana o tecido epitelial já estava restabelecido.

### 5.2 Contagem plaquetária

Todos os ratos apresentaram hemograma dentro dos padrões de normalidade, onde a quantidade plaquetária no sangue total variou de 286.000 a 502.000 plaquetas/ $\mu$ L.

Pode-se observar no hemograma, o aumento na quantidade de leucócitos no Plasma rico em plaquetas quando comparado ao sangue total. (Tabela 1)

---

---

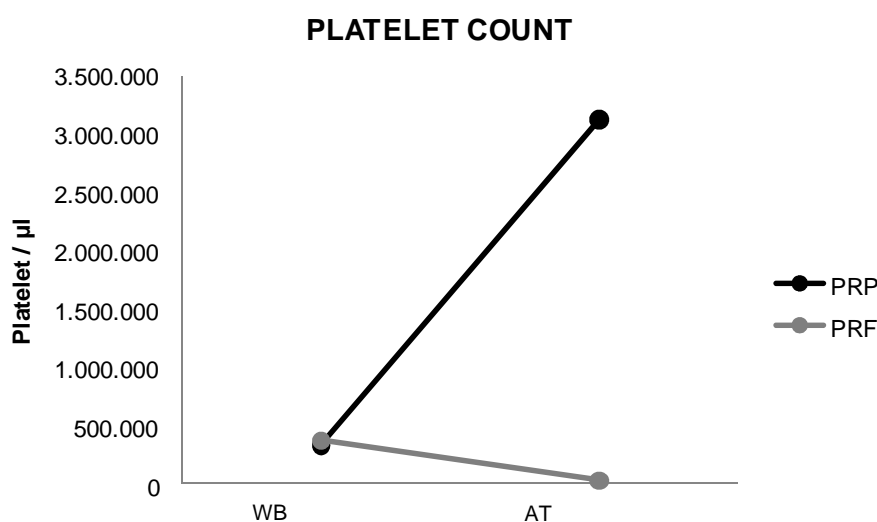
Após as centrifugações, no PRP o número de plaquetas por microlitro foi de 2.616.000 a 4.080.000, comprovando que a técnica utilizada elevou em até 12 vezes a concentração de plaquetas por  $\mu\text{L}$  após a realização do protocolo.

Já no PRF, a quantidade de plaquetas diminuiu demasiadamente, variando de 14.000 a 55.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ , demonstrando assim que a técnica de preparação do mesmo foi eficaz.

Os valores referentes ao sangue total dos ratos doadores, bem como do PRP e do PRF foram apresentados sob a forma de gráfico (Figura 14) e tabelas (Tabela 2 e 3).

**TABELA 1:** Quantidade individual de leucócitos/ $\mu\text{L}$  presentes no sangue total e no PRP e o incremento de leucócitos (%) no PRP.

Doador	Quantidade de leucócitos no sangue total ( $\mu\text{L}$ )	Quantidade de leucócitos no PRP ( $\mu\text{L}$ )	Incremento de leucócitos (%)
1	2.200.000	3.000.000	36
2	1.600.000	3.600.000	125
3	1200.000	1.600.000	33



**Figura 14:** Gráfico comparativo entre o número de plaquetas do sangue total (Whole Blood - WB) e nos tratamentos autólogos ( Autologous Treatment - AT).

**TABELA 2:** Quantidade individual de plaquetas/ $\mu\text{L}$  presentes no sangue total e no PRP e o incremento plaquetário (%) no PRP.

<b>Doador</b>	<b>Quantidade de plaquetas no sangue total (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Quantidade de plaquetas no PRP (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Incremento plaquetário (%)</b>
<b>1</b>	326.000	2.616.000	702,45
<b>2</b>	330.000	4.080.000	1.136,36
<b>3</b>	344.000	2.670.000	676,16

**TABELA 3:** Quantidade individual de plaquetas/ $\mu\text{L}$  presentes no sangue total e no PRF e a supressão plaquetária (%) no PRF.

<b>Doador</b>	<b>Quantidade de plaquetas no sangue total (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Quantidade de plaquetas no PRF (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Supressão plaquetária (%)</b>
<b>1</b>	286.000	14.000	95,10
<b>2</b>	502.000	55.000	89,04
<b>3</b>	340.000	28.000	91,76

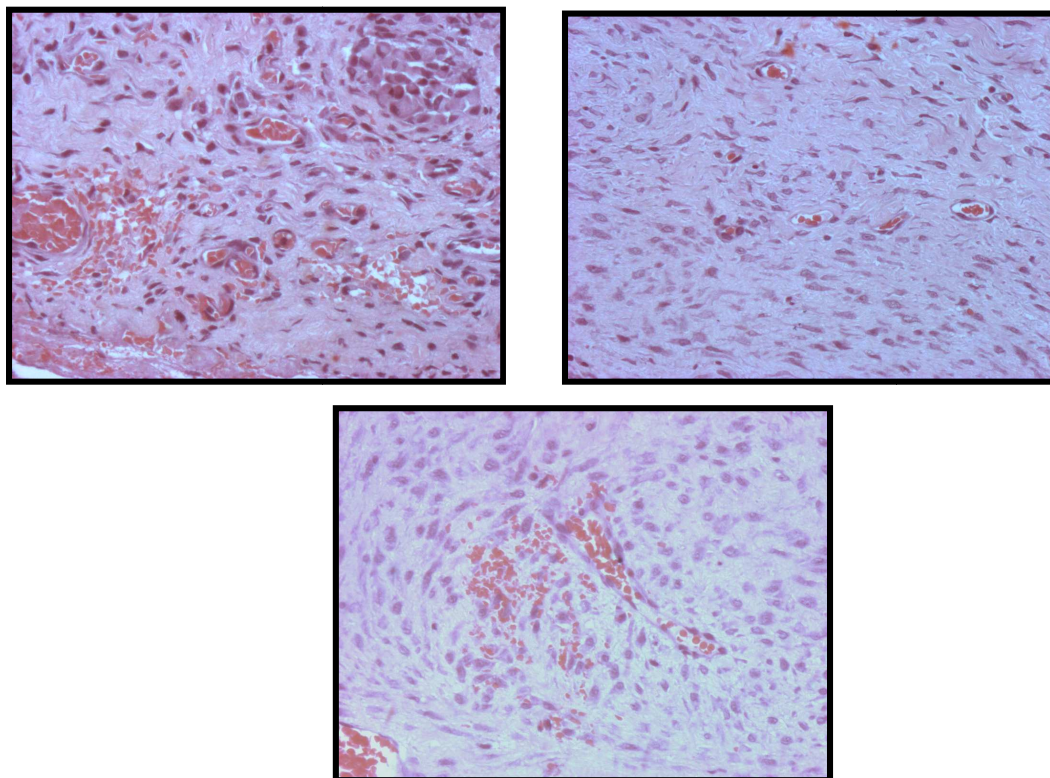
### 5.3 Histomorfometria

#### 5.3.1 Coloração Hematoxilina e Eosina

Analisando-se os cortes histológicos obtidos nos três grupos experimentais: Controle, PRP e PRF em 14 e 28 dias, não houve, microscopicamente, diferença em relação aos cortes superficiais e profundos em cada amostra específica.

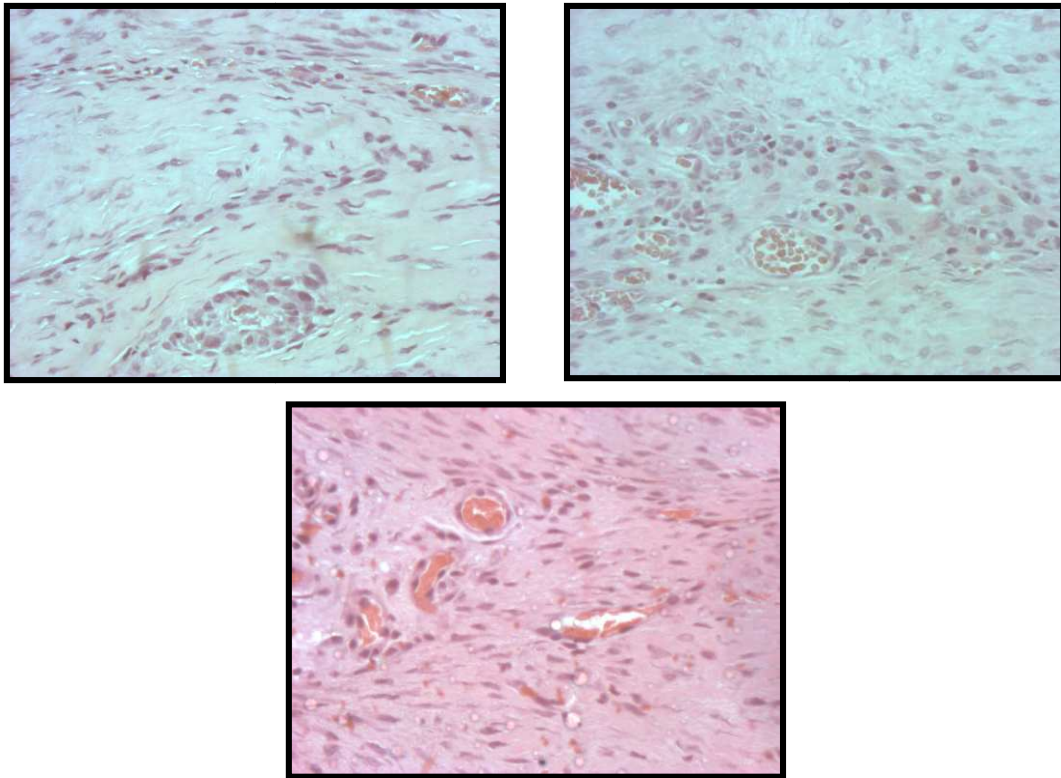
O grupo Controle, quando avaliado no período de 14 dias, demonstrou intensa desorganização celular, bem como presença de infiltrados inflamatórios, reação inflamatória granulomatosa e alguns pontos hemorrágicos. Fibroblastos, fibrócitos e células

mononucleares e polimorfonucleares estavam dispostos de maneira desordenada. Presença de angiogênese bastante significativa foi visualizada. (Figura 15)



**Figura 15:** Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental Controle: Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; área hemorrágica; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório. Aumento: 200X.

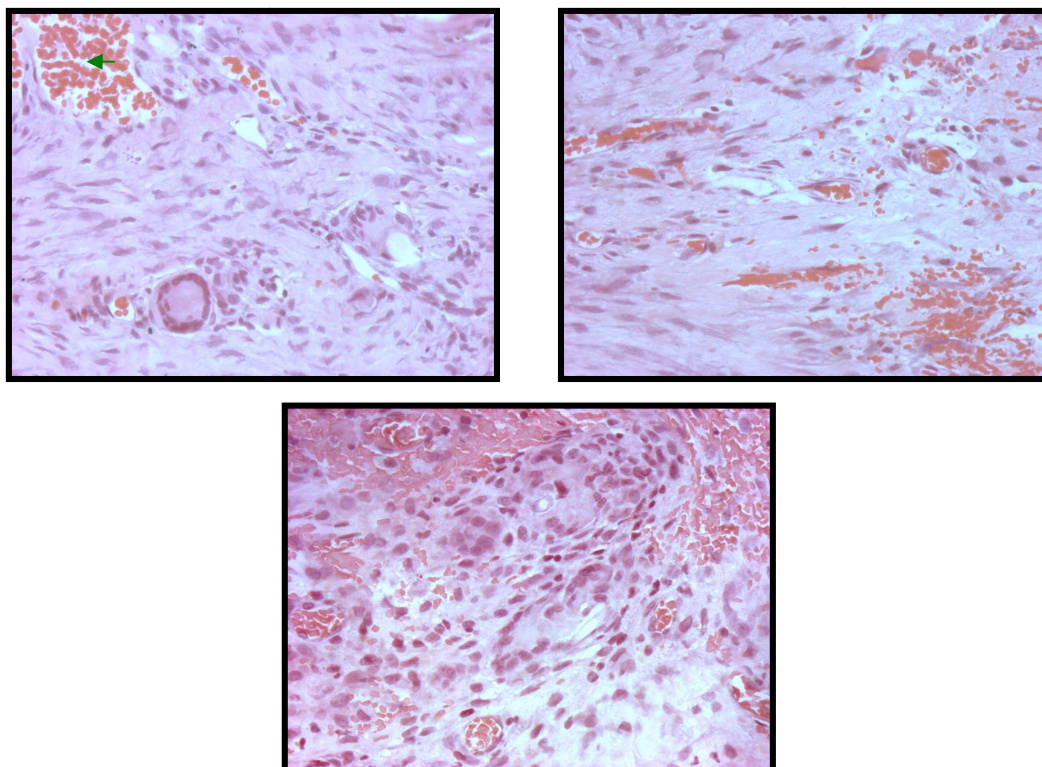
Quando observado as amostras de 28 dias (Figura 16), percebeu-se melhora na organização geral do tecido, com notável diminuição de células mononucleares e polimorfonucleares presentes. Fibroblastos estavam dispostos de maneira mais alinhada. Hemorragia ocorreu diminuída, e apesar, da discreta diminuição do infiltrado inflamatório presentes no tecido, estas células ainda encontravam-se em grande quantidade.



**Figura 16:** Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental Controle. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; fibroblastos com núcleo vesicular; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório; Granuloma. Aumento: 200X.

As amostras obtidas a partir do Plasma rico em plaquetas apresentaram hemorragia nos dois períodos em que foram avaliados (14 e 28 dias). Assim como observado no grupo Controle, foi constatada presença de neovascularização nos dois tempos, sendo maior a presença de vasos sanguíneos na avaliação de 28 dias. (Figura 17 e 18)

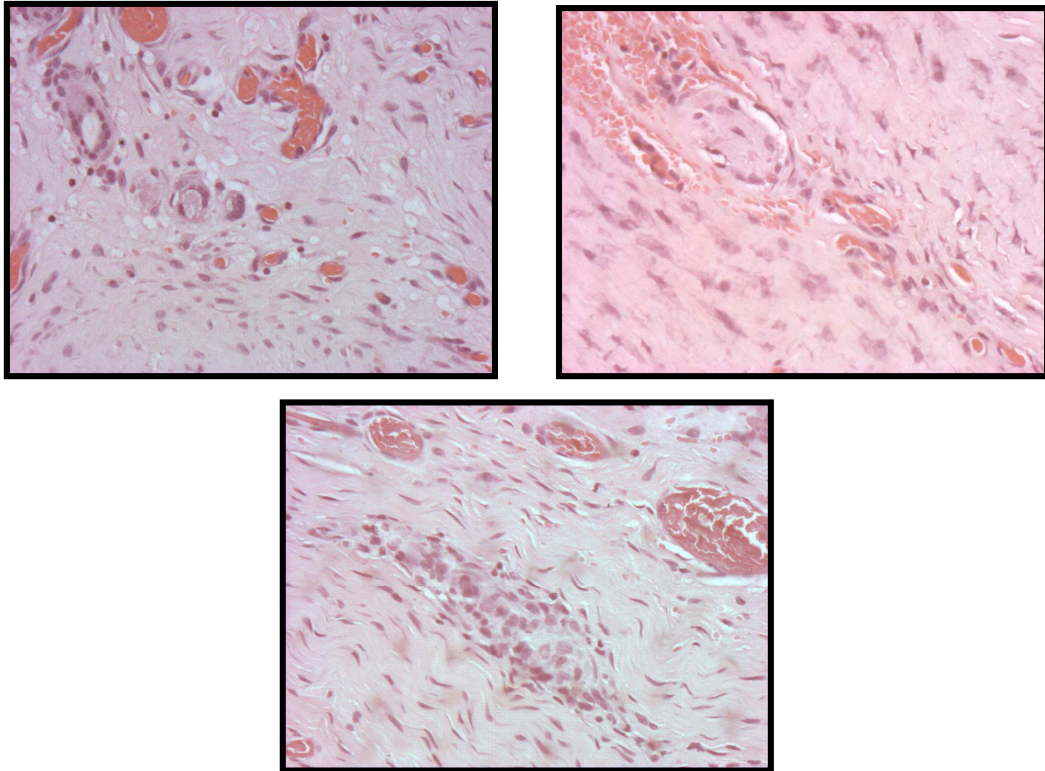




**Figura 17:** Imagens capturadas em corte longitudinal aos 14 dias - Grupo experimental PRP. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; área hemorrágica; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório; Granuloma. Aumento: 200X.

Extenso infiltrado inflamatório foi visualizado nas amostras de 14 dias, enquanto que uma diminuição nas amostras de 28 dias foi observada. Reação inflamatória granulomatosa foi encontrada nas duas avaliações, bem como região de fibrose de alta densidade.

