

Wilson Campos Tavares Junior

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA REGENERAÇÃO DO
TENDÃO DE AQUILES EM COELHOS - AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA E HISTOPATOLOGIA**

**Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Minas Gerais - 2014**

Wilson Campos Tavares Junior

EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA REGENERAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES EM COELHOS - AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E HISTOPATOLOGIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Resende

Co-orientador: Prof. Dr. Ubiratan Brum de Castro

**Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Minas Gerais – 2014**

T231e Tavares Junior, Wilson Campos.
Efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) na regeneração do Tendão de Aquiles em coelhos [manuscrito]: avaliação por ressonância magnética e histopatologia. / Wilson Campos Tavares Junior. -- Belo Horizonte: 2014.
91f.: il.
Orientadora: Vivian Resende.
Co-Orientador: Ubiratan Brum de Castro.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Tendão do calcâneo/lesões. 2. Plasma Rico em Plaquetas. 3. Espectroscopia de Ressonância Magnética. 4. Epidemiologia Experimental. 5. Histologia. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Resende, Vivian. II. Castro, Ubiratan Brum de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WE 600

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA REGENERAÇÃO DO
TENDÃO DE AQUILES EM COELHOS - AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA E HISTOPATOLOGIA.**

WILSON CAMPOS TAVARES JUNIOR

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores

Aprovada em 29 de abril de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Vivian Resende - Orientador
UFMG


Prof(a). Ubiratan Brum de Castro - Coorientador
UFMG


Prof(a). Adriana Maria Kakehasi
UFMG


Prof(a). Reginaldo Figueiredo
UFMG

Belo Horizonte, 09 de maio de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA: Profa. Dra. Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR: Prof. Dr. Humberto Jose Alves

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA: Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENADOR: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADORA: Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E OFTALMOLOGIA

COORDENADOR: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

SUB-COORDENADORA: Profa. Dra. Ivana Duval de Araújo

COLEGIADO:

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Profa. Dra. Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral - representante discente

Aos meus pais

Wilson Campos Tavares e Luci Antunes Campos Tavares,
pelo incentivo constante e pelo apoio em todos os
momentos da minha vida.

Ao meu irmão Guilherme Antunes Campos Tavares,
pela sua ajuda incondicional.

AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra. Vivian Resende*, orientadora, pela constante crítica, paciência e inspiração; responsável máxima pelo término desta caminhada.

À *Prof. Dra. Adriana Maria Kakehasi*, reumatologista e professora do Departamento de Ortopedia e Aparelho Locomotor pelos conselhos, os quais me ajudaram a enfrentar as adversidades, sem esmorecer.

Ao *Prof. Dr. Ubiratam Brum de Castro*, *co-orientador*, ortopedista e professor do Departamento de Ortopedia e Aparelho Locomotor, pela colaboração e orientação no decorrer da pesquisa.

Ao *Prof. Dr. Eduardo Paulino*, professor do Departamento de Anatomia Patológica, pela análise do material histológico coletado e exemplo de pessoa e profissional.

À *Profa. Dra. Ana Paula Madureira*, professora da Faculdade de São João Del-Rey, pela compreensão e análise estatística, exemplo de profissionalismo.

Ao *Prof. Dr. Reginaldo Figueiredo*, professor do Departamento de Imagem e Anatomia da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo incentivo para ingressar neste projeto.

Ao *Prof. Dr. Leonardo de Souza Vasconcellos*, professor do Departamento de Propedêutica Complementar e Coordenador do Núcleo de Ensino e Pesquisa da Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial do HC-UFMG, pelo auxílio na realização do PRP.

À *Dra. Cybele de Andrade Paes*, médica hematologista do HC-UFMG, pelas orientações durante a realização do PRP.

À *Profa. Dra. Maria Angélica Baron Magalhães*, médica veterinária, professora da Faculdade de Medicina UNIFENAS, pelo auxílio e orientação no manejo dos animais durante a realização da ressonância magnética.

Ao Daniel Oliveira Mendes, estudante de medicina, pela colaboração durante a realização dos exames por ressonância magnética.

Ao Dr. Marcell de Barros Duarte Pereira, pelo auxílio durante o trabalho principalmente na fotografia das imagens.

Ao *Sr. Marcelo* Moreira de Jesus e *Sr. Derlim Severiano de Paula*, funcionários do Centro de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina, pela disponibilidade em nos auxiliar e cuidados com os animais.

À Radioclínica Itaúna, por disponibilizar o aparelho para a realização das ressonâncias magnéticas.

Aos *Médicos Assistentes* do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo apoio na busca do conhecimento, na especialidade de Radiologia e Diagnóstico por Imagem.

A *todos os funcionários* do Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Oftalmologia pela colaboração nesta dissertação.

RESUMO

O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) esta cada vez mais comum em Medicina, principalmente esportiva, porém pouco consenso existe na sua eficácia. A ressonância magnética (RM) poderia trazer valiosos achados de cicatrização tecidual. Foram utilizados 22 coelhos da raça new zealand, divididos em três grupos. Grupo 1 – controle (n=4), grupo 2 - operado sem PRP (n=9) e grupo 3 - operado com PRP (n= 9). O PRP foi obtido a partir de 9 ml de sangue processado com dupla centrifugação. Realizou-se a ressecção do terço central do tendão de Aquiles dos coelhos e após 30 dias fez-se a RM antes e após sequencia perfusional. Observou-se correlação entre o tecido fibrocicatricial e as áreas de alteração de sinal visibilizadas à RM e áreas de captação de contraste à RM perfusional ($P < 0,001$). Não encontrou-se diferença estatística entre os grupos operados com e sem PRP ao estudo histológico e perfusional realizado. A ressonância magnética com e sem perfusão é um método que pode ser útil na demonstração de tecido fibrocicatricial em tendões. No presente estudo, o PRP não alterou o processo cicatricial fisiológico decorridos 30 dias da lesão, o aspecto foi indiferente entre os grupos, sugerindo que mais estudos experimentais devem ser realizados para elucidar estas questões.

Palavras-chave: Ressonância Magnética, Plasma Rico em Plaquetas, Lesão tendínea, Estudo experimental

SUMMARY

The use of PRP (platelet rich plasma) is increasingly in medicine , mainly at sports , but little consensus exists on their effectiveness. Magnetic resonance imaging (MRI) could provide valuable findings at tissue healing. There were 22 new zealand rabbits , divided into three groups were used . Group 1 - control (n = 4) , group 2 - operated without PRP (platelet rich plasma) (n = 9) and group 3 - operated with PRP (n = 9) . The PRP was obtained from 9 ml of blood processed with double centrifugation. It was performed the resection of the central portion of the Achilles tendon of rabbits. After 30 days, MRI was done before and after perfusion sequence. It was observed correlation between the fibrocartilaginous tissue and areas of signal abnormalities visualized on MRI and areas of contrast enhancement on MRI perfusion ($P < 0,001$) . There was not statistical difference between the groups with and without PRP at perfusion and histological study. MRI with and without perfusion could be a useful technique for evaluating tissue and fibrous scarring in tendons. In the present study , the PRP did not alter the physiological healing process after 30 days of injury, the appearance was indifferent between the groups , suggesting that more experimental studies are required to elucidate these issues .

Keywords: MRI, Platelet Rich Plasma, tendon injury, experimental study

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Técnica para produção do PRP. **a.** coleta do sangue na artéria auricular; **b.** após primeira centrifugação a 800rpm por 8 min **c.** Aspirando o sobrenadante **d.** Divisão do plasma rico e pobre em plaquetas após a segunda centrifugação a 3000 rpm por 15 min. **e.** plasma pobre em plaquetas sendo aspirado. **f.** PRP já homogeneizado e utilizado para injeção no tendão..... 33
- Figura 2. Procedimento cirúrgico com exposição do tendão de Aquiles dos coelhos..... 35
- Figura 3. Procedimento cirúrgico do tendão de Aquiles do coelho, evidenciando-se o segmento central do tendão de Aquiles sendo ressecado..... 35
- Figura 4. Sutura contínua da bainha tendínea com fio de prolene 6.0..... 36
- Figura 5. Injeção de PRP após o fechamento da bainha tendínea..... 36
- Figura 6. Técnica de acesso venoso na orelha: **a.** tricotomia e identificação da veia; **b.** compressão proximal da veia; **c.** canulação da veia com gelco 24 Gauge; **d.** conexão do gelco a um dispositivo de duas vias para injeção do contraste venoso durante a realização da RM..... 38
- Figura 7. Posicionamento do coelho para a realização da ressonância magnética..... 39

Figura 8.	Medidas do tendão a RM a. corte axial em T2 com saturação de gordura com a topografia da medida em antero posterior e transversal. b. corte sagital em T2 com saturação de gordura demonstrando a medida longitudinal do tendão.....	41
Figura 9.	Metodologia de preparo para histologia a. identificação da sutura e pontos de reparo; b e c secção transversal em dois pontos da região central do tendão no grupo sem PRP (b) e no grupo submetido a intervenção cirúrgica com PRP (c); d fatia central posicionada em cassete para processamento histológico automático.....	44
Figura 10.	Imagens na RM do tendão de Aquiles do coelho número 2 do grupo 1 (controle), a. corte axial T1, b. corte axial T2 com saturação de gordura, c. corte sagital T2 com saturação de gordura. Observar a homogeneidade do tendão que encontra-se difusamente hipointenso.....	47
Figura 11.	Imagens na RM do tendão de Aquiles do coelho número 2 do grupo 2 (sem PRP). a. corte axial T1; b. corte axial T2 com saturação de gordura, c. corte sagital T2. Observar a heterogeneidade do tendão que apresenta focos de hiperintensidade de sinal em T1 e T2 (setas).....	48

Figura 12. Coelho 2. do grupo 1 (controle). **a.** Area de interesse (ROI) no interior da artéria tibial, **b.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **c.** curva de captação de contraste na artéria tibial. **d.** ROI no interior do tendão, **e.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **f.** curva de captação de contraste no tendão..... 50

Figura 13. Coelho 9 do grupo 2 (operado sem PRP). **a.** ROI no interior da artéria tibial (seta), **b.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **c.** curva de captação de contraste na artéria tibial. **d.** ROI no interior do tendão, em sua porção onde apresenta maior realce com hipersinal (seta), **e.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste (seta amarela) **f.** curva de captação de contraste no tendão..... 51

- Figura 14. Coelho 9, do grupo 3 (operado com PRP). **a.** ROI no interior da artéria tibial (seta), **b.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **c.** curva de captação de contraste na artéria tibial. **d.** ROI no interior do tendão, em sua porção onde apresenta maior realce e heterogeneidade de sinal (seta), **e.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste no interior do tendão (seta verde) **f.** curva de captação de contraste no tendão..... 52
- Figura 15. Padrões de curvas de captação de contraste, mostrando valores de unidade de ressonância (eixo y) e número da sequência da ressonância no tempo (eixo x) dos grupos..... 53
- Figura 16. Corte histológico transversal do tendão de Aquiles de coelho do grupo 1 (controle). Observa-se uma citoarquitetura preservada, com fibras tendíneas organizadas, eosinofílicas, vasos esparsos e bainha tendínea com fina espessura, homogênea e organizada (indicar). Coloração HE..... 56

- Figura 17. Corte transversal do tendão de Aquiles de coelho do grupo 2 (sem PRP) demonstrando a área de ressecção do tendão com fibrose em cunha (seta azul) e próximo à mesma observa-se região com perda da eosinofilia, desorganização arquitetural com maior numero de núcleos (seta amarela). Observa-se um espessamento da bainha tendínea e desorganização de suas fibras colágenas. Coloração HE..... 57
- Figura 18. Corte transversal do tendão de Aquiles de coelho do grupo 3 (com PRP), demonstrando a área de ressecção do tendão com fibrose em cunha (seta azul) e junto a esta região observa-se área com perda da eosinofilia, desorganização arquitetural com maior numero de núcleos (seta amarela). Observa-se um espessamento da bainha tendínea e desorganização de suas fibras colágenas. Coloração HE,..... 58

- Figura 19 Corte histológico ampliado do tendão da figura 18. **a.** demonstrando corte ampliado com fibras organizadas, eosinofílicas, normoposicionadas. **b.** corte ampliado da região da seta amarela na figura 18 demonstrando aumento do número dos núcleos celulares, com conseqüente aumento do número de células, neoformação vascular (seta) e fibras desordenadas **c.** demonstrando corte ampliado na bainha tendínea com espessura preservada, vasos esparsos **d.** corte ampliado da região da bainha tendínea demonstrando o mesmo espessado, com fibras desorganizadas, com áreas de neoformação vascular (seta). Coloração HE..... 59
- Figura 20. Corte ampliado da região da seta amarela na figura 18 demonstrando aumento do número dos núcleos celulares, com conseqüente aumento do número de células, neoformação vascular (seta) e fibras desordenadas Coloração HE..... 60
- Figura 21. Corte com maior ampliação demonstrando os vasos neoformados no interior da área de tendão em borda da região cicatricial, Coloração HE..... 61
- Figura 22. Detalhe de reação de corpo estranho de ponto cirúrgico para marcação do local da ressecção tendínea(seta)(Coloração HE) 62

Figura 23.	Corte transversal do tendão de Aquiles no coelho 2 do grupo 2 (intervenção cirúrgica sem aplicação de PRP), demonstrando área de fibrose (seta) que se correlaciona com área de hipersinal à RM (HE).....	63
Figura 24.	Correlação das imagens histológicas (imagem de histologia das figuras 16, 17 e 18), à direita e RM com perfusão à esquerda nos três grupos estudados. Observar que as regiões fibrocicatriciais corresponderam as áreas com focos de hipercaptação de contraste na RM (seta branca)	65
Figura 25.	Análise das medidas microscópicas dos diâmetros dos tendões de Aquiles nos três grupos estudados. a diâmetro ântero-posterior b diâmetro transversal. Teste de Tukey ($p<0,05$).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Peso dos animais,(media \pm desvio padrão).....	32
Tabela 2.	Resultado das médias dos valores das concentrações de plaquetas no sangue periférico e no PRP, do grupo 3 operado com PRP.....	46
Tabela 3.	Média \pm desvio padrão das variáveis diâmetro ântero posterior, transverso e artéria tibial posterior	54
Tabela 4.	Valores de neutrófilo, linfócito, monócito, eosinófilo e basófilo no PRP.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FOV: Field of view (campo de visão)

HE: Hematoxilina eosina

Kg: kilo

Mg: miligrama

ML: milímetros

Mmol: milimol

Nex: Número de excitações

PRP: Plasma Rico em Plaquetas.

RM: Ressonância Magnética

RPM: rotações por minuto

TA: Tempo de aquisição

TR: Tempo de Repetição do Eco

TE: Tempo do Eco

URM: Unidades de Ressonância Magnética.