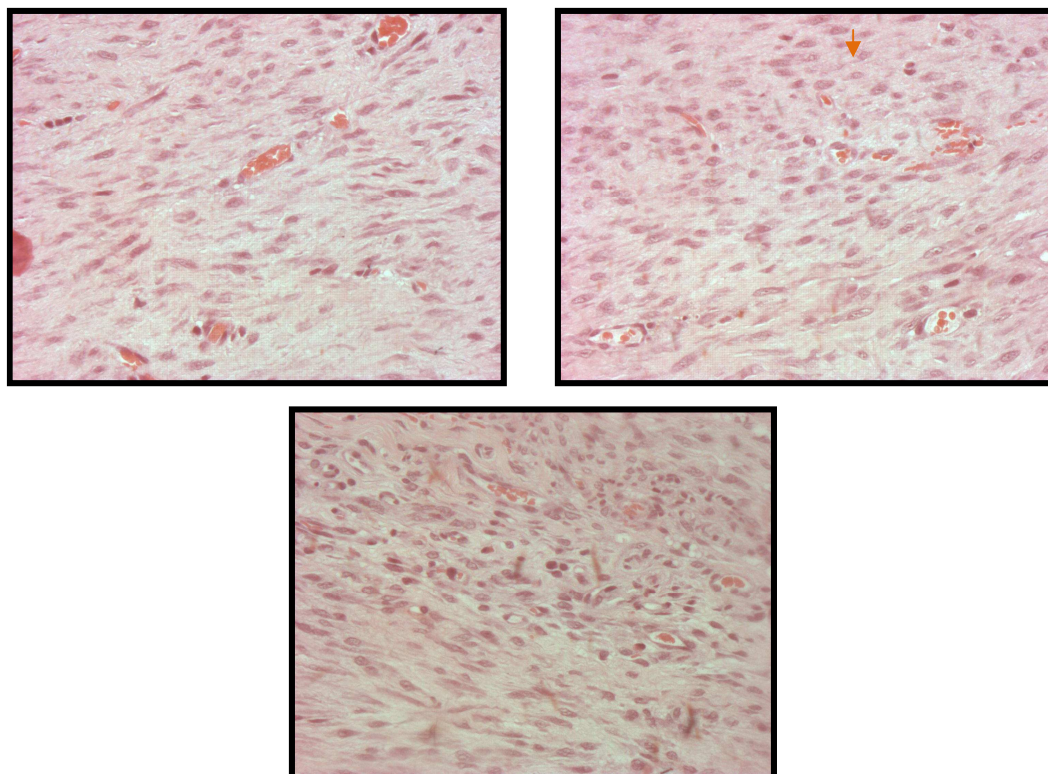
Tanto em 14 dias como em 28 dias, a migração de fibroblastos e desorganização celular esteve presente. Porém, aos 28 dias, células mononucleares e polimorfonucleares tiveram notável atenuação.



**Figura 18:** Imagens capturadas em corte longitudinal aos 28 dias - Grupo experimental PRP. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; área hemorrágica; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares; infiltrado inflamatório; Granuloma. Aumento: 200X.

Já nas lâminas obtidas através do tratamento de Fibrina rica em plaquetas, se notou presença de mais fibroblastos com núcleo vesiculoso, ou seja, jovens, no tempo de 14 dias.

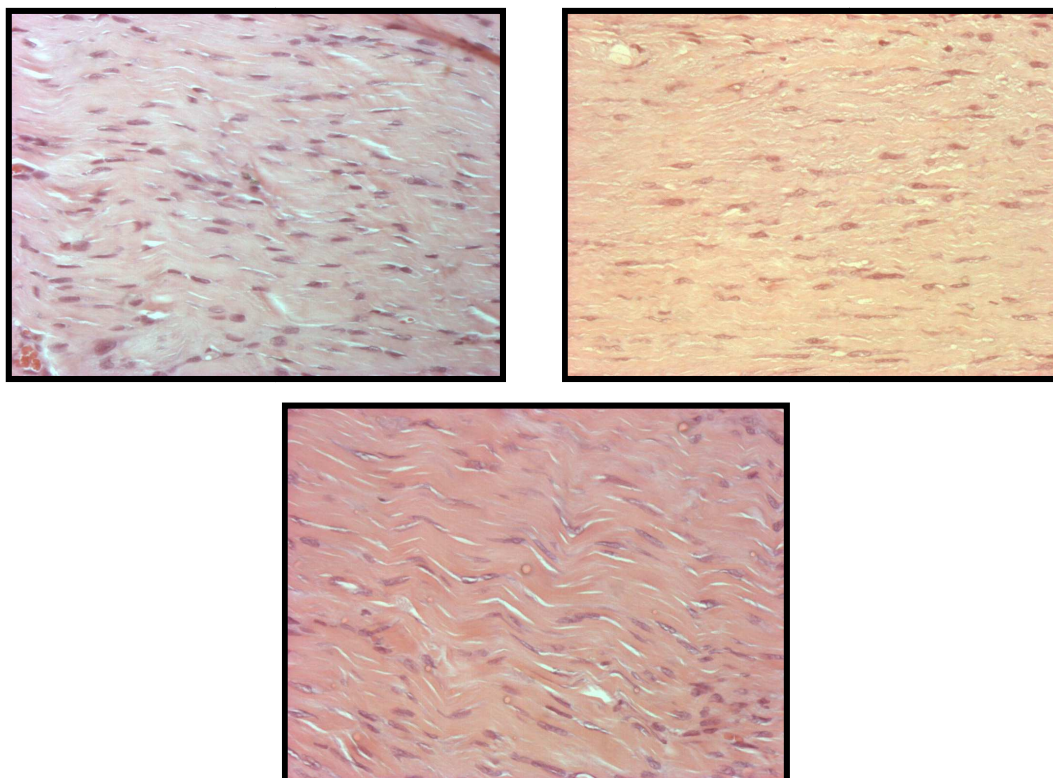
Conforme demonstra figura 19, intensa formação de epitélio sanguíneo pôde ser observada no período de 14 dias, bem como desorganização celular no tecido. Pequena região de fibrose e discretos infiltrados inflamatórios também puderam ser observados.



**Figura 19:** Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental PRF. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; fibrilas de colágeno; fibroblastos com núcleo vesiculoso; células mononucleares e polimorfonucleares. Aumento: 200X.

Aos 28 dias foi notável a diminuição dos fibroblastos com núcleo vesiculoso e ainda a presença de fibrócitos com núcleo alongado e cromatina condensada (adultos), caracterizando assim um tecido mais maduro.

Fibrilas de colágeno, em seu trajeto ondulado, estavam dispostas de maneira organizada, entre as quais pode ser notada a presença de fileiras de fibroblastos e fibrócitos. A presença de células mononucleares e polimorfonucleares, bem como formação de novos vasos sanguíneos, foram pouco visualizadas. (Figura 20)



**Figura 20:** Imagens capturadas em corte longitudinal - Grupo experimental PRF. Observa-se presença de fibrócitos com núcleo achatado e cromatina condensada; formação de vasos sanguíneos; fibrilas de colágeno; fibroblastos com núcleo vesicular; células mononucleares e polimorfonucleares. Aumento: 200X.

Contudo, quando avaliados de forma geral entre os grupos, no tempo de 14 dias, o grupo Controle e PRP se mantiveram no mesmo nível de celularidade, com tecido de granulação ativo. O que diferiu nos dois grupos foi a maior presença de hemorragia no grupo PRP. Ao comparar o grupo Controle com o PRF, notou-se que o processo de neovascularização estava mais avançado no grupo tratado com Fibrina Rica em Plaquetas. A quantidade de infiltrados inflamatórios foi menor no grupo PRF, não havendo a presença de granuloma como no grupo Controle. Se comparado o grupo PRP e PRF, intensa diferença pode ser observada. Células inflamatórias, hemorragia, células mononucleares e polimorfonucleares estavam presentes em maior abundância e mais desorganizadas no grupo PRP. Formação de novos vasos foi maior no PRF do que no grupo PRP em 14 dias.

---

Já quando avaliados os grupos entre si, no tempo de 28 dias, Controle *versus* PRP estavam microscopicamente parecidos, no entanto, no grupo PRP ainda eram observadas áreas hemorrágicas. Já quando comparados PRP e Controle *versus* PRF, se observou grande diferença qualitativa nas amostras, como maior celularidade, com nítida e grande quantidade de fibroblastos e menos fibras colágenas, fibrócitos e regiões de fibrose nos cortes das amostras do grupo Controle e PRP, observando-se que em sua maioria os fibroblastos destas amostras eram jovens, ou seja, possuíam núcleo vesiculoso e cromatina frouxa.

Ao contrário do que acontecia nestes dois grupos experimentais, no grupo PRF, aos 28 dias, o tecido apresentava-se mais condensado e organizado, com maior quantidade de fibrócitos com núcleo alongado e cromatina densa e menor quantidade de fibroblastos com núcleo vesiculoso, caracterizando um tecido parcialmente cicatrizado.

Contudo, apesar da análise comparativa qualitativa entre os diferentes tratamentos e Controle, é possível sugerir que tanto o PRF como o grupo Controle apresentaram um processo de reparo do tecido mais progressivo que o PRP. Tal conclusão pode ser tomada com base nas características microscópicas observadas no tecido: a presença dos diferentes tipos celulares, o número de vasos sanguíneos e a disposição das fibras de colágeno no decorrer dos 14 e 28 dias.

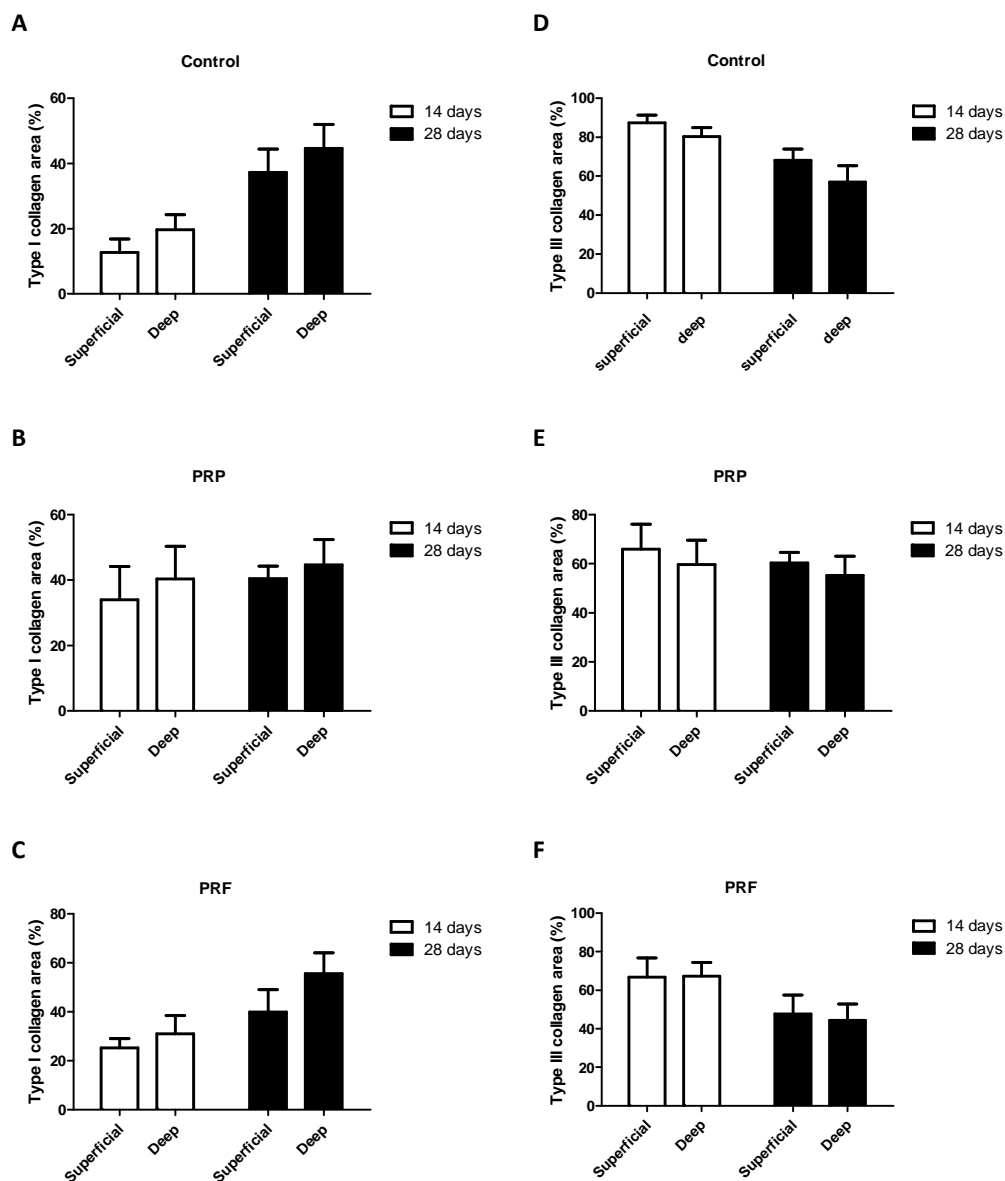
### 5.3.2 Coloração Picrosírius

Quando realizada a comparação das áreas de colágeno do tipo I entre os grupos, em nível de profundidade da lesão (superficial e profundo) e tempo (14 e 28 dias), não foi encontrada interação entre os grupos nos dois tempos avaliados ( $p \geq 0.05$ ). Resultados similares foram encontrados para o colágeno do tipo III quanto ao nível de profundidade da lesão ( $p \geq 0.05$ ).

A comparação das áreas de colágeno tanto do tipo I quanto do tipo III, em relação ao nível de profundidade (superficial *versus* profundo) e tempo intra-grupos não tiveram diferença significativa nos dias 14 e 28, quando analisados separadamente.

Na figura 21 estão apresentados os gráficos dos resultados das análises superficiais e profundas do colágeno do tipo I (A, B, C) e do colágeno do tipo III (D, E, F).

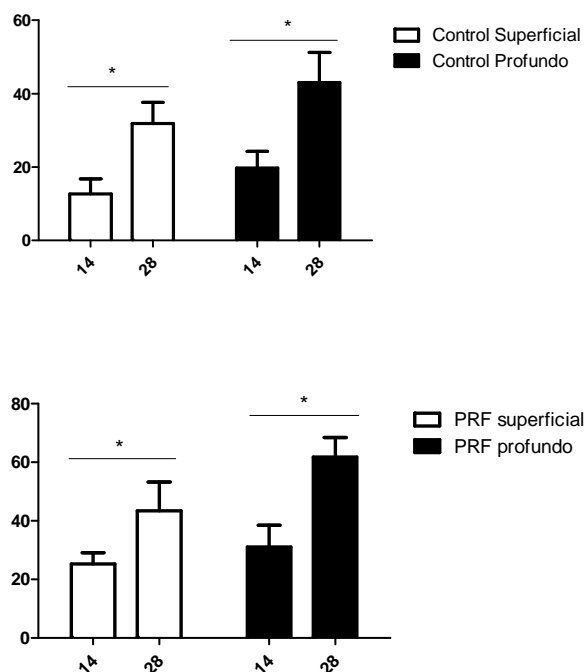
---



**Figura 21** - Análises superficiais e profundas do colágeno do tipo I (A, B, C) e do colágeno do tipo III (D, E, F) no tempo de 14 e 28 dias.

Quando realizada a comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 *versus* 28 dias) intra-grupos, foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) nos grupos Controle e PRF para o colágeno do tipo I (Tabela 4) (Figura 22), o que era esperado,

devido ao processo de reparo da lesão, onde ao passar do tempo, mais cicatrizado encontra-se o tecido.

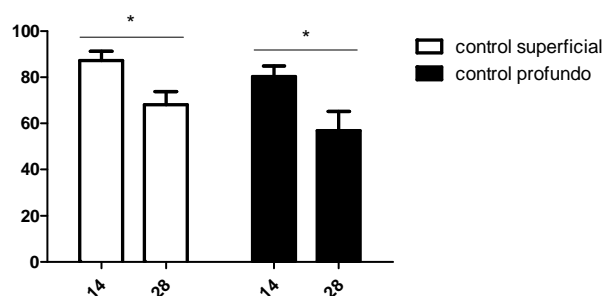


**Figura 22:** Gráficos de comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 versus 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo I. \* p < 0.05.

**TABELA 4** – Comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 versus 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo I. \* p < 0.05.

Tempos	Controle		PRP		PRF	
	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo
<b>14 X 28</b>	P < 0.05	P < 0.05	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05	P < 0.05	P < 0.05

Para o colágeno do tipo III foi encontrado diferença significativa somente no grupo Controle ( $p < 0.05$ ) (Tabela 5) (Figura 23). Já nos grupos PRP e PRF não foi observada diferença estatística ( $p \geq 0.05$ ).



**Figura 23:** Gráfico de comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 *versus* 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo III. \*  $p < 0.05$ .