US: ultra-som

LISTA DE SÍMBOLOS

α : alfa

β : Beta

μm : micômetro

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	23
2.0	JUSTIFICATIVA.....	29
3.0	OBJETIVO.....	30
4.0	MÉTODO.....	31
4.1	Animais.....	31
4.2	Grupos experimentais.....	31
4.3	Preparo do plasma rico em plaquetas.....	32
4.4	Procedimento cirúrgico.....	34
4.5	Ressonância magnética	37
4.6	Parâmetros avaliados na ressonância magnética.....	41
4.7	Eutanásia dos animais e coleta dos tendões.....	42
4.8	Processamento e análises histológicas.....	43
4.9	Análises estatísticas.....	45
5.0	RESULTADOS.....	45
5.1	Concentração de plaquetas e de glóbulos brancos no PRP.....	45
5.2	Ressonância magnética nos três grupos estudados.....	46
5.3	Diâmetro ântero-posterior (DAP), transverso (DT) do tendão.....	54
5.4	Análise histológica.....	55
5.5	Correlação entre as imagens da RM e achados histológicos nos três grupos estudados.....	64
5.6	Medidas dos diâmetros ântero-posterior e transversos pela microscopia.....	66

6.0	DISCUSSÃO.....	67
6.1	Modelo animal.....	67
6.2	Concentração de plaquetas no PRP.....	67
6.3	Ressonância magnética sem perfusão como método de avaliação.....	68
6.4	Ressonância magnética com perfusão como método de avaliação.....	70
6.5	Resultados da artéria tibial posterior, diâmetro AP e Transveral.....	71
6.6	Valores das sequências de RM com perfusão.....	72
6.7	Eficácia do PRP.....	73
6.8	Análise histológica.....	74
7.0	CONCLUSÃO.....	76
8.0	PERSPECTIVAS.....	77
9.0	REFERÊNCIAS.....	78
10.0	ANEXOS.....	88
10.1	Parecer do CEUA.....	88
10.2	Anexos.....	87

1. INTRODUÇÃO

Dentre os grandes desafios da Medicina encontra-se o desenvolvimento de compostos cirúrgicos bioativos que regulem a inflamação e a cicatrização¹. A cicatrização dos tecidos é mediada por uma ampla variedade de eventos intra e extracelulares, que são regulados por proteínas de sinalização. A compreensão de todo o processo ainda está incompleta. No entanto, sabe-se que as plaquetas desempenham um papel crucial não apenas na hemostase, mas também no processo de cicatrização da ferida².

A utilização de produtos autólogos, com elevadas concentrações de plaquetas, como o plasma rico em plaquetas (PRP), concentrado de plaquetas e os géis de plaquetas foram desenvolvidos baseando-se no conceito dos efeitos dos fatores de crescimento de plaquetas. A razão científica para a utilização dessas preparações baseia-se no conhecimento de que os fatores de crescimento desempenham um papel essencial nos mecanismos de reparação de tecidos^{3,4,5}.

O PRP é um concentrado plaquetário com elevado teor de fatores de crescimento^{6,7} que vem sendo utilizado em diversas áreas da medicina, como na cirurgia plástica⁸, oftalmologia⁹ e ortopedia^{10,11,12,13}, na expectativa de acelerar o processo de cicatrização, com reparação ou regeneração tecidual de melhor qualidade.

O potencial do PRP em aumentar a capacidade de reparação tecidual é atribuído à presença de alta concentração de fatores de crescimento¹⁴, que são proteínas armazenadas em organelas citoplasmáticas denominadas grânulos

alfa¹⁵. Além destes grânulos, as plaquetas também carregam os grânulos densos, que possuem substâncias como histamina, serotonina, dopamina e catecolaminas, que podem ser responsáveis por alguns efeitos observados no PRP, tal como a analgesia¹⁶. Uma vez iniciada a cascata da coagulação, a trombina presente no plasma ativa as plaquetas, que se agrupam para formação do coágulo e liberam os grânulos citoplasmáticos¹⁵.

Diversos fatores de crescimento foram identificados no PRP, como o fator de crescimento de transformação-beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento derivado de insulina do tipo I (IGF-I), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF)⁶. O PRP apresenta uma concentração de fatores de crescimento três a cinco vezes maior que a do sangue, mas estes fatores permanecem em proporções fisiológicas entre si, balanceando seus efeitos isolados¹⁷.

Efeitos do PRP e dos fatores de crescimento em tendões e ligamentos foram relatados *in vitro* e *in vivo*, como estimulação da proliferação de fibroblastos por IGF-I, bFGF e PDGF. Além disso, há relatos de estímulo da síntese de colágeno e da matriz extracelular pelo TGF- β ^{14, 18, 19, 20}, provavelmente resultando em uma maior regeneração e aumento da resistência tecidual^{21,22}.

Em Medicina Esportiva, especialmente no esporte de alto desempenho, o objetivo do tratamento das lesões é o retorno seguro ao esporte, no menor tempo possível, sem limitações e com mínimo risco de recidiva. Com esse

intuito, o PRP está sendo aplicado em vários tipos de lesões traumáticas ou por sobrecarga, como lesões tendíneas^{23, 24, 25, 26, 27}, ligamentares^{28, 29, 30, 31}, musculares³² e de cartilagem¹⁰. Já foi demonstrado que o uso de fatores de crescimento isolados ou do PRP aumentou a regeneração do terço central do tendão da patela tanto *in vitro* como *in vivo*³³.

Os métodos de obtenção do PRP descritos até o momento podem ser divididos em dois tipos: por centrifugação ou por plaquetaférese. O PRP obtido por plaquetaférese foi utilizado nos primeiros estudos e o método de centrifugação foi desenvolvido em seguida, como uma alternativa mais rápida e menos dispendiosa de obtenção do PRP^{6,7}. O PRP obtido por aférese, apresenta maior concentração de plaquetas e menor concentração de leucócitos do que o obtido por centrifugação³⁴, podendo ser considerado portanto um concentrado de plaquetas mais puro¹, porém, de maior custo e de maior dificuldade de produção. Os métodos de acompanhamento da eficácia do PRP são vários sendo que os exames de imagem tem sido cada vez mais utilizados neste sentido.

Atualmente, existe um crescente interesse na utilização da ressonância magnética (RM) para controlar e acompanhar a cicatrização dos tendões. O processo de cicatrização, após a ruptura do tendão de Aquiles e reparado cirurgicamente já foi descrito à RM³⁵. O estudo perfusional foi inicialmente descrito para uso em RM cardíaca. O seu desenvolvimento se deve a melhoria das antenas de superfície, com avanço significativo na qualidade da imagem, com melhor sinal e sem ruído³⁶.

O contraste usualmente utilizado nos estudos de RM é o gadolínio, o qual foi introduzido para uso clínico em 1988. O gadolínio é um raro elemento metálico lantanoide com propriedades ferromagnéticas. Por ser um metal, deve estar na forma iônica, para dissolver na água e funcionar como meio de contraste. Este contraste é um agente paramagnético, que induz o encurtamento do tempo de relaxamento T1 dos núcleos de elétrons excitados, conduzindo ao aumento de sinal e conseqüente aumento do contraste de determinados tecidos³⁷. O gadolínio, é altamente paramagnético, até em baixas doses. Após administração intravenosa em *bolus*, com a utilização de uma bomba injetora, o contraste difunde-se rapidamente pelo espaço extracelular, sendo posteriormente eliminado de maneira inalterada pela filtração glomerular renal³⁸.

Os estudos de perfusão miocárdica por meio da RM se desenvolveram consideravelmente na última década, tornando possível a aquisição de planos de sete a oito imagens em cada ciclo cardíaco no repouso e dois ciclos no estresse, usando gradientes de alto desempenho e métodos híbridos ecoplanares. Os estudos de perfusão podem ser quantificados, mas também é possível a visibilização direta das anormalidades de perfusão, como defeitos subendocárdicos com menor captação pelo contraste em relação ao restante do músculo miocárdico³⁹.

O uso da dinâmica de captação do Gd à ressonância magnética (DCRM/perfusão), anteriormente descrita para RM cardíaca, tem sido recentemente utilizada como um método importante para avaliar várias doenças, entre elas, do sistema osteomuscular, especialmente tumores⁴⁰ e

artropatias^{41,42}, sendo rara a sua aplicação no estudo tendíneo⁴³. A DCRM é, portanto, um método de imagem fisiológico que avalia as cinéticas de realce do agente de contraste. Como as sequências de RM são realizadas durante e imediatamente após a injeção de bolus do agente de contraste, a RM reflete a distribuição inicial do contraste nos capilares e tecido intersticial⁴⁴. Esta técnica fornece informações como a vascularização do tecido, perfusão e permeabilidade capilar. Os padrões estáticos usuais de imagens com gadolínio são realizados, usualmente, com sequências longas de alguns minutos e após a injeção do agente de contraste⁴⁵, já na fase onde o agente de contraste está em equilíbrio entre os vasos sanguíneos e os espaços intersticiais⁴⁴, o que não representa o realce fisiológico. As imagens obtidas por DCRM representam uma nova técnica de avaliação dinâmica do tendão na fase pós-contraste, que poderia contribuir com informações sobre a permeabilidade vascular nas estruturas avaliadas.

A frequência de ruptura do tendão de Aquiles tem aumentado e, provavelmente, está relacionada à prática de esportes de maior demanda sendo submetidos a maior carga, ocorrendo mais comumente em homens acima de 40 anos. O melhor tratamento ainda é controverso e a recuperação pode demorar cerca de um ano. Muitos pacientes não apresentam recuperação completa de força e função, mesmo com intensa reabilitação⁴⁶.

Tem-se demonstrado, nos últimos anos, que a reabilitação acelerada com deambulação precoce é importante na recuperação pós-cirúrgica do tendão de Aquiles^{47,48}. O sucesso desta terapêutica está na capacidade de se minimizar

o risco de nova ruptura e de outras complicações⁴⁹.

O estudo do PRP no tratamento de afecções do tendão de Aquiles foi realizado em poucos estudos em seres humanos, sendo destes um ensaio clínico randomizado²⁷ e cinco series de casos prospectivos^{50,51,52,53,54}. A maioria dos tendões (81%) foram tratados com uma única injeção focal de 3 a 4 ml de PRP. Em uma série de casos de pacientes com tendinopatia de Aquiles, não responsiva ao tratamento conservador, duas injeções guiadas por ultrassom (US) e escarificações extensas, foram eficazes na redução da dor, melhora da função e melhora da estrutura do tendão como avaliado pela US⁵¹. Apesar de melhora clínica e estrutural relatada em estudos não controlados, o estudo randomizado não conseguiu demonstrar diferença estatística entre os grupo com e sem PRP.

Existem poucos trabalhos experimentais que abordam o uso do PRP e, em geral, a avaliação dos resultados é feita apenas por análise histológica^{55,56}. Tendo em vista que na prática clínica o método de avaliação deve ser indireto e não invasivo, realizou-se o presente estudo incluindo avaliação por imagem.

2. JUSTIFICATIVA

Os primeiros relatos do uso do PRP em cirurgia datam de meados da década de 1990, em cirurgias bucomaxilofaciais. A partir de então, o PRP vem sendo utilizado em diversas áreas da Medicina e Cirurgia, inclusive na Ortopedia e Medicina Esportiva. Apesar de ser um assunto bastante discutido e debatido na atualidade, há uma carência de estudos prospectivos, randomizados, de elevado nível de evidência científica, que corroborem sua utilização.

Em estudos animais, a extensão, localização e tempo de evolução da lesão podem ser padronizados experimentalmente. As lesões tendíneas e ligamentares traumáticas em seres humanos são muito heterogêneas, o que dificulta o seu estudo e avaliação do resultado do tratamento.

Este é um trabalho cujo objetivo é avaliar a aplicação do PRP na regeneração do tendão de Aquiles em coelhos utilizando-se de métodos histológicos e por RM com e sem perfusão como método de avaliação da cicatrização tendínea. A avaliação portanto utilizando-se um método de imagem não invasivo, como a ressonância magnética, é um modelo que pode vir a ser utilizado na prática médica.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito do PRP na regeneração do terço central do tendão de Aquiles, por meio da ressonância magnética e análise histológica.

4. MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 22 coelhos machos, brancos, 6 meses, da raça New Zealand, obtidos da Fazenda da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no Centro de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UFMG, em gaiolas com 310 mm de largura, 550 mm de comprimento e 320 mm de altura, em temperatura e iluminação ambientes, recebendo diariamente água e alimento completo para coelhos (Nutri-coelho- Agribrands do Brasil Ltda). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG sob o protocolo número 183/2012 (Anexo 1). O cálculo do tamanho amostral foi realizado segundo Armitage & Berry, 1987⁵⁷, sendo nove o número máximo de animais encontrado por grupo de tratamento.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos:

Grupo 1 (n=4) = controle, sem intervenção cirúrgica no tendão de Aquiles

Grupo 2 (n=9) = intervenção cirúrgica no tendão de Aquiles e sem uso local de PRP

Grupo 3 (n=9) = intervenção cirúrgica no tendão de Aquiles e uso local de PRP

Os grupos de animais estudados foram homogêneos entre si como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Peso dos animais,(média \pm desvio padrão).

	Grupo1	Grupo 2	Grupo 3
	Controle	Sem PRP	Com PRP
Peso	2375 \pm 419,3 ^a	2733 \pm 387,3 ^a	2889 \pm 534,9 ^a

Médias com diferentes sobrescritos diferem-se estatisticamente mediante teste de Tukey.

4.3 Preparo do Plasma Rico em Plaquetas

Com o animal alerta, acomodado em uma caixa de contenção, coletou-se 9 ml de sangue na artéria auricular, por meio de punção com gelco número 24 Gauge. Esta amostra foi distribuída em dois tubos de ensaios estéreis de 4,5 ml, contendo 0,3 ml de anticoagulante ACD-A-citrato dextrose, que evita a ativação plaquetaria. Realizou-se hemograma, leucograma e contagem de plaquetas no sangue total (Aparelho Abbott Cell-Dyn 3500; Abbott Laboratories, Inc, Abbott Park, Illinois). Após esta análise, o sangue total foi centrifugado durante 8 minutos a uma rotação de 800 rpm (centrífuga FANEM 4 - modelo 280R), em temperatura ambiente. Utilizando-se uma pipeta, o plasma sobrenadante dos tubos, foi coletado e transferido para um tubo único, seco, estéril, seguindo-se nova centrifugação, durante 15 minutos a uma rotação de 3000 rpm. Do produto obtido, pipetaram-se os dois terços superiores do sobrenadante (plasma pobre

em plaquetas), que foram descartados, após a dosagem da sua concentração de plaquetas. O terço inferior foi homogeneizado para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), que foi novamente avaliado por meio de hemograma, leucograma e contagem de plaquetas. O procedimento de coleta e preparo do PRP estão demonstrados na figura 1.