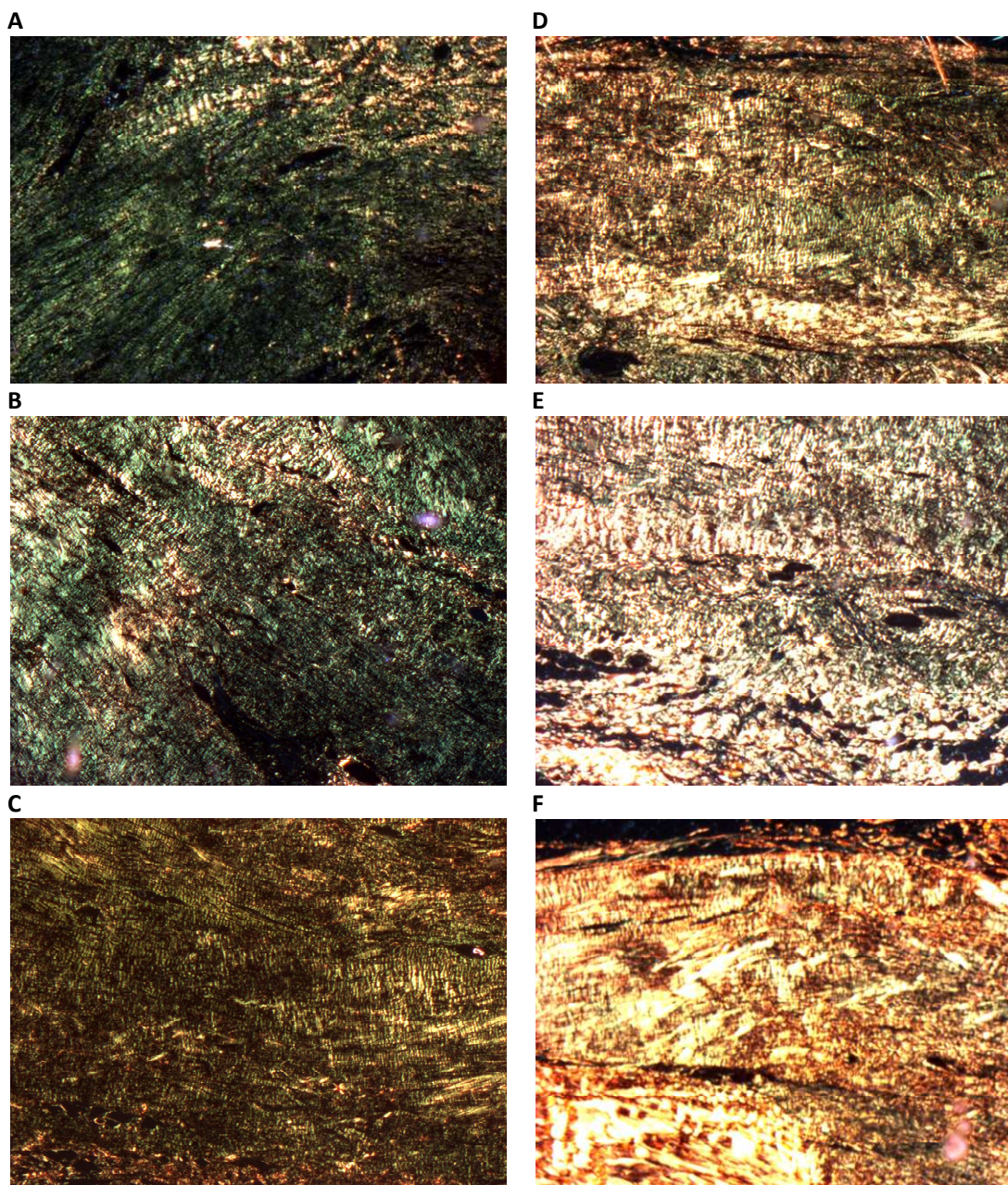
**TABELA 5** – Comparação entre os níveis de profundidade e tempo (14 *versus* 28 dias) intra-grupos para colágeno tipo III. \*  $p < 0.05$ .

Tempos	Controle		PRP		PRF	
Dias	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo
<b>14 X 28</b>	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$

Em função de não encontrarmos diferença significativa quando comparado os grupos entre si nos níveis de profundidade, foi realizada a junção dos resultados obtidos, tanto superficiais como profundos, por todos serem provenientes da mesma amostra histológica, porém em quantidade maior de cortes. Sendo assim, uma média foi estabelecida para cada grupo.

Os dados qualitativos obtidos foram confirmados através das imagens de coloração Picrosírius Red que foram capturadas para posteriormente serem quantificadas (Figura 24).

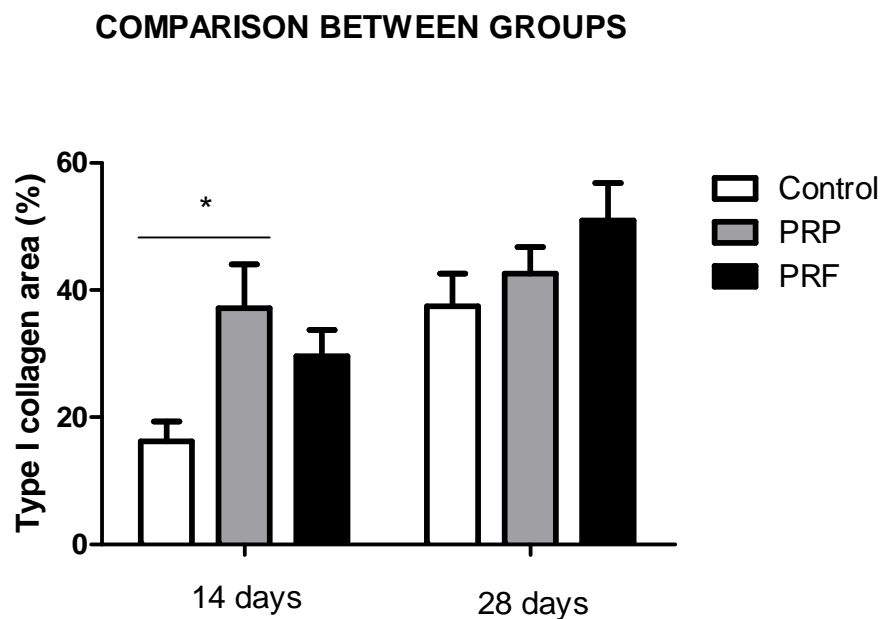




**Figura 24:** Imagens capturadas na coloração Picrosírius nos tempos de 14 (A, B e C) e 28 dias (D, E e F), sendo A e C correspondente ao grupo Controle, B e E ao grupo PRP e C e F referentes ao grupo experimental PRF. Aumento de 50X.

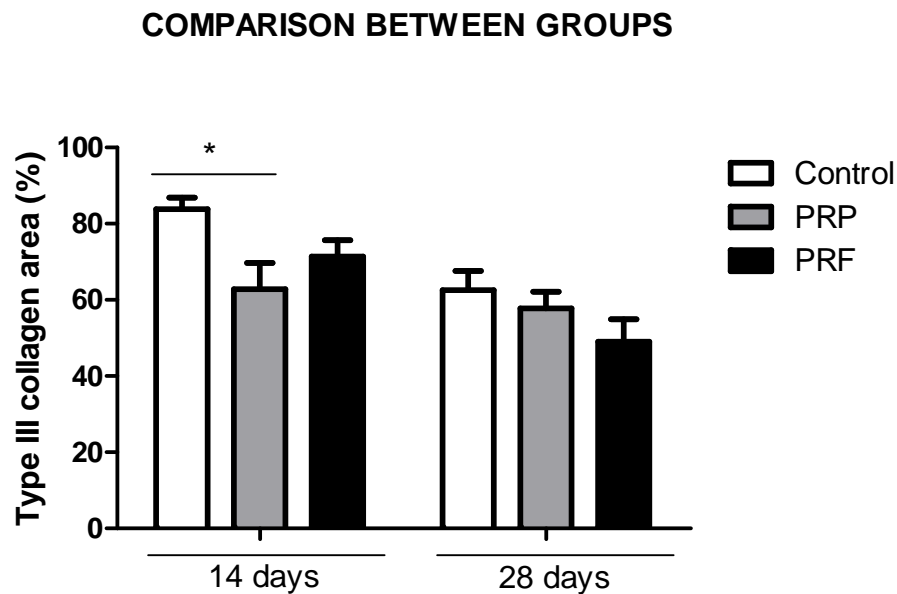
A análise da área de colágeno do tipo I, relativa aos grupos de diferentes tratamentos e tempos, demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa em ambos os

parâmetros analisados, com  $p \leq 0.05$  ( $p = 0.0256$  e  $0.0002$ , respectivamente). Após a análise de variância, foi realizado o teste *post-hoc* de Bonferroni para identificar quais grupos diferiram entre si. Houve diferença estatística somente entre o grupo Controle e o grupo PRP aos 14 dias após o tratamento ( $p = 0.01$ ). Ao comparar os grupos Controle e PRP aos 28 dias, os grupos Controle e PRF aos 14 e 28 dias, e os grupos PRP e PRF tanto aos 14 como aos 28 dias após o tratamento não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 25).



**Figura 25** – Comparação entre as áreas de colágeno do tipo I nos diferentes grupos tratados nos tempos 14 e 28 dias. \*  $p < 0.05$ . Controle, PRP e PRF,  $n = 7$ .

A análise do colágeno do tipo III foi realizada da mesma forma que o colágeno do tipo I. Houve diferença estatística entre os grupos de diferentes tratamentos ( $p = 0.034$ ) e entre os diferentes tempos, após o tratamento. Aos 14 dias decorridos da aplicação dos tratamentos, houve diferença significativa entre os grupos Controle e PRP. A comparação entre os demais grupos, Controle e PRP (28 dias), Controle e PRF (14 e 28 dias) e PRP e PRF (14 e 28 dias), não demonstrou diferença significativa ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 26).



**Figura 26** – Comparação entre as áreas de colágeno do tipo III dos diferentes grupos tratados nos tempos 14 e 28 dias. \*  $p < 0.05$ . Controle e PRP,  $n = 7$ . PRF,  $n = 8$ .

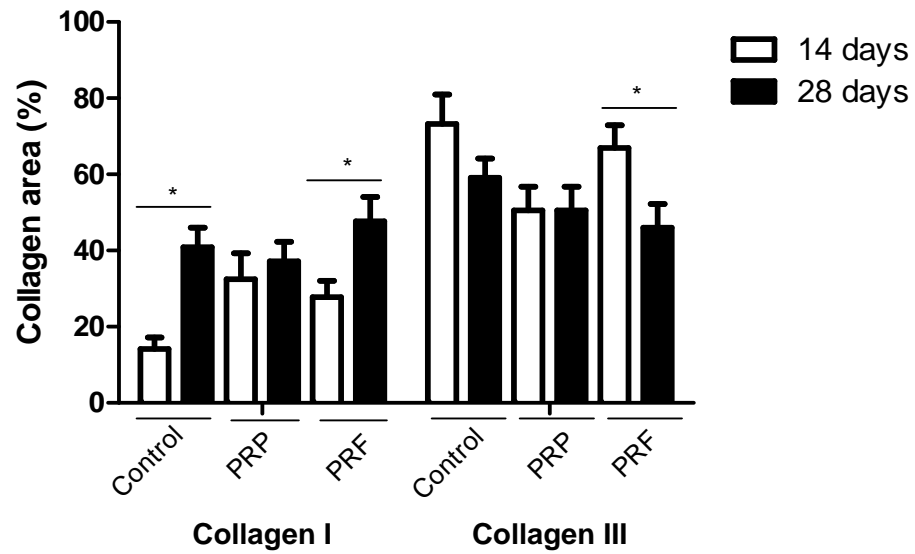
Ao comparar as áreas de colágeno dentro do grupo Controle quanto ao tempo, foi observada diferença significativamente estatística entre os grupos 14 dias e 28 dias ( $p = 0.01$ ) para o colágeno do tipo I, enquanto o valor de  $p$  foi  $\geq 0.05$  para o colágeno de tipo III entre 14 e 28 dias no grupo Controle (Figura 27).

Ao comparar as áreas de colágeno dentro do grupo PRP quanto ao tempo, não foi observada diferença significativamente estatística entre os grupos 14 dias e 28 dias para os dois tipos de colágeno (tipo I e III), onde  $p \geq 0.05$  (Figura 27).

Ao comparar as áreas de colágeno dentro do grupo PRF quanto ao tempo, foi observada diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os grupos 14 dias e 28 dias, tanto para o colágeno de tipo I, quanto para o colágeno de tipo III (Figura 27).

## Resultados

### INTRAGROUP COMPARISON AS TO THE TIME



**Figura 27** – Comparação intra-grupos quanto ao tempo e área de colágeno I em III nos grupos. \*  $p < 0.05$ . Controle e PRF,  $n = 7$ . PRP,  $n = 8$ .

## 6. DISCUSSÃO

O tecido tendíneo possui baixa capacidade de regeneração devido a sua escassa circulação sanguínea, oxigenação e nutrição, que são aspectos relevantes no processo de reparação de um tecido, para uma evolução adequada da regeneração<sup>32,59</sup>.

Em avaliação histológica microscópica realizada no presente estudo, foi observado na coloração Hematoxilina e Eosina o processo de reparo do tecido do tendão de Aquiles, que conforme literatura, ocorre em 3 fases que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e remodelamento<sup>32,46,53,65</sup>.

Muitos trabalhos científicos têm sido publicados sobre lesões de tendão com o objetivo de aperfeiçoar o reparo tecidual<sup>18</sup>. Nestes, diversos estudos têm demonstrado que a administração de FC como o  $\beta$ FGF e PDGF resultaram em melhores propriedades mecânicas do tendão reparado<sup>20,101</sup>.

Embora o efeito de FC na cicatrização do tendão é impressionante, tornou-se cada vez mais claro que o reparo do tendão não é acionado por um único FC, mas requer a interação de vários fatores<sup>67</sup>, o que justificou a utilização do PRP e PRF no nosso trabalho, já que os mesmos possuem uma gama de FC, que exercem, conforme Majewski *et al.* (2009)<sup>67</sup>, coletivamente, efeitos poderosos e abrangentes sobre a cicatrização.

Estudos experimentais têm demonstrado que a inflamação provoca ferimentos e liberação de diversos FC, onde se incluem o FC derivado de plaquetas (PDGF  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  e  $\alpha\beta$ ), o FC transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 2), o FC do endotélio vascular (VEGF) e o FC epitelial (EGF)<sup>72</sup>.

---

Diante destes preceitos, tanto o PRP quanto o PRF parecem se enquadrar dentro das propriedades ideais necessárias para uma rápida reparação e regeneração tendínea. Conforme Scutt *et al.*, 2008<sup>87</sup> a engenharia de tecidos acelera o processo de reparação dos tecidos, atribuindo-se as plaquetas uma linha promissora, já que estas possuem um papel fundamental na homeostasia<sup>87</sup> e são uma fonte natural de FC<sup>95</sup>, sendo liberadas imediatamente após a lesão<sup>83</sup>.

Ao preparamos o tratamento PRP, a contagem plaquetária foi realizada, viabilizando assim, o uso da amostra do sangue total. Conforme Anitua *et al.*, 2004<sup>9</sup>, concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ $\mu$ L são suficientes para o preparo do PRP, sendo que no nosso trabalho a concentração variou de 326.000 a 344.000, podendo então, vir a ser utilizada.

No presente estudo, o incremento de plaquetas do PRP quando comparado ao sangue total variou de 676,16 a 1.136,36%, estando de acordo com os padrões legais utilizados ao tratamento. Marx (1998)<sup>70</sup> e colaboradores determinaram que o PRP deve ter um incremento plaquetário superior a 338%, considerado por Obarrio *et al.* (2000)<sup>76</sup> e Whitman *et al.* (1997)<sup>100</sup> o número ideal para o tratamento apresentar efeitos benéficos.

Segundo Marx (2001)<sup>72</sup> e (2004)<sup>71</sup>, a concentração de plaquetas utilizadas como referência para o uso terapêutico do PRP é de 1.000.000 plaquetas/ $\mu$ L, coincidindo com o número de plaquetas que foram utilizadas no nosso estudo. Comprovações científicas foram realizadas, evidenciando que o aumento da cura dos tecidos moles ocorre nesta concentração, sendo que concentrações menores não foram evidenciadas para a cicatrização de feridas<sup>72</sup>.

Weibrich *et al.* (2004)<sup>99</sup> e colaboradores em um estudo realizado *in vivo*, a fim de avaliar a regeneração óssea, sugeriram que a eficácia do PRP é dependente da concentração de plaquetas obtidas. Em baixas concentrações (<1.000.000 plaquetas/ $\mu$ l), o PRP pode apresentar efeitos pouco expressivos e, paradoxalmente, em altas concentrações (>1.000.000 plaquetas/ $\mu$ l) parece exercer um efeito inibitório. Além disso, Choi *et al.* 2003<sup>24</sup> também verificou em um estudo *in vitro* o efeito dose dependente do PRP sobre a osteogênese, demonstrando que a viabilidade e proliferação de células ósseas alveolares são suprimidas em altas concentrações.

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de estabelecer uma cicatrização mais acelerada em tendões de Aquiles lesionados. Estudos realizados por Aspemberg e colaboradores no ano de 2004<sup>12</sup>, demonstraram que a injeção de um concentrado de plaquetas

---

pode melhorar o reparo do tendão de Aquiles em ratos. Melhora das propriedades mecânicas também foi encontrada utilizando-se PRP em tendinose de cavalos<sup>15</sup>.

Contudo, a real eficácia do PRP ainda é debatida<sup>70,86</sup>.

Apesar de todos os cuidados no manejo e protocolo de obtenção do tratamento PRP, nosso estudo sugere que o uso de Plasma Rico em Plaquetas, quando aplicado imediatamente após a lesão, não é eficaz para a aceleração do processo de regeneração do tendão de Aquiles em ratos, considerando os resultados histológicos obtidos nas colorações Hematoxilina e Eosina e Picrosírius Red nas nossas condições avaliadas.

Nossos achados corroboram com os resultados que recentemente vem sendo publicados, onde o PRP não tem efeito acelerado na regeneração do tendão de Aquiles. Em estudo clínico randomizado realizado por Schepull *et al.*, (2010)<sup>85</sup>, foi sugerido que o PRP não é útil para o tratamento de rupturas no tendão de Aquiles, já que o mesmo não demonstrou qualquer efeito benéfico na cicatrização pós ruptura, mas sim, impactos negativos. Da mesma forma, de Jonge *et al.* (2011)<sup>28</sup>, em estudo clínico randomizado, duplo cego e controlado, envolvendo 54 pacientes, não apontou qualquer efeito benéfico da utilização do PRP sobre a evolução clínica dos pacientes com tendinose.

Contudo, estudos recentes vêm explanando que o PRP, apesar de todas as suas propriedades, não demonstra superioridade clínica no reparo ou regeneração de alguns tecidos, como tendão<sup>28,85</sup>, nervo<sup>78</sup> e osso<sup>88</sup>, suportando os nossos achados.

Já a fibrina rica em plaquetas possui um protocolo de produção específico na tentativa de acumular plaquetas e liberar citocinas em um coágulo de fibrina<sup>30</sup>, suportando os nossos dados de contagem plaquetária, onde foi observada uma supressão de plaquetas de 89,04 a 95,10%, já que as mesmas estavam presentes na membrana de fibrina.

PRF, ao contrário do PRP, é preparado naturalmente, sem adição de trombina, e essa é a hipótese de que o PRF, por possuir um quadro de fibrina natural, pode proteger os fatores de crescimento da proteólise<sup>64</sup>. Além disso, a não utilização de fatores externos, faz com que não haja risco de reação imunogênica ou transmissão de doença<sup>84</sup>, ou seja, o método descrito para a preparação do PRF possui fácil manuseio, podendo ser facilmente implementado na clínica, tendo em vista sua simplificada aplicação.

A atividade biológica da molécula de fibrina parece ser a principal responsável pelas propriedades de homeostasia e capacidade cicatricial do PRF. A fibrina fornece uma matriz para a migração de células formadoras de tecido (fibroblastos e células endoteliais) que

---

participam do processo de angiogênese e são responsáveis pelo remodelamento do novo tecido<sup>8</sup>.

Fatores de crescimento TGF-1 e PDGF foram identificados no PRF<sup>30</sup>, demonstrando que essas moléculas solúveis e vários outros FC estejam presas nas malhas de fibrina do PRF, sendo lançadas relativamente a longo prazo<sup>84</sup>, com efeito controlado, fornecendo um andaime que poderia ajudar na qualidade e no tempo de reparo final da lesão<sup>48,83,84</sup>.

O PRF tem demonstrado ser uma membrana eficiente para a regeneração tecidual em sítios cirúrgicos. Na angiogênese os FC atuam na fase de estimulação, ocorrendo então crescimento vascular e aumento da síntese de colágeno através da proliferação dos fibroblastos<sup>97</sup>.

Em função de todas suas propriedades, o uso da fibrina rica em plaquetas autóloga tem sido proposto como uma estratégia para melhorar a resposta celular à lesão no tendão e, finalmente, a qualidade de reparação<sup>83</sup>, o que pode ser verificado nas duas análises histológicas do nosso trabalho, onde PRF tende a ter uma acelerada regeneração do tecido tendíneo.

Apesar das plaquetas, leucócitos e citocinas desempenharem comprovadamente um papel importante na biologia destes biomateriais, no PRF a matriz de fibrina certamente constitui o elemento determinante responsável para o seu real potencial terapêutico<sup>44,90</sup> em contraste ao PRP.

Conforme a cicatrização progride, o número de fibroblastos proliferantes e vasos novos diminuem; no entanto, os fibroblastos assumem progressivamente um fenótipo mais sintético e, conseqüentemente, há um aumento de deposição de matriz extracelular Abbas *et al.* (2008)<sup>1</sup>, o que pode ser notado nas imagens de coloração Hematoxilina e Eosina principalmente no grupo PRF, onde aos 28 dias há uma regressão vascular progressiva e o tecido de granulação que aos 14 dias encontrava-se altamente vascularizado, transforma-se em uma cicatriz pálida, basicamente avascular. Tais aspectos, nesta mesma coloração, não puderam ser observados desta forma nos grupos experimentais Controle e PRP.

Nosso estudo demonstrou que PRP e Solução salina 0,9%, em relação à área de colágeno I e III na coloração Picosírius, apresentavam efeitos semelhantes no processo de regeneração do tendão de Aquiles de ratos em 28 dias. Diferente destes dois tratamentos, PRF demonstrou uma cicatrização mais acelerada, com níveis de colágeno I um pouco mais elevados no tempo de 28 dias, porém não significativo. Já, quando comparados macroscopicamente, através de coloração Hematoxilina e Eosina, PRF demonstrou ser

---



superior na aceleração da cicatrização, tanto em 14 quanto em 28 dias. Já o grupo PRP e Controle, tanto em 14 quanto em 28 dias macroscopicamente também foram similares, diferindo apenas nas áreas hemorrágicas, onde PRP apresentou hemorragia nos dois tempos avaliados e o grupo Controle somente no período de 14 dias.

Dohan *et al.* (2006)<sup>30</sup>, também observaram que o PRF teria necessariamente vários efeitos que diferiam do PRP. PRP teria um efeito maciço e incontrolável em curto prazo em função de suas altas taxas de trombina, iniciando assim uma polimerização rápida. Já o PRF, por derivar de uma fonte natural, teria uma polimerização progressiva que ocorre durante a centrifugação. Essa polimerização progressiva ou relativamente lenta pode vir a aumentar a incorporação da circulação de citocinas nas malhas de fibrina<sup>30</sup>.

Quando observado o comportamento de regeneração nos três tratamentos, aos 14 dias para colágeno I, o grupo experimental PRP possuía maior área de colágeno I e menor área de colágeno tipo III, demonstrando diferença significativa perante os outros grupos experimentais. No entanto, quando avaliado quantitativamente aos 28 dias, as áreas de colágeno I e III mantiveram-se, não havendo diferença significativa no tempo.

He *et al.* (2009)<sup>48</sup> concluiu que a maneira de liberação dos fatores de crescimento inseridos no PRP e PRF difere entre si. PRF libera seus fatores de crescimento de forma gradual, e mantém a sua atividade a um período relativamente longo quando comparado ao PRP, o que pode explicar a estagnação do aparecimento de colágeno tipo I aos 28 dias no grupo PRP. Conforme modelo experimental realizado por He *et al.* (2009)<sup>48</sup>, que utilizou ratos, foi verificado que PRF não só prolonga a liberação de fatores de crescimento, mas adia o pico de liberação. PRP atingiu o pico dos níveis dos FC TGF-1 e PDGF-AB no primeiro dia. Em contraste, PRF teve o pico dos níveis desses fatores aos 14 dias, ou seja, atrasou o pico para duas semanas mais tarde do que o PRP. Após 14 dias, PRF ainda mantinha os níveis de FC estatisticamente mais elevados dos FC do que o PRP.

Segundo Abbas *et al.* (2008)<sup>1</sup>, alguns FC estimulam a proliferação de determinadas células e inibem o ciclo de outras, ou seja, um fator de crescimento pode ter efeitos opostos na mesma célula dependendo da sua concentração. Acredita-se que tal parâmetro tenha sido um fator limitante ao nosso trabalho, já que a concentração dos fatores de crescimento de cada amostra utilizada não foi quantificada anteriormente a aplicação do tratamento na lesão, o que poderia vir a explicar a ineficácia do PRP.

---

Entretanto, muitos FC que estão envolvidos no reparo são produzidos pelos leucócitos que são recrutados para o local da lesão ou são ativados nesse local, como parte do processo inflamatório<sup>1</sup>. No hemograma realizado anteriormente a aplicação do tratamento PRP, notou-se um aumento de 33 a 125 % na quantidade de leucócitos por microlitro em relação ao sangue total do rato, confirmando assim que fatores de crescimento encontravam-se presentes na Plasma rico em plaquetas preparado pelo nosso grupo de pesquisa.

Quando comparado o tratamento PRF intra-grupo, a área tanto para colágeno I quanto para colágeno III quanto ao tempo de 14 e 28 dias, apresentou diferença significativa ( $p < 0.05$ ). No tratamento com solução salina 0,9%, para colágeno I quando comparado nos dois tempos também demonstrou diferença significativa ( $p < 0.05$ ), o que não pode ser observado no tempo de 14 e 28 dias para colágeno tipo I e III no grupo tratado com PRP, explanando uma cicatrização mais tardia. Colágeno tipo I e III são os principais componentes da matriz extracelular em tendões<sup>89</sup>, onde colágeno tipo I representa de 65 a 95% da massa seca do tendão e colágeno tipo III aproximadamente 10 %<sup>62,80,82</sup>.

Colágeno tipo I representa 95% de todos os tipos de colágeno presente no tendão<sup>51,62,80</sup>. Na coloração Picrosírius Red, foi observado em nosso trabalho que concomitantemente ao aumento da área de colágeno tipo I no grupo experimental PRF aos 28 dias (47,74%), houve diminuição na área de colágeno tipo III (46,00%). Em contraste, grupo Controle e PRP aos 28 dias tiveram maior área de colágeno tipo III (59,07% e 50,57%) e menor porcentagem de colágeno tipo I (40,91% e 37,24%). Já aos 14 dias, a porcentagem de colágeno tipo III foi maior nos grupos Controle (73,30%) e PRF (66,94%), se mantendo no grupo PRP igual como aos 28 dias (50,57%). Conforme literatura, a síntese de colágeno tipo III aumenta durante o reparo precoce, mas acredita-se que quando ele diminua, o tipo de colágeno I seja sintetizado e organizado<sup>51,62,80</sup>.

Alguns cortes da coloração Picrosírius Red não puderam ser contabilizados, devido à má confecção dos cortes histológicos e coloração, perdendo-se então algumas amostras, o que influenciou na significância do trabalho.

Em estudo experimental realizado por Eliasson *et al.* (2009)<sup>31</sup>, em ratos, foi demonstrado que o terceiro dia após a lesão corresponde à fase inflamatória, onde os dias 8 e 14 se referem à fase proliferativa e dia 21 de remodelação, sendo, portanto a inflamação a primeira etapa do processo de cicatrização dos tecidos colágenos<sup>31</sup>. No presente estudo optou-se por avaliar os dias 14, referente à fase proliferativa, bem como o dia 28 a fim de visualizar

---

uma completa regeneração tendínea. No entanto, no período de 28 dias não foi verificado uma cicatrização completa no tendão de Aquiles lesionado de ratos. Acredita-se que tal aspecto ocorreu devido à cicatrização primária do tendão progredir a um ritmo relativamente mais lento do que a cura de outros tecidos conjuntivos, devido à sua baixa vascularização e os componentes celulares expressos no tecido tendíneo<sup>21,62</sup>.

Em função disto, seriam necessários novos experimentos a fim de avaliar a progressão da cicatrização, o que foi considerado um fator limitante ao nosso estudo devido ao elevado número de animais que seriam necessários para tal.

Contudo, seguindo esta linha, pode-se dizer que existe uma tendência na melhora e na aceleração da cicatrização, através da utilização da Fibrina rica em plaquetas, quando comparado a solução salina 0,9% e Plasma rico em Plaquetas no tendão de Aquiles de ratos. E, portanto, pode-se deduzir que PRF tem uma perspectiva interessante no uso clínico, sendo necessários, porém mais estudos experimentais e clínicos a fim de determinar a validade do procedimento.

Testes funcionais, como o teste biomecânico, seriam interessantes de serem analisados a fim de avaliar a força de ruptura, o que contribuiria aos nossos resultados, estimulando assim, a continuação desta pesquisa.

---

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo e levando em conta as limitações do mesmo, pode-se concluir que:

- Solução salina 0,9% e Plasma Rico em Plaquetas possuem efeito semelhante na regeneração do tendão de Aquiles em ratos.
  - No período precoce de reparação tendínea (14 dias), o grupo PRP apresentava mais colágeno tipo I (37,16%) em relação ao PRF (29,62%), demonstrando diferença significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo Controle (16,22%).
  - O Plasma rico em plaquetas não promove a cicatrização acelerada no Tendão de Aquiles de ratos num período de 28 dias.
  - Existe diferença significativa quando avaliados quantitativamente intra-grupos no tempo de 14 e 28 dias tanto para colágeno tipo I quanto para o tipo III no grupo experimental PRF ( $p < 0.05$ ), bem como aos 14 dias para colágeno tipo I no grupo Controle.
  - Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a Fibrina Rica em Plaquetas tem tendência a promover a regeneração acelerada do tendão de Aquiles de ratos, trazendo perspectivas promissoras para futuras utilizações na clínica.
-

## REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**. 8 ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 1.048p.
  2. 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.* 1996; 14: 370.
  3. ABRAHAMSSON, S.O. **Similar effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and II on cellular activities in flexor tendons of young rabbits: experimental studies in vitro**. *J Orthop Res.* 1997; 15: 256-262.
  4. 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.* 2002; 20: 849–856.
  5. ACKERMANN, P. W.; LI, J.; LUNDEBERG, T. *et al.* **Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat Achilles tendon**. *J Orthop Res.* 2003; 21:432–441.
  6. AHTIKOSKI, A.M.; KOSKINEN, S.O.A.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; RISTELI, J.; TAKALA, T.E.S. **Type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions**. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177: 473-481.
-

7. AKEDA, K.; AN, H.S.; PICHKA, R., *et al.* **Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads.** *Spine*, 2006; 31: 959–966.
  8. ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; NURDEN, A.T. *et al.* **New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies.** *Trends in Biotechnology*. 2006; 24 (5): 227-234.
  9. ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. **Autologous platelets as a source for healing and tissue regeneration.** *Thromb Haemost.* 2004; 91: 4-15.
  10. ARNOLD, F.; WEST, D.C. **Angiogenesis in wound healing.** *Pharmacol Ther.* 1991; 52: 407–422.
  11. ASPENBERG, P.; FORSLUND, C. **Enhanced tendon healing with GDF-5 and 6.** *Acta Orthop Scand.* 1999; 70: 51–54.
  12. ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. **Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats.** *Acta Orthop Scand.* 2004; 75 (1): 93–99.
  13. BAR-SHAVIT, R.; KAHN, A.; FENTON, J.W.; WILNER, G. D. **Chemotactic response of monocytes to thrombin.** *J Cell Biol.* 1983; 96: 282-5.
  14. BIRK, D.E.; ZYCBAND, E.I.; WOODRUFF, S.; WINKELMANN, D.A.; TRELSTAD, R.L. **Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures.** *Developmental Dynamics.* 1997; 208: 291-298.
  15. BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T.; DE, GROOT M.W. *et al.* **Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study.** *J Orthop Res.* 2010; 28 (2): 211-217.
  16. BOYER, M.I.; WATSON, J.T.; LOU, J.; MANSKE, P.R.; GELBERMAN, R.H.; CAI, S. R. **Quantitative variation in vascular endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model.** *J Orthop Res.* 2001; 19: 869-872.
  17. BRING, D.K.; KREICBERGS, A.; RENSTROM, P.A., *et al.* **Physical activity modulates nerve plasticity and stimulates repair after Achilles tendon rupture.** *J Orthop Res.* 2007; 25:164–172.
-