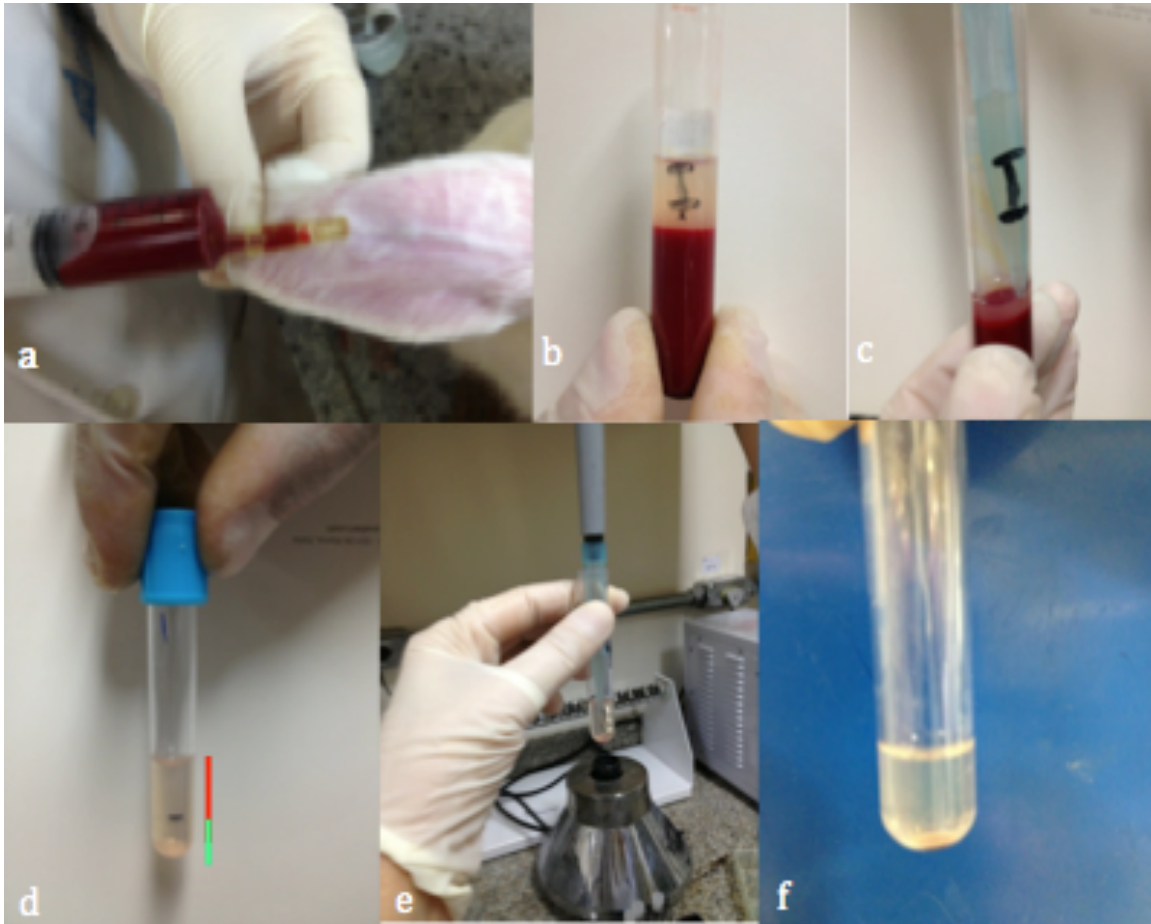


Figura 1. **a.** coleta do sangue na artéria auricular; **b.** após primeira centrifugação a 800rpm por 8 min **c.** Aspirando o sobrenadante **d.** Divisão do plasma rico e pobre em plaquetas após a segunda centrifugação a 3000 rpm por 15 min. **e.** plasma pobre em plaquetas sendo aspirado. **f.** PRP já homogeneizado e utilizado para injeção no tendão.

4.4 Procedimento cirúrgico

Os animais foram pesados e, em seguida, anestesiados com injeção intramuscular de uma solução contendo 40mg/kg de peso de hidrocloreto de dextrocetamina a 10% associada a 5mg/kg de peso de cloridrato de xilazina a 2%, na região proximal do membro pélvico esquerdo. Realizou-se tricotomia na região calcanear direita do animal que foi, logo após, colocado em posição supinada. Fez-se a anti-sepsia com solução degermante digluconato de clorexidina a 2%, seguida pela colocação de campos cirúrgicos. Foi realizada incisão longitudinal na região calcanear e dissecação por planos anatômicos com identificação do tendão de Aquiles (Figura 2). Realizou-se a exérese do terço central do tendão, que media 3 mm de largura e 10 mm de comprimento (Figura 3). Para identificar a localização da porção ressecada, foram colocados quatro pontos com fio de *nylon* 5.0 nos ângulos do defeito como referências e marcadores. Em seguida, por meio de sutura contínua com fio de prolene 6.0, fechou-se a bainha do tendão (paratendão) (Figura 4). No grupo de animais com injeção de PRP, após fechamento do paratendão, injetou-se o resultado da concentração do plasma com volume médio de 0,5 ml de PRP no local da ressecção, utilizando seringa e agulha de insulina (Figura 5). A pele foi fechada com sutura contínua utilizando-se fio de *nylon* 3-0.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em suas gaiolas, sem imobilização do membro operado. Como analgesia pós-operatória, receberam dipirona sódica via oral na dose de 25 mg/kg de peso duas vezes ao dia, por 7 dias.

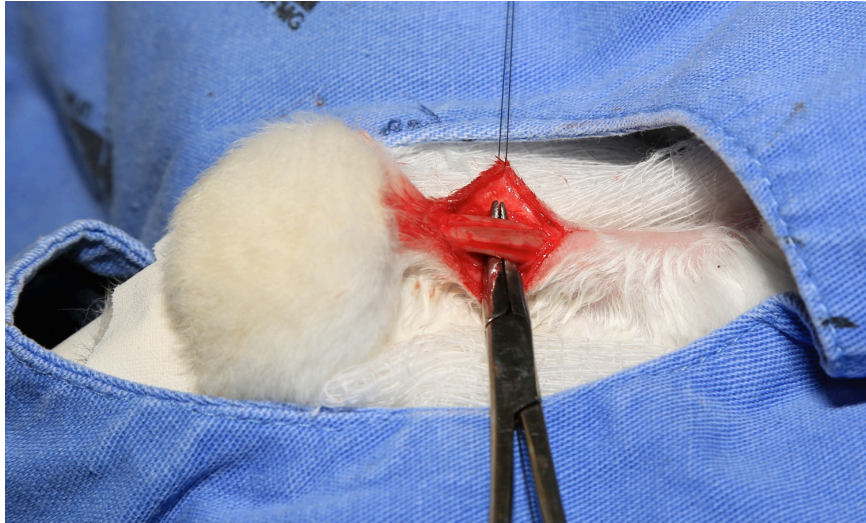


Figura 2: Procedimento cirúrgico com exposição do tendão de Aquiles do coelho.

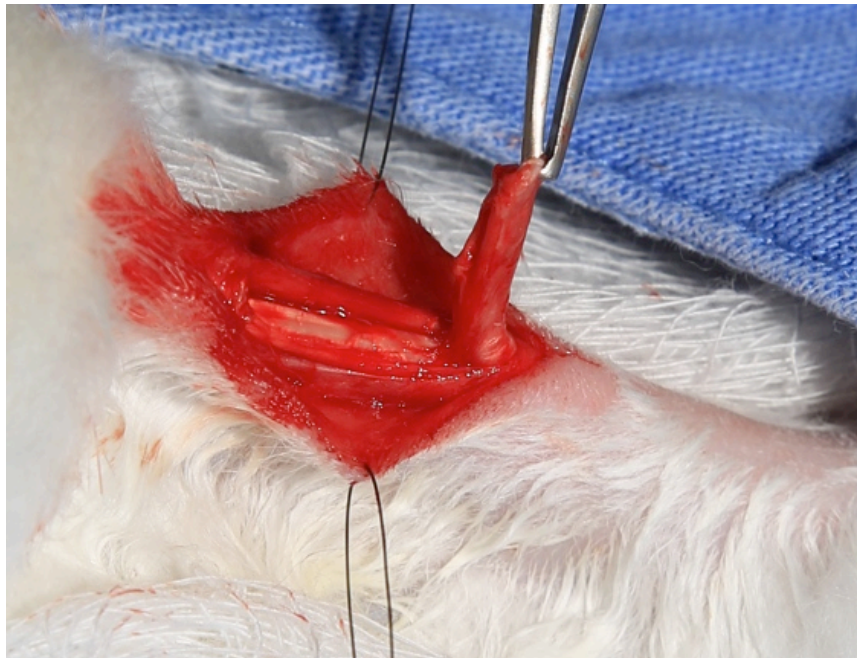


Figura 3: Procedimento cirúrgico do tendão de Aquiles do coelho, evidenciando-se o segmento central do tendão de Aquiles sendo ressecado.

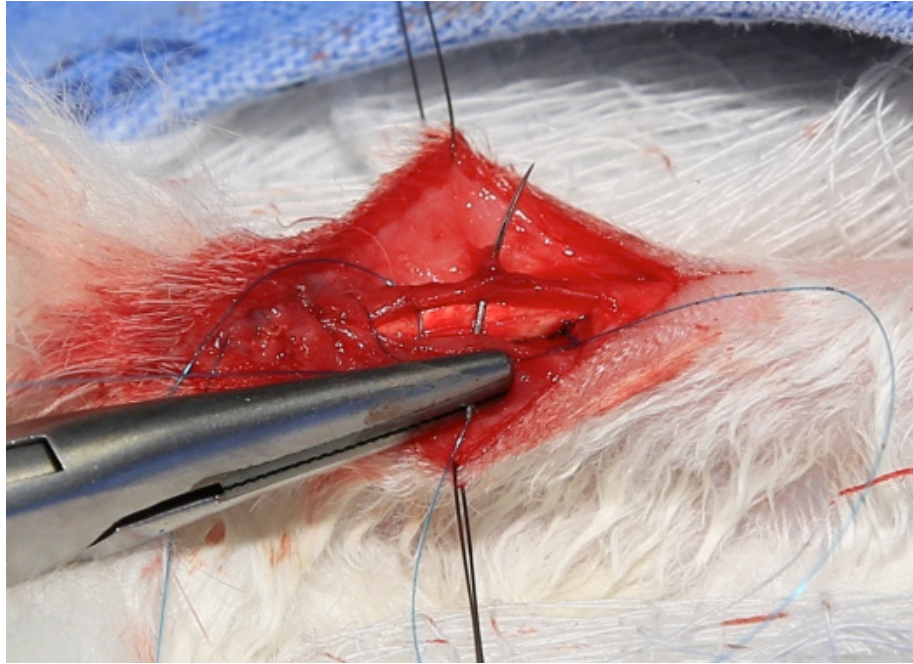


Figura 4 : Sutura contínua da bainha tendínea com fio de prolene 6.0.

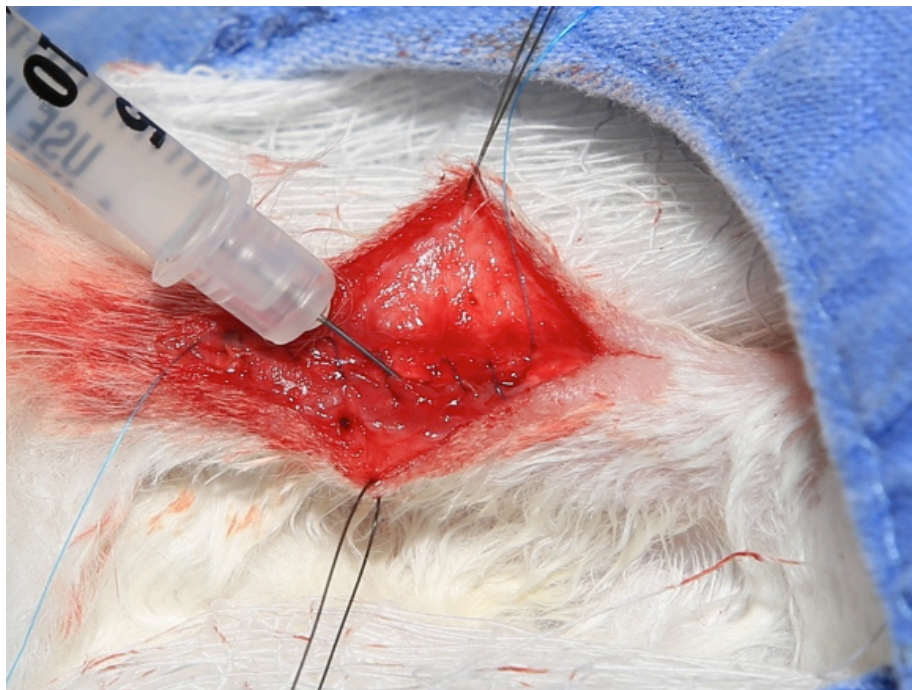


Figura 5: Injeção de PRP após o fechamento da bainha tendínea.

4.5 Ressonância magnética

A ressonância magnética foi realizada, inicialmente, no grupo 1 (controle) e após quatro semanas da intervenção cirúrgica no grupo 2 e 3 (sem e com aplicação local de PRP). Para a realização dos exames, os animais foram previamente pesados e sedados com injeção intramuscular de Xilazina (Calminum, Agener União, Brasil) na dose de 3.5 mg/kg e Cetamina (Ketamina Agener 10%, Agener União, Brasil), na dose de 6 mg/kg.

Obteve-se acesso venoso com gelco 24 Gauge em uma das orelhas do coelho (Figura 6 a,b,c) . O gelco foi acoplado a um extensor de duas vias (Figura 6 d) que foi conectado à uma bomba injetora (modelo Spectris MR Injector – Medrad, Pittsburgh, PA, USA) para a administração de contraste.

Os estudos foram realizados em um aparelho de ressonância magnética HDxt Signa GE 1,5 Tesla (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA). Em decúbito lateral direito, o membro posterior direito do coelho foi posicionado em uma bobina de joelho de nove canais (um emissor e oito receptores) (Figura 7). Foi utilizado a bobina de joelho devido a mesma ser capaz de utilizar o protocolo da perfusão que é uma sequencia volumétrica em três dimensões que é aceita apenas em bobinas específicas. A maca de exame desliza para o interior do magneto. O túnel de exame tem uma forma cilíndrica e mede 55 cm de diâmetro, estando aberto em suas duas extremidades. Uma vez deitado o coelho foi devidamente monitorizado, o calcâneo do animal foi posicionado de forma que estivesse localizado no centro do magneto (isocentro). O contato visual e auditivo com o animal foi, permanentemente, mantido.