18. CASALECHI, R. H.; NICOLAU, R. A.; CASALECHI, V. L.; SILVEIRA JR., L.; PAULA, A. M. B.; PACHECO, M. T. T. **The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats.** *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 659–665.
  19. CHAN, B.P., AMANN, C., YAROSLAVSKY, A.N. *et al.* **Photochemical Repair of Achilles Tendon Rupture in a Rat Model.** *Journal of Surgical Research.* 2005; 124: 274–279.
  20. CHAN, B.P.; FU, S.C.; QIN, L.; LEE, K.M.; ROLF, C.G.; CHAN, K.M. **Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model.** *Acta Orthop Scand.* 2000; 71: 513-518.
  21. CHANG, J.; MOST, D.; STELNICKI, E. *et al.* **Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: Evidence for dual mechanisms of repair.** *Plast. Reconstr. Surg.* 1997; 100: 937.
  22. CHANG, J.; MOST, D.; THUNDER, R.; MEHRARA, B.; LONGAKER, M. T.; LINEAWEAVER, W. C. **Molecular studies in flexor tendon wound healing: The role of basic fibroblast growth factor gene expression.** *J. Hand Surg. (Am.)* 1998; 23: 1052.
  23. CHEN, L. B.; BUCHANAN, J. M. **Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72: 131-135.
  24. CHOI, B. H.; IM, C. J.; HUH, J. Y. *et al.* **Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft.** *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery,* 2003; 33 (4): 56-59.
  25. CHOUKROUN, J. ; DISS, A.; SIMONPIERI, A. *et al.* **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: 56-60.
  26. CHOUKROUN, J.; ADDA, F.; SCHOEFFLER, C.; VERVELLE, A. **Une opportunité en paro-implantologie: le PRF.** *Implantodontie.* 2000; 42: 55-62.
  27. DAHLGREN, L.A.; MOHAMMED, H.O.; NIXON, A.J. **Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions.** *J Orthop Res.* 2005; 23: 84-92.
-

- 
28. DE JONGE, S.; DE VOS, R. J.; WEIR, A. **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 (8): 1623-1629.
  29. DINES, J. S.; WEBER, L.; RAZZANO, P.; PRAJAPATI, R.; TIMMER, M.; BOWMAN, S.; BONASSER, L.; DINES, D. M.; GRANDE, D. P. **The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model.** *J Shoulder Elbow Surg.* 2007; 16 (5S).
  30. 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(3): 45-50.
  31. ELIASSON, P.; ANDERSSON, T.; ASPENBERG, P. **Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression.** *J Appl Physiol.* 2009; 107: 399-407.
  32. ENWEMEKA, C.S.; **Inflammation, Cellularity, and Fibrillogenesis in Regeneration Tendon: Implications for Tendon Rehabilitation.** *Physical Therapy.* 1989a; 69: 816-825.
  33. ENWEMEKA, C.S.; SPIELHOLZ, N. I. **Modulation of Tendon Growth and Regeneration by Electrical Fields and Currents.** IN: CURRIER, D.P.; NELSON, R.M. *Dynamics of Human Biologic Tissue.* Philadelphia: F. A. Davis Company, cap.3, p.231-254, 1992.
  34. ENWEMEKA, C.S.; **The effects of Therapeutic Ultrasound on Tendon Healing a Biomechanical Study.** *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation,* 1989b; 283-287.
  35. EPPLEY, B. L. *et al.* **Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery.** *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118 (6): 147-159e.
  36. EPPLEY, B.L.; WOODSELL, J.E.; AND HIGGINS, J. **Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing.** *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 114 (6): 1502-1508.
  37. EVANS, C. H. **Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons.** *Am. J. Sports Med.* 1999; 28: 71.
-



- 
38. EVERTS, P. A. *et al.* **Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release.** *Growth Factors.* 2006; 24 (3): 165-71.
  39. EYDEN, B.; TZAPHLIDOU, M. **Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy.** *Micron.* 2001; 32: 287-300.
  40. FLAMME, I.; VON REUTERN, M.; DREXLER, H. C.; SYED-ALI, S.; RISAU, W. **Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation.** *Dev. Biol.* 1995; 171: 399.
  41. FORSLUND, C.; REUGER, 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.* 2003; 21: 617-21.
  42. GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. **Atlas Colorado de Histologia.** 4ª ed. Editora Guanabara Koogan. 2007.
  43. GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. **Tratado de Histologia em cores.** 2ª ed. Editora Guanabara Koogan. 2003.
  44. GAULTIER, F.; NAVARRO, G.; DONSIMONI, J-M.; *et al.* **Platelet concentrates. Part 3: Clinical applications.** *Implantodontie,* 2004; 13: 3-11.
  45. 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.)* 1991; 73: 868.
  46. GOFFI, F. S. **Técnica cirúrgica - Bases anatômicas, fisiopatologias e técnicas da cirurgia (Surgical techniques - anatomical physiopathological and surgical techniques).** 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. pp. 126-252.
  47. GONSHOR, A. **Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: Background and process.** *Int. J. Periodontics Restorative Dent.,* 2002; 22 (6): 547-557.
  48. HE, L.; LIN, Y.; HU, X. *et al.* **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(5):707-713.
-

- 
49. HIPPENSTIEL, S.; KRULL, M.; IKEMANN, A.; RISAU, W.; CLAUSS, M.; SUTTORP, N; **VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells.** *Am. J. Physiol.* 1998; 274: L678.
  50. HOKUGO, A.; OZEKI, M.; KAWAKAMI, O. *et al.* **Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel.** *Tissue Eng.*, 2005; 11: 1224.
  51. HOLZ, U. **Achilles tendon rupture and achillodynia. The importance of tissue regeneration.** *Fortschr. Med.* 1980; 98: 1.517-1.520.
  52. JÓZSA, L.; KANNUS, P. **Human Tendons.** United States of America: Human Kinetics, 1997.
  53. JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.
  54. KANNUS P.; NATRI, A. **Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports.** *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 1997; 7: 107-112.
  55. KANNUS, P. **Structure of the tendon connective tissue.** *Scand J Med Sci Sports*, 2000; 10: 312–320.
  56. KAWASUMI, M.; KITO, H.; SIWICKA, K.A. *et al* **The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone.** *J Bone Joint Surg Br*, 2008; 90: 966.
  57. KEVY, S.V.; JACOBSON, M. S. **Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel.** *Journal of Extracorporeal Technology.* 2004; 36(1): 28-35.
  58. KHAN, K.M.; COOK, J.L.; BONAR, F.; HARCOURT, P.; ASTROM, M. **Histopathology of Common Tendinopathies – Update and Implications for Clinical Management.** *Sports Medicine.* 1999; 27(6): 393-404.
  59. KLEINERT, H.E.; SCHEPEL, S.; GILL, T. **Flexor tendon injuries.** *Surg Clin North America.* 1981; 61: 267–286.
  60. KURTZ, C.A.; LOEBIG, T.G.; ANDERSON, D.D.; DEMEO, P.J.; CAMPBELL, P.G. **Insulinlike growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model.** *Am J Sports Med.* 1999; 27: 363-369.
-

- 
61. LANDESBERG, R. *et al.* **Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation.** *J Oral Maxillofac Surg*, 2000; 58 (3): 297-301.
  62. LIU, S. H.; YANG, R. S.; AL-SHAIKH, R.; LANE, J. M. **Collagen in tendon, ligament, and bone healing: A current review.** *Clin. Orthop.* 1995; 318: 265.
  63. LONGO, U.G., RONGA, M., MAFFULLI, N. **Acute ruptures of the achilles tendon.** *Sports Med Arthrosc*, 2009; 17: 127–138.
  64. LUNDQUIST, R.; DZIEGIEL, M.H.; AGREN, M.S. **Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin.** *Wound Repair Regen*, 2008; 16: 356-363.
  65. MAFFULLI, N.; MOLLER, H.D.; EVANS, C.H. **Tendon healing: can it be optimized.** *Br J Sports Med.* 2002; 36: 315–316.
  66. MAIA, L.; SOUZA, M. V.; ALVES, G. E. S. *et al.* **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica.** *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2009; 29(3): 241-245.
  67. MAJEWSKI, M.; OCHSNER, P. E.; LIU, F.; FLÜCKIGER, R.; EVANS, C. H. **Accelerated Healing of the Rat Achilles Tendon in Response to Autologous Conditioned Serum.** *American Journal of Sports Medicine.* 2009; 37(11): 2.117-2.125.
  68. MAJEWSKI, M.; WIDMER, K. H.; STEINBRUCK, K. **Achilles tendon ruptures: 25 years experience in sport-orthopedic treatment [in German].** *Sportverletz Sportschaden.* 2002; 16:167-173.
  69. MARUI, T.; NIYIBIZI, C.; GEORGESCU, H. I., *et al.* **Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts.** *J. Orthop. Res.* 1997; 15: 18.
  70. MARX, R. E. *et al.* **Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1998; 85 (6): 638-646.
  71. MARX, R.E. **Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use.** *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62: 489-496.
  72. MARX, R.E.; **Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?** *Implant Dent.* 2001; 10(4): 225-228.
  73. MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G.A.C. **The roles of growth factors in tendon and ligament healing.** *Sports Med.* 2003; 33: 381-394.
-

- 
74. MURRAY, M.M.; SPINDLER, K.P.; BALLARD, P. *et al.* **Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagenplatelet- rich plasma scaffold.** *J Orthop Res.* 2007.
  75. NAGAE, M.; IKEDA, T.; MIKAMI, Y.; HASE, H.; OZAWA,H.; MATSUDA, K. I.; SAKAMOTO, H.; TABATA, Y.; KAWATA, M.; KUBO, T. **Intervertebral Disc Regeneration Using Platelet-Rich Plasma and Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres.** *Tissue Engineering.* 2007; 13 (1): 147-158.
  76. OBARRIO, J.J. *et al.* **The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports.** *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry.* 2000; 20 (5): 487-497.
  77. PEACOCK, E. E. JR. **A study of the circulation in normal tendons and healing grafts.** *Ann Surg.* 1959; 149: 415–428.
  78. PISKIN, A. *et al.* **Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study.** *Microsurgery.* 2009; 29 (2): 144-53.
  79. RICKERT, M.; JUNG, M.; ADIYAMAN, M.; RICHTER, W.; SIMANK, H. **Growth and differentiation factor-5-coated (GDF-5)-suture stimulates tendon healing in an achilles tendon model in rats.** *Growth Factors.* 2001; 19: 115-126.
  80. RILEY, G.P.; HARRALL, R.L.; CONSTANT, C.R.; CAWSTON, T.E.; HAZLEMAN, B.L. **Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis.** *Ann Rheum Dis.* 1994; 53: 359-366.
  81. RODEO, A.S. **Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair.** *J Shoulder Elbow Surg,* 2007; 16 (5S): 191-197.
  82. RUFAL, A.; RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M. **Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon.** *J Orthop Res.* 1995; 13: 585-593.
  83. SANCHEZ, M.; ANITA, E.; AZOFRA, J. M. *et al.* **Comparison of surgically repaired achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices.** *The American Journal of Sports Medicine,* 2007 35: 245-251.
  84. SARRAFIAN, T. L.; WANG, H.; HACKETT, E.S. **Comparison of Achilles Tendon Repair Techniques in a Sheep Model Using a Cross-linked Acellular Porcine**
-

- 
- Dermal Patch and Platelet-rich Plasma Fibrin Matrix for Augmentation.** *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, 2010; 49: 128–134.
85. SCHEPULL, T.; KVIST, J.; NORRMAN, H. *et al.* **Autologous Platelets Have No Effect on the Healing of Human Achilles Tendon Ruptures.** *The American Journal of Sports Medicine*. 2010; 20 (10): 1-10.
86. SCHLEGEL, K.A.; DONATH, K.; RUPPRECHT, S. *et al.* **De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma.** *Biomaterials*, 2004; 25: 5387-5393.
87. SCUTT, N.; ROLF, C. G. SCUTT, A. **Tissue specific characteristics of cells isolated from human and rat tendons and ligaments.** *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2008; 32(3):1-11.
88. SEBEN, A.D. **Efeito de cimento de alfa-fosfato tricálcico e plasma rico em plaquetas na regeneração de tecido ósseo.** 2010. 138p. Dissertação de Mestrado em Clínica Cirúrgica - (Curso de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
89. SHARMA, P.; MAFFULLI, N. **Tendon injury and tendinopathy: healing and repair.** *J Bone Joint Surg Am*, 2005; 87: 187–202.
90. SIMONPIERI, A.; CHOUKROUN, J.; GIRARD, MO. *et al.* **Immediate post-extraction implantation: interest of the PRF.** *Implantodontie*, 2004; 13: 177-189.
91. SLATER, M.; PATAVA, J.; KINGHAM, K. *et al.* **Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity.** *J Orthop Res.*, 1995; 13: 655
92. SPINDLER, K.P.; MURRAY, M.M.; CAREY, J.L. *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*, 2009; 27: 631.
93. STIERNBERG, J.; NORFLEET, A. M.; REDIN, W. R. *et al.* **Acceleration of full-thickness wound healing in normal rats by the synthetic thrombin peptide, TP508.** *Wound Repair Regen*, 2000; 8: 204-15.
94. SUCHAK, A. A.; BOSTICK, G.; REID, D.; BLITZ, S.; JOMHA, N. **The incidence of Achilles tendon ruptures in Edmonton, Canada.** *Foot Ankle Int*. 2005; 26: 932-936.
95. SUNITHA, R.V.; MUNIRATHNAM, N. E. **Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate.** *Indian Journal of Dental Research*, 2008; 19: 42-46.
-

- 
96. TOMAK, S.L.; FLEMING, L.L. **Achilles tendon rupture: an alternative treatment.** *Am J Orthop.* 2004; 33: 9-12.
97. VASCOCELLOS, A. V. B.; TEIXEIRA, A. P. F.; CRUZ, P. V. **Plaqueta rica em fibrina: um novo conceito em reparação tecidual.** *Innovations Implant Journal – Biomaterials and Esthetics*, 2008; 3(6):27-31.
98. VIRCHENKO, O.; GRENEGÅRD, M.; ASPENBERG, P. **Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets.** *Acta Orthopaedica.* 2006; 77 (6): 960–966.
99. WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W.; *et al.* **Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration.** *Bone*, 2004; 34 (4): 665-671.
100. WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. **Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery.** *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55 (11): 1294-1299.
101. WOO, S. L.; SMITH, D. W.; HILDEBRAND, K. A., *et al.* **Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament.** *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998; 36: 359.
102. YASUDA, T.; KINOSHITA, M.; ABE, M. *et al.* **Unfavorable effect of knee immobilization on Achilles tendon healing in rabbits.** *Acta Orthop Scand*, 2000; 71: 69–73.
103. YOSHIKAWA, Y.; ABRAHAMSSON, O. **Dose-related cellular effects of platelet-derived growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro.** *Acta Orthop Scand.* 2001; 72: 287-292.
104. ZHANG, F.; LIU, H.; STILE, F.; LEI, M.P.; PANG, Y.; OSWALD, T.M.; BECK, J.; MARTIN, W. D.; WEAVER, W.C.L. **Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Rat Achilles Tendon Healing.** *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2003; 112 (6): 1613-1619.
-

23/01/12

ScholarOne Manuscripts



Journal of Orthopaedic Research

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™  
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Authoring Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged in as FRANCIELE DIETRICH

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Orthopedic Research*,

Manuscript ID: JOR-12-0049

Title: COMPARISON OF THE EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA AND PLATELET-RICH FIBRIN IN THE REPAIR OF ACHILLES TENDON OF RATS

DIETRICH, FRANCIELE  
Lançanova Dure, Gustavo  
Authors: Peres Klein, Caroline  
Duval da Silva, Vinicius  
Braga Silva, Jefferson

Date Submitted: 22-Jan-2012

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2011. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

[Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

---

**COMPARISON OF THE EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA AND  
PLATELET- RICH FIBRIN IN THE REPAIR OF ACHILLES TENDON OF RATS**

Dietrich, F.<sup>1\*</sup>; Duré, GL.<sup>1</sup>; Klein, CP.<sup>1</sup>, Da Silva, VD.<sup>2</sup>; Silva Braga, J.<sup>1,3</sup>

1 Laboratory of Medical Skills and Research Surgery, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS, Brazil.

2 Service of Pathology Anatomy and Cytopathology, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS, Brazil.

3 Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS, Brazil.

\* Author correspondence. Johann Jacob Benito Street, 79. ZIP Code: 95940000. Phone: (5551) 99332376 and (5551) 33203500 - 4816.

\* E-mail address: francidi05@gmail.com (Franciele Dietrich)

**ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate and compare the effect of using Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in repairing rats Achilles tendon (AT).

**Material and Methods:** Forty-eight adult male rats randomized into three experimental groups: PRP, PRF and Control (saline 0.9%). A 3 cm longitudinal incision was made in the right leg of each rat in order to expose the AT. Later, it was made a break in the same horizontal, and the repair performed with suture Kessler-type, when the sequence was applied 50 µL of the treatment in question. After 14 and 28 days postoperatively, the targeted part of the AT was removed, thus initializing the histological processing (Hematoxylin/Eosin; Sirius Red) to obtain results. The data obtained were expressed at 5% significance level ( $p < 0.05$ ) with mean  $\pm$  SE.

---



**Results:** When comparing the three groups together, as to time and area of collagen type I and III, only statistical difference between the control group (16.22%) and the PRP group (37.16%) at 14 days after the treatment, no statistically significant difference was observed in the other groups. In the same way, when compared within groups of 14 and 28 days, the PRF group showed a significant difference for collagen I (27.76% and 47.74%) and III (66.94% and 46%) respectively. Control group showed significant difference in collagen type I (14.20% and 40.90%), not observed any significant difference in the PRP group. When evaluated on Hematoxylin/Eosin staining, PRP and control were similar in the times studied, differing only in the presence of hemorrhage, that was more expressed in the PRP group. Already the group PRF has shown to be more organized, especially in time of 28 days compared to the other two treatments.