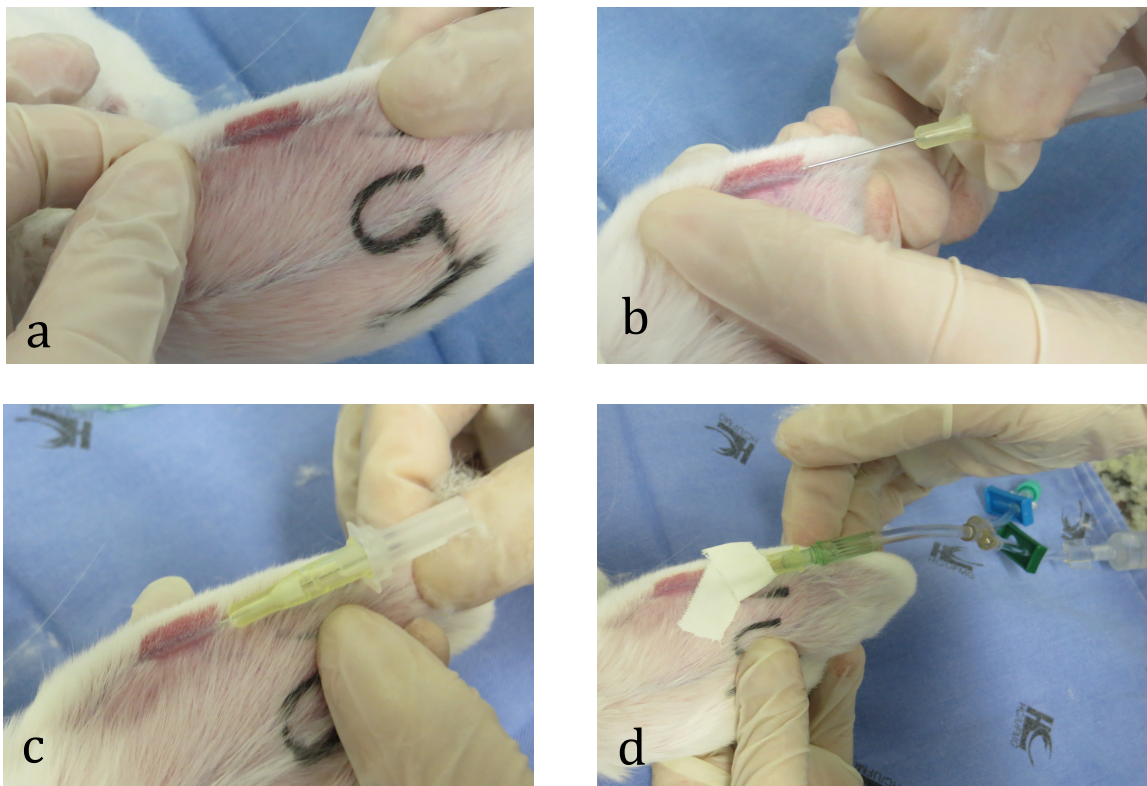


Figura 6. Técnica de acesso venoso na orelha: **a.** tricotomia e identificação da veia; **b.** compressão proximal da veia; **c.** canulação da veia com gelco 24 Gauge; **d.** conexão do gelco a um dispositivo de duas vias para injeção do contraste venoso durante a realização da RM.



Figura 7. Posicionamento do coelho para a realização da ressonância magnética.

O protocolo consistiu de uma sequência axial e sagital ponderada em T2 com supressão de gordura, TR/TE: 5000/75 ms; espessura do corte de 2,5 mm; matriz de 320 x 256; campo de visão [FOV], 100 mm; número de excitações (Nex) 2; e de uma sequência ponderada em T1, plano axial, TR/TE: 700/15 ms; espessura de corte, 2 mm; matriz de 320 x 256; FOV, 120 mm, Nex, 2.

A série dinâmica perfusional, com contraste utilizada foi 3D Spoiled Gradient Recalled Echo (SPGR) no plano axial, com 1,2 mm de espessura de corte, TR / TE; 2/7 ms, "flip angle 8", uma aquisição, FOV de 200, 128 de matriz e TA 20 segundos. Estas sequências eram compostas por 30 cortes, após injeção em *bolus* de gadopentetato de dimeglumine (Magnevist-Schering, Berlim, Alemanha 469 mg/ml), na dose de 0,3 mg / kg de peso corporal. O *bolus* do agente de contraste foi infundido a uma taxa de 1,5 ml/s, seguida por infusão de solução salina (10ml). A injeção de contraste foi iniciada, imediatamente, após a primeira sequência sem contraste da série dinâmica. As cinco sequências dinâmicas com contraste, sem intervalos, foram iniciadas concomitantemente à injeção de contraste. Todas as imagens de realce dinâmicos foram subtraídos da primeira sequência SPGR, pré-contraste.

Um limiar mínimo para exclusão de sinal foi aplicado às imagens pós-contraste para excluir da análise final todos os pixels fora do tendão ou com sinal baixo que impossibilitasse sua análise. Além disso, todos os pixels que apresentaram uma curva mal definida (ou seja, com oscilações de intensidade de sinal significativa no tempo) foram excluídos. Manteve-se fora de análise os artefatos de imagem que pudessem afetar a qualidade da classificação.

4.6 Parâmetros avaliados na ressonância magnética

Os estudos de RM foram avaliados por examinador treinado com seis anos de experiência em RM músculo esquelética, sem conhecimento de qual grupo pertencia o exame.

Na fase sem perfusão, avaliou-se no interior do terço médio do tendão de Aquiles a intensidade de sinal intrasubstancial, presença de focos hiperintensos e a heterogeneidade de sinal. Nas sequências ponderadas em T2 e T1 os diâmetros ântero-posterior, transversal e longitudinal do tendão de aquiles foram medidos, como pode ser visto na figura 8.

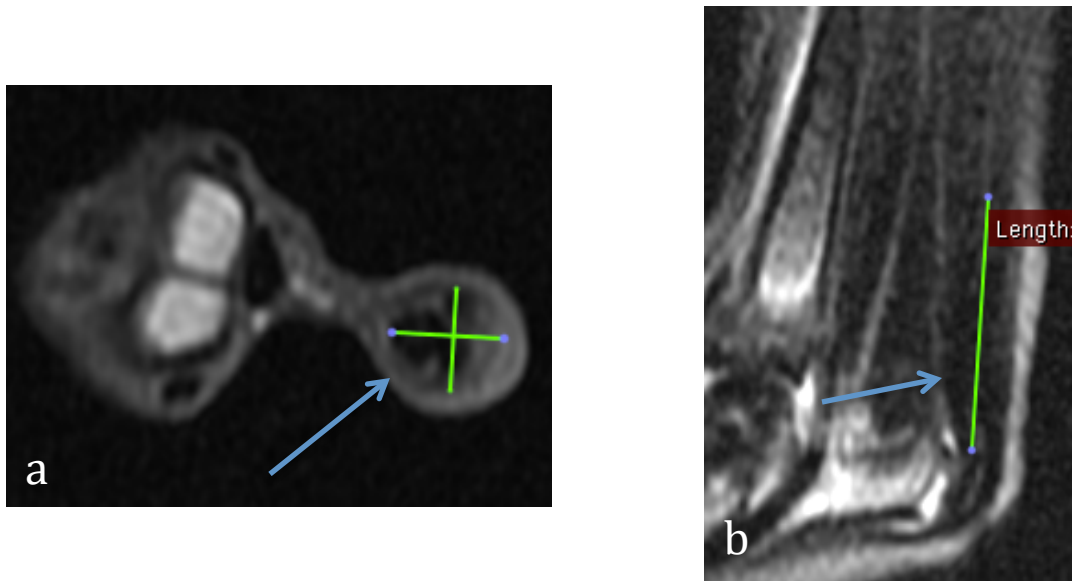


Figura 8: Medidas do tendão a RM **a.** Corte axial em T2 com saturação de gordura com a topografia da medida em antero posterior e transversal do tendão (seta azul). **b.** Corte sagital em T2 com saturação de gordura demonstrando a medida longitudinal do tendão.

Na fase com perfusão, a artéria foi a primeira a ser avaliada na imagem. Verificou-se, automaticamente, os pixels com a maior diferença de intensidade

e, em seguida, foi realizado o estudo por meio da análise de curva com perfusão do terço médio do tendão. Identificou-se na porção intra-tendínea a área que poderia corresponder ao processo de cicatrização. Foi realizado o mapa de cores nas sequencias de perfusão onde foi protocolado que a cor vermelha representa maior intensidade de captação de contraste e azul menor intensidade.