**Conclusion:** The data from this study suggest that the Platelet-Rich Fibrin tends to promote the accelerated regeneration of the Achilles tendon of rats, bringing promising prospects for future use in clinic.

**Keywords:** tissue repair, growth factors, injury, tendon, platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin.

## 1. INTRODUCTION

Tendon injuries are a constant challenge in orthopedic medicine, with an annual incidence estimated at one break per 10.000 people<sup>50</sup>, affecting the whole population and athletes<sup>23</sup>, which stimulates the development of research aimed the improving and acceleration of the repair and regeneration of the injured tendon.

However, this situation can be improved through the use of tissue engineering, thus accelerating the process of repairing it<sup>44</sup>, attributing the platelets a promising line, since these have a key role in homeostasis and a natural source of growth factors<sup>51</sup>. The platelet-rich plasma (PRP) is a plasma volume with high platelet count<sup>33</sup>, and is known to have different types of growth factors in high concentrations<sup>26,48</sup> and is therefore seen as a natural source of growth factors, easy acquisition and low cost associated<sup>30</sup>. Several studies have evidenced the efficacy of PRP in the repair and regeneration of various

---

tissues<sup>2,20,24,34,49</sup> including tendon<sup>5,16</sup> and others, by contrast, do not demonstrate the clinical superiority of PRP in the repair or regeneration of some tissues such as nerve<sup>37</sup> and tendon<sup>12,42</sup>.

The platelet-rich fibrin consists of a concentrate of platelets on fibrin membrane with a high potential for tissue repair<sup>111,13</sup>, it was obtained from autologous blood and without addition of external factors<sup>52</sup>.

The aim of this study was to evaluate and compare the effect of using platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in repairing rats Achilles tendon.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animal Model**

There were used 54 rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) adult male, weighing approximately 280g. The Research Ethics Committee for Animal Use approved this study. The animals were randomized divided into three groups: control (n = 16), PRP (n = 16) and PRF (n = 16). Evaluations were performed at 14 days (n = 8) and 28 days (n = 8) for each group respectively.

The rats were anesthetized with Ketamine Hydrochloride (60 mg.kg<sup>-1</sup>) and Meperidine (20 mg.kg<sup>-1</sup>) associated both intramuscularly, applied in the left leg of each rat. Trichotomy was performed in the region as well as antisepsis with 70% alcohol, where later a superficial longitudinal incision was performed 3 cm in the right leg of each rat, thus exposing the Achilles Tendon. With the aid of surgical microscope (DF Vasconcellos) was held in a horizontal rupture of Achilles tendon of rats in experimental groups. The repair was used Kessler-type suture using mononylon 7-0 (Ethicon Somerville, NJ) was applied on the lesion 50µL of the treatments in question: PRP, PRF and 0.9% saline solution. The skin was restored by suturing, using Vicryl 5-0 (Ethicon). As analgesics and anti-inflammatory, Ketoprofen was administered subcutaneously once daily for 3 days (5 mg kg, intramuscularly).

Six animals, corresponding to the donor, died from exsanguination technique in order to obtain the treatments. After 14 and 28 days postoperatively, the euthanasia was performed

---

of experimental animals (n = 48) by an intracardiac injection with a lethal dose of Thiopental. The tissue sample corresponding to the injured area of the Achilles tendon was removed, starting the booting process to obtain histologic results.

## 2.2 Platelet-Rich Plasma

Platelet-Rich Plasma was prepared 2 hours before the surgical procedures. Approximately 6 mL of blood was collected from donor animals via cardiac puncture with the aid of a syringe containing 1.2 mL of Acid Citrate Dextrose anticoagulant (ACD Solution A - Becton Dickinson and Company Broken Bow, BJ, USA). The sample was subjected to centrifugation (Centrifuge Model CentriBio-80-2B) at 1800 RPM (250 X g, 10 minutes)<sup>35</sup> where the blood, according to the density gradient, divided into three layers: 1 - plasma poor in platelets (PPP). 2 - area of haze (platelets and leukocytes) 3 - erythrocytes. The supernatant, along with the zone of mist and small quantity of red blood cells with the aid of pipette, was transferred to another tube that was submitted to a second centrifugation at 3.600 RPM (1.000 X g, 10 minutes)<sup>35</sup>. By this way, was obtained only the platelets in the high concentration (600 µL, PRP), where a portion of 50 µL, already activated with (CaCl<sub>2</sub>) and thrombin combined (in 1.000U/mL in 100mg of Calcium Chloride) was applied separately in each lesion. The platelet count was carried out from the Automatic Blood Counter - ABC Vet TM - Horiba Medical.

## 2.3 Platelet-Rich Fibrin

Following the same procedures and care used in production of PRP was collected approximately 6 mL of blood from each donor animal through cardiac puncture. The sample was placed in Falcon tubes without addition of anticoagulant. The blood was centrifuged only once, at 3.000 RPM (400 X g, 10 minutes)<sup>13</sup>, dividing the sample into three segments. At the bottom of the tube was placed a layer of red cells, the higher the platelet-poor plasma and in the middle tier, the PRF clot itself.

The membrane PRF was immediately withdraw of the tube with tweezers and separated from the remaining blood with surgical scissors. A sample equivalent to 50 µL of

---

---

PRF was then applied to the lesion. The platelet count was conducted from the Automatic Blood Counter - ABC Vet TM - Horiba Medical.

#### 2.4 Histology

The samples were immediately fixed in 10% buffered formalin for a period of 48 to 72 hours. After this period, samples were dehydrated using different increasing concentrations of alcohol, followed by diaphanization by Xylene and embedded in paraffin. Longitudinal sections (4  $\mu\text{m}$ ) were performed in the tendon. Superficial and deep cuts from each sample were performed in duplicate, so the depth in the court established after sectioning the sample by 15 times. All prepared slides were classified by code.

#### 2.5 Hematoxylin and Eosin staining

The samples (4  $\mu\text{m}$ ) were immersed for 1 minute in staining Harris Hematoxylin, an soon after washed in running water, distilled water and immersed for 3 minutes in Eosin staining, followed by dehydration and diaphanization. The samples were visualized by light microscopy. The injured area of the Achilles tendon was found and then performed in the capture of images of magnification X200 in superficial and deep cuts, which ranged from seven to eleven images each.

All histological images were analyzed qualitatively from the Image Pro Plus 4.5.1 ® (Media Cybernetics, Inc.), considering the following criteria: vascular proliferation, mononuclear cells, polymorphonuclear cells, fibroblastic and epithelial cells.

#### 2.6 Sirius Red Staining

In Sirius Red staining (Cross-polarization Microscopy), the samples (4  $\mu\text{m}$ ) were immersed in Sirius Red, being after washed in distilled water, dehydrated, diaphanized and mounted. The images were captured under polarized light microscopy, with the microscope at full brightness and exposure time ranging from 40 to 70 milliseconds. The lens used to capture images was X50, three fields were selected in each sample of the blade, which represented the entire lesion.

---

To quantify the different types of collagen present in the Achilles tendon, taken as a basis for the yellowish-red coloration strongly associated fibers and thicker (Collagen Type I) and greenish thin fibers coupled to the typical type III collagen. The images were quantitatively analyzed using the software Image Pro Plus 4.5.1 ®. where from counting the number of pixels and the average count of three selected images, there was obtained the total area that was transformed into percentage.

### 2.7 Statistical Analysis

The obtained results were expressed as mean  $\pm$  SE, and analyzed by one way ANOVA -and two-way repeated measures followed by Bonferroni *post hoc* test, using the GraphPad Prism Software. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS

### 3.1 Platelet Counting

All donor animals showed blood count within the normal range, where the quantity in platelets blood total ranged from 286.000 to 502.000 platelets /  $\mu$ L. After centrifugation, PRP in the number of platelets per microliter was 2.616.000 to 4.080.000, proving that the technique has increased up to 12 times the concentration of platelets per  $\mu$ L after making the protocol, in this way there was an increase platelet aggregation from 676 to 1136%. Increase from 36 to 125% in the number of leukocytes in platelet-rich plasma was also observed. In the PRF, the platelet count decreased a lot, ranging from 14.000 to 55.000 platelets /  $\mu$ L, showing that the preparation technique was effective.

### 3.2 Hematoxylin and Eosin staining

Analyzing the histological sections obtained in the three experimental groups: Control, PRP and PRF on 14 and 28 days, there was no microscopically difference from the superficial and deep cuts in each specific sample.

---

---

When evaluated in general among the groups at the time of 14 days, the PRP and the control group remained at the same level of cellularity with granulation tissue active. What differed between the two groups was the greater presence of hemorrhage in the PRP group. When comparing the control group with the PRF, it was noted that the process of neovascularization was more advanced in the group treated with Platelet-Rich Fibrin. The amount of inflammatory infiltrates was lower in the PRF, without the presence of granuloma and in the control group. Compared the group PRP and PRF, intense difference can be observed. Inflammatory cells, hemorrhage, mononuclear and polymorphonuclear cells were present in greater abundance and more disorganized in PRP group. Formation of new vessels was higher in PRF than in the PRP in 14 days.

However, when groups were evaluated together, at the time of 28 days, *versus* control, PRP were macroscopically similar, however, in the PRP group were still observed hemorrhagic areas. However, when compared Control *versus* PRP and PRF, large qualitative difference was observed in the samples, such as increased cellularity, with a clear and large amount of fibroblasts and less collagen fibers, fibrocytes and regions of fibrosis in the courts of the samples of control group and PRP, observing that the majority of these samples fibroblasts were young, that is, had vesicular nucleus and loose chromatin.

Unlike what happened in these two experimental groups, the PRF group, at 28 days, the tissue showed more condensed and organized, with the largest number of fibrocytes with elongated nucleus and dense chromatin and a lower amount of fibroblasts with vesicular nucleus, characterizing a tissue partially healed.

However, despite the qualitative comparative analysis among the different treatments and control (Figure 1), it is possible to suggest that both the PRF as the control group showed a process of tissue repair more progressive than the PRP. This conclusion can be made based on microscopic features observed in the tissue: the presence of different cell types, the number of blood vessels and collagen fibers arrangement during the 14 and 28 days.

### 3.3 Sirius Red staining

When we performed a comparison the areas of type I collagen among the groups, at the depth of the lesion (superficial and deep) and time (14 and 28 days), there was no

---

interaction between the two groups in the times evaluated ( $p > 0.05$ ). Similar results were found for type III collagen in the level of depth of the lesion ( $p > 0.05$ ).

The comparison of the areas of both collagen type I and type III, in relation to the level of depth (superficial versus deep) and time within groups did not differ significantly on days 14 and 28, when analyzed separately.

The figure 2 shows the graphs of the results of surface and deep analysis of collagen type I (A, B, C) and collagen type III (D, E, F).

Analyzing the levels of depth and time (14 *versus* 28 days) intra-group difference was statistically significant in the PRF and control groups for type I collagen, which was expected due to the process of injury repair, where the time goes by, more healed tissue is. For collagen type III was found significant difference only in the control group. Already between the PRP and PRF groups was not statistically significant difference.

As a result of not finding significant differences when compared the groups between them in the levels of depth, was made to merge the results, both surface and deep, for all are from the same histological specimen, but in larger amount of cuts. Thus, an average was determined for each group. The qualitative data were confirmed by the Picrosirius Red staining images were captured for later quantified. (Figure 3)

The analysis area of collagen type I, on groups of different treatments and times showed that there was a statistically significant difference in both parameters analyzed ( $p = 0.0256$  and  $0.0002$ , respectively). After the analysis of variance test was performed *post-hoc* Bonferroni test to identify which groups differed. There was statistical difference only between the control group and PRP group at 14 days after treatment ( $p = 0.01$ ). By comparing the PRP and control groups at 28 days, the PRF and control groups at 14 and 28 days, and the PRP and PRF groups both at 14 and 28 days after treatment was not statistically significant difference ( $p > 0.05$ ). ( Figure 4).

The analysis of collagen type III was performed in the same way as collagen type I. There was statistical difference between groups of different treatments ( $p = 0.034$ ) and between the different times after treatment. At 14 days after the application of treatments, there was significant difference between the PRP and control groups. The comparison between the other groups, Control, and PRP (28 days), Control and PRF (14 and 28 days) and PRP and PRF (14 and 28 days) showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) (Figure 4).

---

By comparing the areas of collagen in the control group as to time, significant difference was observed between the groups 14 days and 28 days ( $p = 0.01$ ) for type I collagen, while the  $p$  value was  $> 0.05$  for collagen type III from 14 to 28 days in the Control. When we compare the areas of collagen within the PRP group as to time, there was no significant difference between groups 14 days and 28 days for both types of collagen (type I and III), where  $p > 0.05$ .

Comparing the areas of collagen within the group PRF as to time, a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between groups 14 days and 28 days for both collagen type I and for type III collagen. (Figure 5).

#### **4. DISCUSSION**

The tendon tissue has a low capacity for regeneration because of its low blood circulation, oxygenation and nutrition, which are important aspects in the process of repairing a tissue to an orderly progression of regeneration<sup>15,25</sup>.

In microscopic histological evaluation performed in this study, it was observed in Hematoxylin and Eosin staining the process of tissue repair of the Achilles tendon, which according to the literature, occurs in three that overlap phases: inflammatory, proliferative and remodeling<sup>18,15,29,22</sup>.

Many scientific studies have been published on tendon injuries in order to improve the tissue repair<sup>7</sup>. In these, several studies demonstrated that administration of FC as  $\beta$ FGF and PDGF resulted in better mechanical properties of tendon repaired<sup>8,56</sup>.

Although the effect of growth factors in the healing of the tendon is impressive, it became increasingly clear that the tendon repair is not controlled by a single growth factor, but requires the interaction of various factors<sup>31</sup>, which justified the use of PRP and PRF in our work, since they have a range of growth factors, exercising, as Majewski, (2009)<sup>31</sup>, collectively, powerful and far-reaching effects on the healing.

Experimental studies have shown that inflammation causes injury and release of several growth factors, which include platelet-derived growth factor (PDGF  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  and  $\beta\beta$ ), transformer growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ 2), growth factor by vascular endothelium (VEGF) and epidermal growth factor (EGF)<sup>33</sup>.

---



Given these precepts, both the PRP and the PRF seem to fit within the ideal properties required for a quick tendon repair and regeneration. As Scutt *et al.* (2008)<sup>44</sup> tissue engineering accelerates the process of tissue repair<sup>44</sup>, giving platelets is a promising line, since these have a key role in homeostasis and are a natural source of growth factors<sup>51</sup>, immediately after being released injury<sup>40</sup>.

When preparing PRP treatment, the platelet count was performed, thereby allowing the use of whole blood sample. As Anitua *et al.* (2004)<sup>4</sup> concentrations greater than 300.000 platelets /  $\mu\text{L}$  are sufficient for the preparation of PRP, and in our work the concentration ranged from 326.000 to 344.000 platelets /  $\mu\text{L}$ , which can then be used.

In this study, the increased in platelet PRP compared to whole blood ranged from 676.16 to 1.136.36%, which is consistent with the legal standards used to treatment. Marx, (1998)<sup>32</sup> and collaborators determined that the PRP platelet must have an increase of more than 338%, considered by Obarrio *et al.* (2000)<sup>36</sup> and Whitman *et al.* (1997)<sup>55</sup> the ideal number for the treatment has beneficial effects.

According to Marx, (2001)<sup>33</sup> the concentration of platelets used as reference for the therapeutic use of PRP is 1.000.000 platelets /  $\mu\text{l}$ , coinciding with the number of platelets that were used in our study. Scientific evidences were conducted, showing that the increase in soft tissue healing occurs at this concentration, whereas lower concentrations were not evident for the healing of wounds<sup>33</sup>.

Weibrich *et al.* (2004)<sup>54</sup> and colleagues in a study in order to evaluate the bone regeneration suggested that the effectiveness of the PRP is dependent on the concentration of platelets obtained. At low concentrations (<1 million platelets /  $\mu\text{L}$ ), PRP may have little expressive effects and, paradoxically, at high concentrations (> 1,000,000 platelets /  $\mu\text{L}$ ) seems to exert an inhibitory effect. In addition, Choi *et al.* (2003)<sup>10</sup> also verified in a study in vitro the dose-dependent effect of PRP on osteogenesis, demonstrating that the viability and proliferation of alveolar bone cells are deleted at high concentrations.

Several studies have been conducted to establish a faster healing of Achilles tendons lesions. Studies by Aspemberg, (2004)<sup>5</sup>, and collaborators, demonstrated that an injection of platelet concentrate may improve the repair of the Achilles tendon in rats. Improvement of mechanical properties was also found using PRP in tendinosis of horses<sup>6</sup>.

However, the real effectiveness of PRP is still debated<sup>32,43</sup>.

---

Despite all care in management and treatment protocol for obtaining PRP, our study suggests that the use of Platelet-Rich Plasma, when applied immediately after lesion, is not effective to increase speed of regeneration process of the Achilles tendon in rats considering the results obtained in histological staining Hematoxylin and Eosin and Picrosirius Red in our conditions evaluated.

Our findings corroborate the results that have been published recently, where the PRP has no effect on the rapid regeneration of the Achilles tendon. In a randomized clinical trial conducted by Schepull *et al.* (2010)<sup>42</sup>, it was suggested that the PRP is not useful for the treatment of Achilles tendon ruptures, since it doesn't show any beneficial effect on healing after rupture, but, negative impacts. In the same way, by De Jonge *et al.* (2011)<sup>12</sup>, in a randomized clinical trial, double blind and controlled trial involving 54 patients, did not identify any beneficial effect of the use of PRP on the clinical course of patients with tendinosis.

However, recent studies explaining that the PRP, despite all its properties, does not demonstrate clinical superiority in the repair or regeneration of some tissues, such as tendon<sup>12,42</sup>, nerve<sup>37</sup> and bone<sup>45</sup>, supporting our findings.

Since Platelet-Rich Fibrin has a protocol of specific production in an attempt to accumulate platelets and release cytokines in a clot fibrin<sup>13</sup> supporting our data of platelet count, which was observed a suppression of platelets from 89.04 to 95.10% as they were present in the membrane of fibrin.

PRF, unlike PRP is prepared naturally without the addition of thrombin, and this is the hypothesis that the PRF, as it has a natural part of fibrin, it can protect the growth factors proteolysis<sup>28</sup>. In addition, no use of external factors, causes no risk of immunogenic reaction or transmission of illness<sup>41</sup>, in other words, the described method for the preparation of the PRF has easy handling and can be easily implemented in clinical practice, given its simplified application.

The biological activity of the fibrin molecule seems to be primarily responsible for the properties of homeostasis and healing capacity of the PRF. Fibrin provides a matrix for the migration of tissue forming cells (fibroblasts and endothelial cells) that participate in the process of angiogenesis and are responsible for remodeling the new tissue<sup>3</sup>.

Growth factors TGF-1 and PDGF were identified in PRF<sup>13</sup>, demonstrating that these soluble molecules and several other growth factors are trapped in the fibrin meshes of the

---

PRF, being released for long time<sup>41</sup>, in controlled effect, providing a scaffold that could help in the quality and to repair end of the injury<sup>19,40,41</sup>.

The PRF has been shown to be an effective membrane for tissue regeneration in surgical sites. In the angiogenesis the growth factors work in stimulation phase, then occurring a vascular growth and increased synthesis of collagen by the fibroblasts proliferation<sup>53</sup>.

According to all its properties, the use of autologous platelet-rich fibrin has been proposed as a strategy to improve the cellular response to tendon injury, and finally the quality of repair<sup>40</sup>, which can be seen in two histological analyzes of our work, where PRF tends to have an accelerated regeneration of the tendon.

Although platelets, leukocytes and cytokines play a proven role in the biology of these biomaterials, in the PRF, the fibrin matrix is certainly the key element responsible for its real potential therapeutic<sup>17,47</sup> in contrast to PRP.

As healing progresses, the number of fibroblasts and proliferating new vessels decrease, however, the fibroblasts gradually take a more synthetic phenotype, and consequently there is an increased deposition of extracellular matrix<sup>1</sup>, which can be noted the images of Hematoxylin and Eosin staining mainly in the PRF group, where at 28 days is a progressive vascular regression and granulation tissue at 14 days that is highly vascularized, becomes a pale scar, essentially avascular. These aspects, in the same color, could not be seen in this way in the experimental groups Control and PRP.

This study showed that PRP and saline 0.9% in relation to the area of I and III collagen in Sirius Red staining, showed similar effects on the regeneration process of the Achilles tendon of rats in 28 days. Unlike these two treatments, PRF showed a more acceleration of healing, with levels of collagen I a little higher at the time of 28 days, but not significantly. Already, when compared microscopically, by Hematoxylin and Eosin staining, PRF showed be superior in accelerating the healing in both 14 and in 28 days. The group PRP and control, both at 14 and 28 days were also microscopically similar, differing only in the hemorrhagic areas, where PRP had hemorrhage in two times evaluated, and the control group only 14 days.

Dohan *et al.* (2006)<sup>13</sup>, also observed that the PRF would necessarily have various effects that differed from the PRP. PRP would have a massive effect and uncontrollable in the short term due to their high rates of thrombin, thereby initiating an accelerate

---

polymerization. The PRF, by deriving from a natural source, it would have a progressive polymerase which occurs during centrifugation. This progressive and relatively slow polymerization may increase the incorporation of cytokines circulation in loops fibrin<sup>13</sup>.

When we observed the behavior of regeneration in the three treatments at 14 days for collagen I, the experimental group PRP had higher area of collagen I and the smaller area of type III collagen, demonstrating a significant difference towards other groups. However, when quantitatively assessed at 28 days, areas of collagen I and III remained, with no significant difference in time.

He *et al.* (2009)<sup>19</sup> concluded that the way to release the growth factors included in PRP and PRF differs between them. PRF release their growth factors gradually, and retains its activity to a relatively long period compared to PRP, which may explain the stagnation of the appearance of type I collagen at 28 days in the PRP. As an experimental model performed by He *et al.* (2009)<sup>19</sup>, which used rats, it was found that PRF not only prolongs the release of growth factors, but postpones the peak release. PRP's peak levels of growth factors TGF-1 and PDGF-AB were reached in the first day. In contrast, PRF had the peak levels of these factors at 14 days, in other words, the peak was delayed for two weeks later than the PRP. After 14 days, still held PRF levels of growth factors statistically higher than growth factors of the PRP.

According to ABBAS *et al.* (2008)<sup>1</sup>, some growth factors stimulate the proliferation of certain cells and inhibit the other cycle, in other words, a growth factor can have opposite effects in the same cell depending on its concentration. It is believed that this parameter has been a limiting factor to our work, since the concentration of growth factors for each sample used was not quantified before application of the treatment on the lesion, what could explain the ineffectiveness of the PRP.

However, many growth factors who are involved in repair are produced by leukocytes that are recruited to the site of injury or are activated in this location, as part of inflammatory<sup>1</sup>. In the hemogram conducted before the application of PRP treatment, we observed an increase from 33 to 125% in the number of leukocytes per microliter in relation to the whole blood of the rat, thus confirming that growth factors were present in platelet-rich plasma prepared by our research group.

When compared the PRF treatment intragroup, to the area for collagen I and III as to the time of 14 and 28 days, a significant difference was showed ( $p < 0.05$ ). In treatment with

---

saline 0.9%, to collagen I, when compared in the two times also was showed a significant difference ( $p < 0.05$ ), which can't be observed in time of 14 and 28 days for type I and III collagen in the treated group with PRP, explaining a delayed healing. Collagen type I and III are the main components of the extracellular matrix in tendons<sup>46</sup>, where type I collagen represents 65 to 95% of the dry tendon, and collagen type III approximately 10%<sup>27,38,39</sup>.

Collagen type I represents 95% of all types of collagen present in tendon<sup>21,27,38</sup>. In Sirius Red staining was observed this work that concomitant the increase in the area of type I collagen in the experimental group PRF at 28 days (47.74%), a decreased in the area of collagen type III (46.00%) was showed. In contrast, control group and PRP at 28 days had a greater area of collagen type III (59.07% and 50.57%) and lower percentage of type I collagen (40.91% and 37.24%). Already at 14 days, the percentage of type III collagen was higher in control groups (73.30%) and PRF (66.94%), remained the same as in the PRP group at 28 days (50.57%). According to the literature, the synthesis of type III collagen increases during the early repair, but it is believed that when he decreases, the type I collagen is synthesized and organized<sup>21,27,38</sup>.

Some cuts of Sirius Red staining could not be accounted because of the poor preparation and in staining of histological sections, losing some samples, which influenced in statistical significance of the work.

In an experimental study conducted by Eliasson *et al.* (2009)<sup>14</sup>, in rats, was shown to the third day after injury corresponds to the inflammatory phase, where the 8 and 14 days refer to the proliferative phase, and remodeling and the 21 day, therefore inflammation the first stage of collagens tissue healing<sup>14</sup>. In this study we chose to evaluate the 14 days, relative the proliferative phase, as well as 28 days in order to view complete tendon regeneration. However, the 28 day period was not observed a complete healing in injured Achilles tendon of rats. It is believed that this aspect was due to the primary healing of the tendon to progress at a relatively slower pace than the healing of other connective tissues, due to its low vascularity and cellular components expressed in the tissue tendinuos<sup>9,27</sup>.

Because of this, new experiments are needed to assess the progression of healing, which was considered a limiting factor for our study, because of the large number of animals that would be necessary for this.

However, following this line, we can say that there is a trend of improvement and acceleration of healing through the use of Platelets-Rich Fibrin, compared to 0.9% saline

---

solution and Platelet-Rich Plasma for Achilles tendon rats. And so, is possible to deduce that PRF has an interesting perspective in clinical use, being necessary more experimental and clinical studies to determine the validity of the procedure.

Functional tests, such as the biomechanical test, would be interesting to be analyzed to evaluate the tensile strength, which would contribute to our results, thus encouraging the continuation of this research.

## REFERENCES

1. ABBAS, A.K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**. 8 ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 1.048p.
  2. AKEDA, K.; AN, H.S.; PICHKA, R., *et al.* **Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads**. *Spine*, 2006; 31: 959–966.
  3. ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; NURDEN, A.T. *et al.* **New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies**. *Trends in Biotechnology*. 2006; 24 (5): 227-234.
  4. ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. **Autologous platelets as a source for healing and tissue regeneration**. *Thromb Haemost*. 2004; 91: 4-15.
  5. ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. **Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats**. *Acta Orthop Scand*. 2004; 75 (1): 93–99.
  6. BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T.; DE, GROOT M.W. *et al.* **Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study**. *J Orthop Res*. 2010; 28 (2): 211-217.
  7. CASALECHI, R. H.; NICOLAU, R. A.; CASALECHI, V. L.; SILVEIRA JR., L.; PAULA, A. M. B.; PACHECO, M. T. T. **The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats**. *Lasers Med Sci*. 2009; 24: 659–665.
-

8. CHAN, B.P.; FU, S.C.; QIN, L.; LEE, K.M.; ROLF, C.G.; CHAN, K.M. **Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model.** *Acta Orthop Scand.* 2000; 71: 513-518.
  9. CHANG, J.; MOST, D.; STELNICKI, E. *et al.* **Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: Evidence for dual mechanisms of repair.** *Plast. Reconstr. Surg.* 1997; 100: 937.
  10. CHOI, B. H.; IM, C. J.; HUH, J. Y. *et al.* **Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft.** *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 2003; 33 (4): 56-59.
  11. CHOUKROUN, J. ; DISS, A.; SIMONPIERI, A. *et al.* **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: 56-60.
  12. DE JONGE, S.; DE VOS, R. J.; WEIR, A. **One-year Follow-up of Platelet-Rich Plasma Treatment in Chronic Achilles Tendinopathy: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlle Trial.** *Am J Sports Med.* 2011; 39 (8): 1623-1629.
  13. 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(3): 45-50.
  14. ELIASSON, P.; ANDERSSON, T.; ASPENBERG, P. **Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression.** *J Appl Physiol.* 2009; 107: 399-407.
  15. ENWEMEKA, C.S.; **Inflamation, Cellularity, and Fibrillogenesis in Regeneration Tendon: Implications for Tendon Rehabilitation.** *Physical Therapy.* 1989a; 69: 816-825.
  16. EPPLEY, B.L.; WOODSELL, J.E.; AND HIGGINS, J. **Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing.** *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 114 (6): 1502-1508.
  17. GAULTIER, F.; NAVARRO, G.; DONSIMONI, J-M.; *et al.* **Platelet concentrates. Part 3: Clinical applications.** *Implantodontie*, 2004; 13: 3-11.
  18. GOFFI, F. S. **Técnica cirúrgica - Bases anatômicas, fisiopatologias e técnicas da cirurgia (Surgical techniques - anatomical physiopathological and surgical techniques).** 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. pp. 126-252.
-

19. HE, L.; LIN, Y.; HU, X. *et al.* **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(5):707-713.
  20. HOKUGO, A.; OZEKI, M.; KAWAKAMI, O. *et al.* **Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel.** *Tissue Eng.*, 2005; 11: 1224.
  21. HOLZ, U. **Achilles tendon rupture and achillodynia. The importance of tissue regeneration.** *Fortschr. Med.* 1980; 98: 1.517-1.520.
  22. JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.
  23. KANNUS P.; NATRI, A. **Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports.** *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 1997; 7: 107-112.
  24. KAWASUMI, M.; KITO, H.; SIWICKA, K.A. *et al.* **The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone.** *J Bone Joint Surg Br*, 2008; 90: 966.
  25. KLEINERT, H.E.; SCHEPEL, S.; GILL, T. **Flexor tendon injuries.** *Surg Clin North America*. 1981; 61: 267-286.
  26. LANDESBURG, R. *et al.* **Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation.** *J Oral Maxillofac Surg*, 2000; 58 (3): 297-301.
  27. LIU, S. H.; YANG, R. S.; AL-SHAikh, R.; LANE, J. M. **Collagen in tendon, ligament, and bone healing: A current review.** *Clin. Orthop.* 1995; 318: 265.
  28. LUNDQUIST, R.; DZIEGIEL, M.H.; AGREN, M.S. **Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin.** *Wound Repair Regen*, 2008; 16: 356-363.
  29. MAFFULLI, N.; MOLLER, H.D.; EVANS, C.H. **Tendon healing: can it be optimized.** *Br J Sports Med.* 2002; 36: 315-316.
  30. MAIA, L.; SOUZA, M. V.; ALVES, G. E. S. *et al.* **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009; 29(3): 241-245.
-

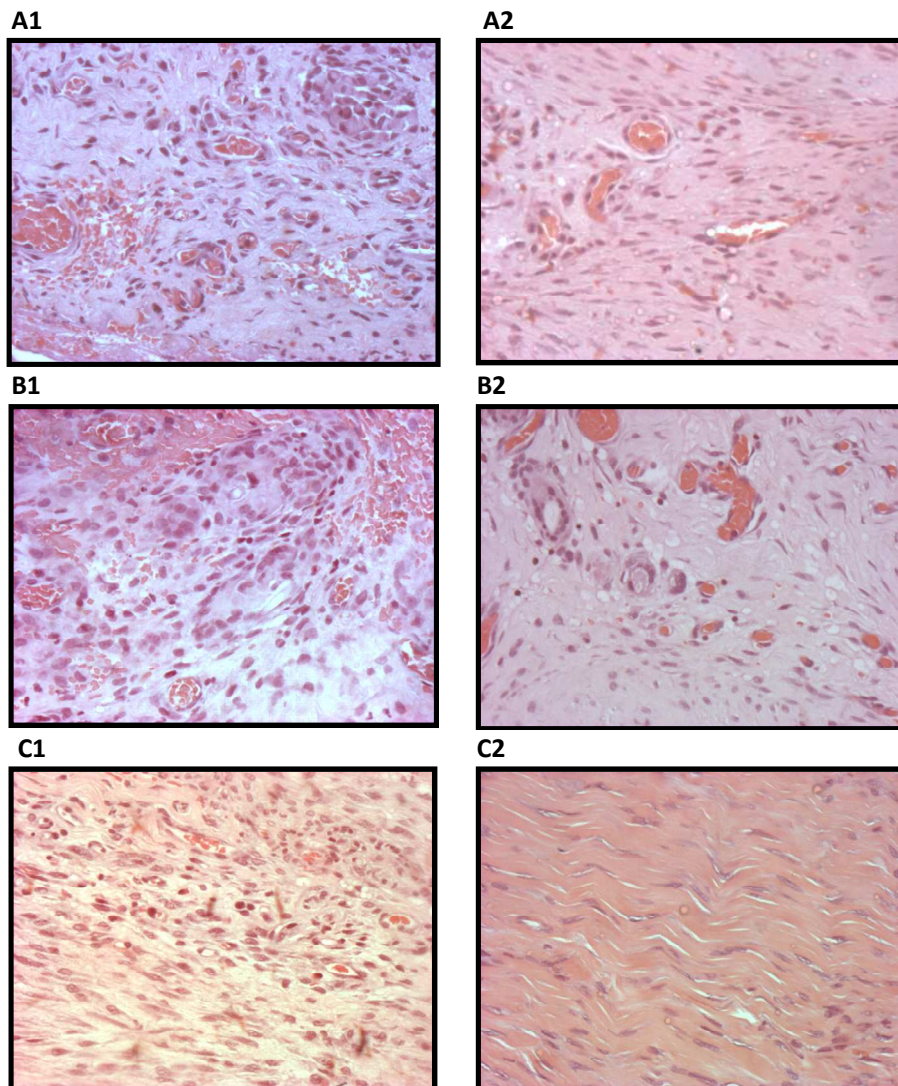


31. MAJEWSKI, M.; OCHSNER, P. E.; LIU, F.; FLÜCKIGER, R.; EVANS, C. H. **Accelerated Healing of the Rat Achilles Tendon in Response to Autologous Conditioned Serum.** *American Journal of Sports Medicine.* 2009; 37(11): 2.117-2.125.
  32. MARX, R. E. *et al.* **Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* 1998; 85 (6): 638-646.
  33. MARX, R.E.; **Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?** *Implant Dent.* 2001; 10(4): 225-228.
  34. MURRAY, M.M.; SPINDLER, K.P.; BALLARD, P. *et al.* **Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagenplatelet- rich plasma scaffold.** *J Orthop Res.* 2007.
  35. NAGAE, M.; IKEDA, T.; MIKAMI, Y.; HASE, H.; OZAWA,H.; MATSUDA, K. I.; SAKAMOTO, H.; TABATA, Y.; KAWATA, M.; KUBO, T. **Intervertebral Disc Regeneration Using Platelet-Rich Plasma and Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres.** *Tissue Engineering.* 2007; 13 (1): 147-158.
  36. OBARRIO, J.J. *et al.* **The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports.** *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry.* 2000; 20 (5): 487-497.
  37. PISKIN, A. *et al.* **Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study.** *Microsurgery.* 2009; 29 (2): 144-53.
  38. RILEY, G.P.; HARRALL, R.L.; CONSTANT, C.R.; CAWSTON, T.E.; HAZLEMAN, B.L. **Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis.** *Ann Rheum Dis.* 1994; 53: 359-366.
  39. RUFAL, A.; RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M. **Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon.** *J Orthop Res.* 1995; 13: 585-593.
  40. SANCHEZ, M.; ANITA, E.; AZOFRA, J. M. *et al.* **Comparison of surgically repaired achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices.** *The American Journal of Sports Medicine,* 2007 35: 245-251.
  41. SARRAFIAN, T. L.; WANG, H.; HACKETT, E.S. **Comparison of Achilles Tendon Repair Techniques in a Sheep Model Using a Cross-linked Acellular Porcine**
-

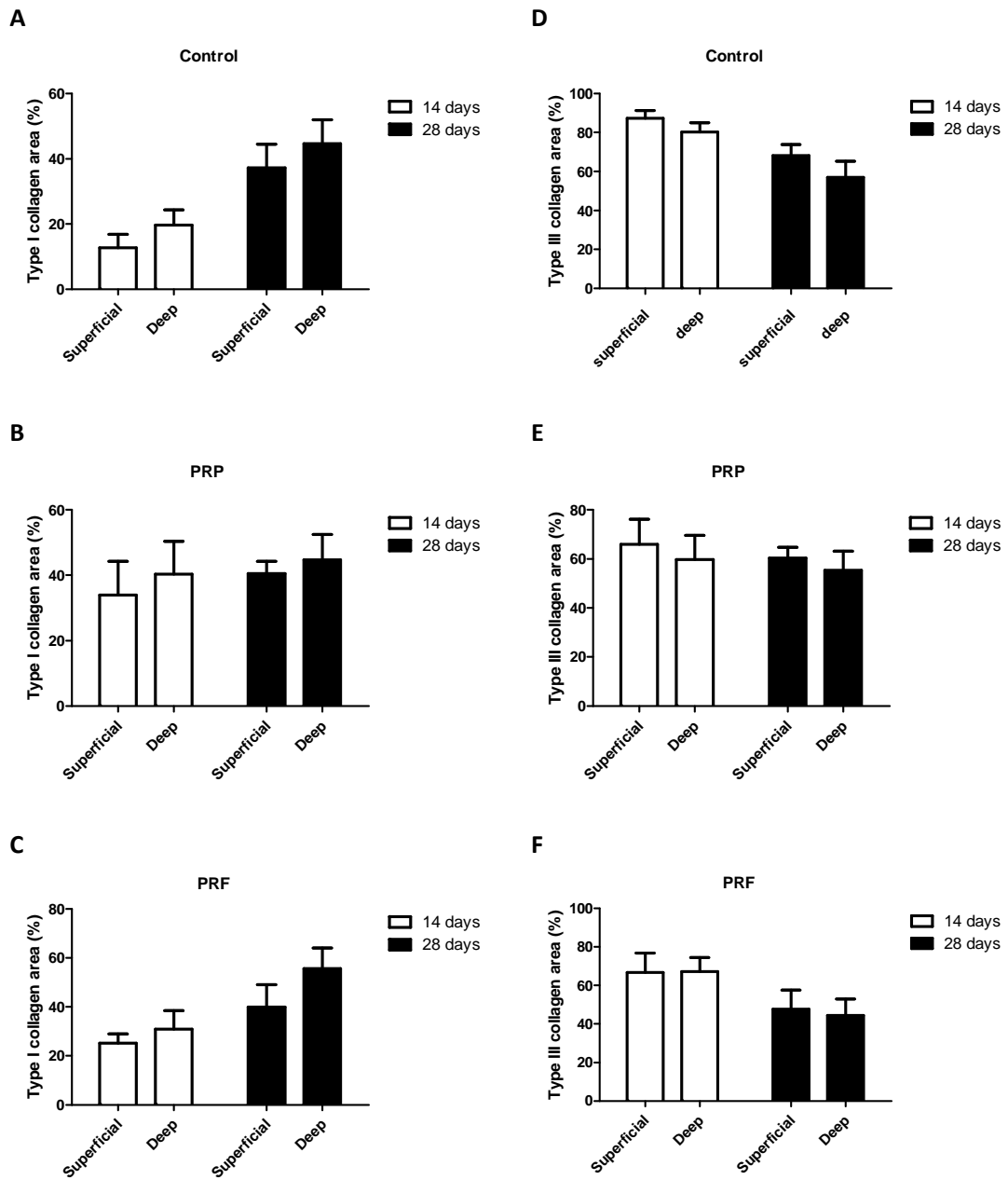
- Dermal Patch and Platelet-rich Plasma Fibrin Matrix for Augmentation.** *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, 2010; 49: 128–134.
42. SCHEPULL, T.; KVIST, J.; NORRMAN, H. *et al.* **Autologous Platelets Have No Effect on the Healing of Human Achilles Tendon Ruptures.** *The American Journal of Sports Medicine*. 2010; 20 (10): 1-10.
43. SCHLEGEL, K.A.; DONATH, K.; RUPPRECHT, S. *et al.* **De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma.** *Biomaterials*, 2004; 25: 5387-5393.
44. SCUTT, N.; ROLF, C. G. SCUTT, A. **Tissue specific characteristics of cells isolated from human and rat tendons and ligaments.** *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2008; 32(3):1-11
45. SEBEN, A.D. **Efeito de cimento de alfa-fosfato tricálcico e plasma rico em plaquetas na regeneração de tecido ósseo.** 2010. 138p. Dissertação de Mestrado em Clínica Cirúrgica - (Curso de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
46. SHARMA, P.; MAFFULLI, N. **Tendon injury and tendinopathy: healing and repair.** *J Bone Joint Surg Am*, 2005; 87: 187–202.
47. SIMONPIERI, A.; CHOUKROUN, J.; GIRARD, MO. *et al.* **Immediate post-extraction implantation: interest of the PRF.** *Implantodontie*, 2004; 13: 177-189.
48. SLATER, M.; PATAVA, J.; KINGHAM, K. *et al.* **Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity.** *J Orthop Res.*, 1995; 13: 655
49. SPINDLER, K.P.; MURRAY, M.M.; CAREY, J.L. *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*, 2009; 27: 631.
50. SUCHAK, A. A.; BOSTICK, G.; REID, D.; BLITZ, S.; JOMHA, N. **The incidence of Achilles tendon ruptures in Edmonton, Canada.** *Foot Ankle Int.* 2005; 26: 932-936.
51. SUNITHA, R.V.; MUNIRATHNAM, N. E. **Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate.** *Indian Journal of Dental Research*, 2008; 19: 42-46.
52. VASCOCELLOS, A. V. B.; TEIXEIRA, A. P. F.; CRUZ, P. V. **Plaqueta rica em fibrina: um novo conceito em reparação tecidual.** *Innovations Implant Journal – Biomaterials and Esthetics*, 2008; 3(6):27-31.
-

- 
53. VIRCHENKO, O.; GRENEGÅRD, M.; ASPENBERG, P. **Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets.** *Acta Orthopaedica*. 2006; 77 (6): 960–966.
  54. WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W.; *et al.* **Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration.** *Bone*, 2004; 34 (4): 665-671.
  55. WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. **Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery.** *J Oral Maxillofac Surg*. 1997; 55 (11): 1294-1299.
  56. WOO, S. L.; SMITH, D. W.; HILDEBRAND, K. A., *et al.* **Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament.** *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998; 36: 359.
-

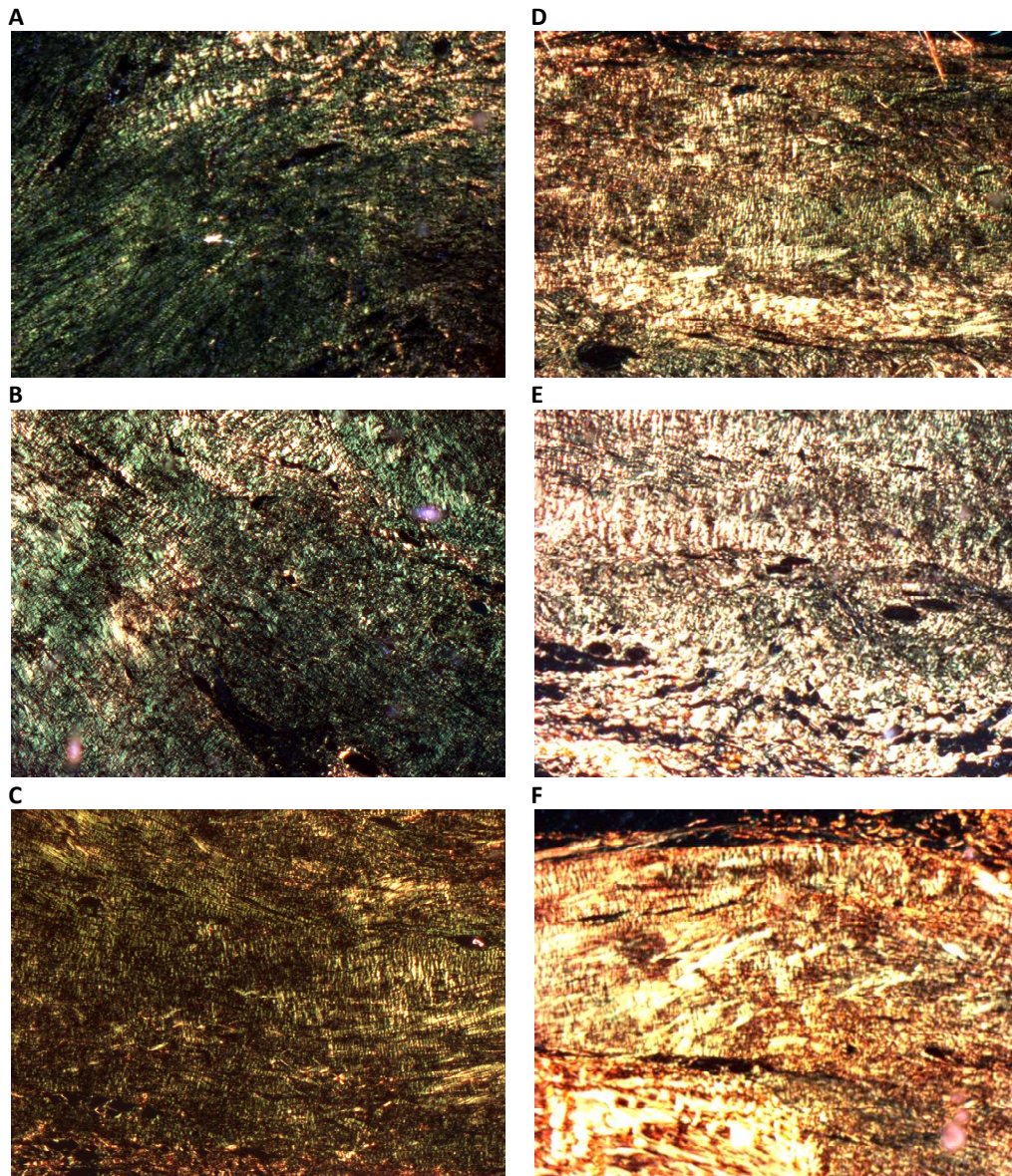
IMAGES



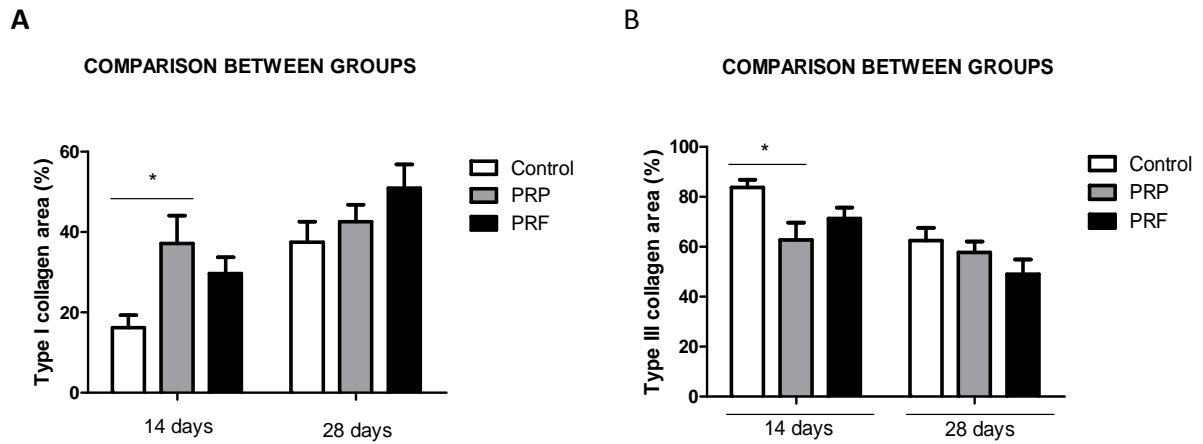
**Figure 1:** Images captured in Hematoxylin and Eosin staining in a longitudinal section, where: A = control group; B = PRP group; C = PRF group; 1 = 14 days; 2 = 28 days. Magnification: X200.



**Figure 2** - Superficial and deep analysis of Type I Collagen (A, B, C) and Type III Collagen (D, E, F) at the time of 14 and 28 days.

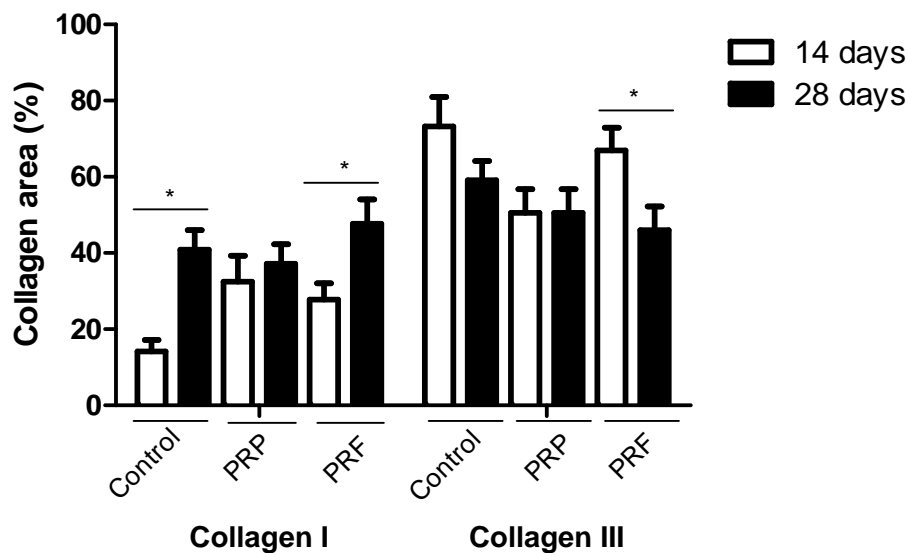


**Figure 3:** Images captured in Sirius Red staining in longitudinal section in the times of 14 (A, B and C) and 28 days (D, E and F), where: A = Control group; B = PRP group; C = PRF group; Magnification: 50X.



**Figure 4** - Comparison between the areas of Type I and III Collagen at different treated groups in time 14 and 28 days. \*  $p < 0.05$ . A = Control, PRP and PRF (n = 7); B = Control and PRP (n = 7) and PRF (n = 8).

**INTRAGROUP COMPARISON AS TO THE TIME**



**Figure 5** - Comparison intragroups as to time and area of Type I and III Collagen in groups. \*  $p < 0.05$ . Control and PRF, n = 7. PRP, n = 8.

---

**ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética para o uso de animais da PUCRS**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 190/10 – CEUA

Porto Alegre, 02 de dezembro de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00191, intitulado: **“Comparação do efeito do plasma rico em plaquetas e fibrina rica em plaquetas no reparo do tendão de aquiles em ratos”**, com a recomendação em anexo.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Profª. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva  
N/Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

---