Medidas de realce pelo meio de contraste foram realizadas utilizando-se o ROI que foi colocado na mesma distância a partir da inserção do tendão de Aquiles em todos os estudos de RM. O ROI circular com um diâmetro de 2 mm foi colocado na região com maior reforço no estudo com mapa colorido, evitando-se o plexo vascular e a bainha tendínea. Quando nenhum realce de contraste foi encontrado, as medidas foram realizadas no centro do tendão.

As análises foram realizadas em *workstation* ADW 4.6 GE com o *functool* por dois radiologistas experientes, de forma independente, comparando-se o padrão de curvas de realce pelo meio de contraste.

4.7 Eutanásia dos animais e coleta dos tendões

A eutanásia foi realizada com uma dose letal de anestésico intravenoso com solução de hidrocloreto de dextrocetamina e cloridrato de xilazina logo após a realização da RM (CCAC, 1998), respeitando-se a resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e a Resolução normativa número 13 de 20 setembro de 2013-CONCEA⁵⁸.

Após a eutanásia, realizou-se tricotomia na região calcanear. Abertura por

planos anatômicos com identificação dos fios previamente colocados na região operada. Realizou-se o corte na junção miotendínea e junto à inserção do tendão no calcâneo. A peça foi, imediatamente, acondicionada em frasco apropriado com solução tamponada de formol a 10% e identificada com o número do respectivo animal.

As carcaças dos coelhos foram descartadas conforme o Plano de Gestão de Resíduos em Serviços de Saúde e as normas de biossegurança da Resolução n°5 de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

4.8 Processamento e análises histológicas

Os tendões foram fixados em formol a 10% por 24 horas. Foram identificados o local de sutura da bainha tendínea, assim como, os pontos previamente posicionados para delimitar o defeito (Figura 9a). Realizou-se secção na região central do tendão em dois pontos de modo a obter-se uma fatia central (Figura 9b e c). Esta fatia foi posicionada em recipiente próprio (Figura 9d) para processamento automático com desidratação em série crescente de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%) e diafanização em tres banhos de xilol com posterior inclusão em parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 5 micrômetros de espessura. Seguiu-se a coloração de rotina em hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas foram escaneadas em aparelho Panoramic Middi, marca 3DHISTECH, Budapest, Hungria. A partir das imagens obtidas foram realizadas medidas dos diâmetros ântero-posterior e transversal do tendão, no intuito de se

comparar o volume de tecido cicatricial entre os grupos.

As lâminas foram analisadas por examinador experiente, sem conhecimento de qual grupo pertencia o animal, sobre os seguintes aspectos: presença de tecido de granulação, arranjo dos fibroblastos no tecido tendíneo, presença de capilares, e presença de células inflamatórias.

Para cada animal, colocou-se lado a lado as imagens obtidas nos cortes transversais da RM e secções transversais nos cortes histológicos para avaliar se havia correspondência entre os achados histológicos e aqueles encontrados na RM, procurando-se os marcadores de pontos cirúrgicos.

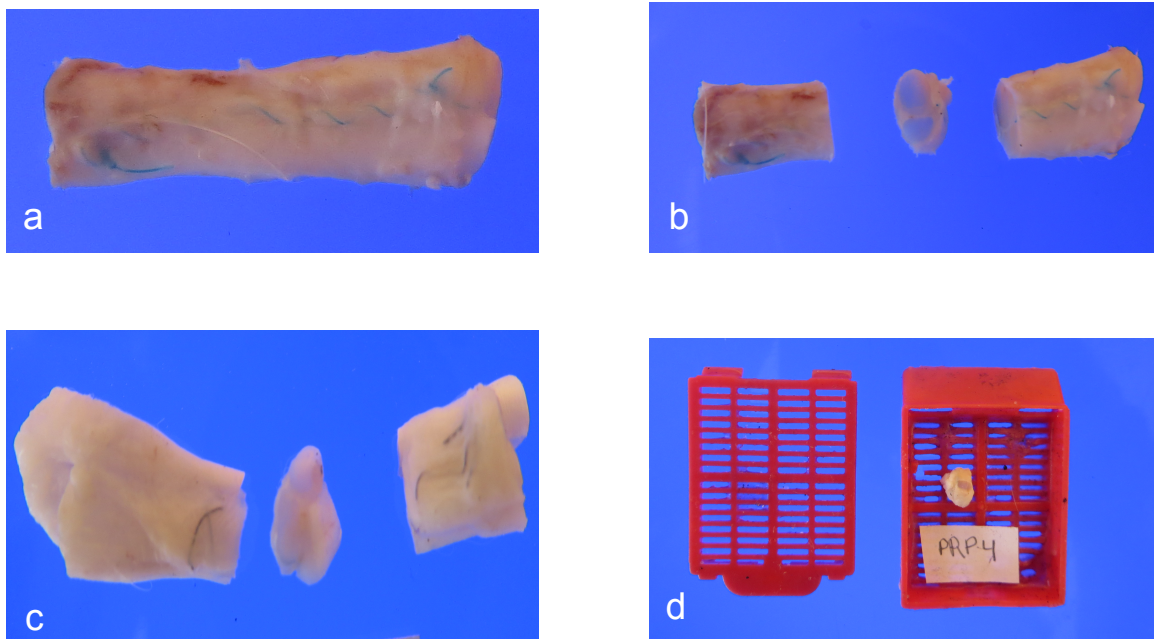


Figura 9. **A.** identificação da sutura e pontos de reparo; **b.** e **c.** secção transversal em dois pontos da região central do tendão no grupo sem PRP (**b**) e no grupo submetido a intervenção cirúrgica com PRP (**c**); **d.** fatia central posicionada em cassete para processamento histológico automático.

4.9 Análises Estatísticas

Foi realizado teste de "D'Agostino & Pearson omnibus normality test" para verificar a normalidade dos erros amostrais⁵⁹, juntamente com a avaliação dos valores de assimetria e curtose. As variáveis que se apresentaram normalmente distribuídas foram comparadas mediante teste de *t de student* não pareado ou análise de variância seguida por teste de comparação múltipla de Tukey dependendo do caso. O teste de F⁶⁰ foi utilizado para comparar os modelos de regressão. O nível de significância (α) utilizado em todo o trabalho foi de 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Concentração de plaquetas e de glóbulos brancos no PRP

Na tabela 2 observa-se uma diferença significativa nas médias da concentração de plaquetas, que no sangue total foi de $365,2 \pm 53,06$ e no PRP passou para $891,8 \pm 250,7$ (teste de t não pareado, $t_{(8)}=6,33$, $p=0,0002$). Houve aumento médio de 244%, no número de plaquetas. A tabela 4 (em anexo) mostra que a concentração de glóbulos brancos no PRP foi mínima.

Tabela 2: Resultados dos valores das concentrações de plaquetas no sangue periférico e no PRP, nos animais do grupo 3.

Animais grupo PRP	Plaquetas sangue	Plaquetas PRP
(n= 9)	periférico (x 10³ / ml)	(x 10³ / ml)
1	354	689
2	336	807
3	466	879
4	390	564
5	361	1315
6	355	1222
7	280	752
8	332	759
9	413	1039
Média±DP	365± 53^a	891± 250^b

* As médias diferem-se estatisticamente mediante Teste t pareado ($p < 0,0002$).

5.2 Ressonância magnética nos três grupos estudados

Na fase sem perfusão, no grupo controle não operado (Figura 10), o tendão de Aquiles apresentou aspecto homogêneo e hipointenso, contornos regulares e bem definidos, na avaliação com as sequências T1 e T2 sem contraste.

Os casos operados com e sem PRP (Figura 11) apresentaram alterações em todos os casos. o tendão de Aquiles apresentou-se com alteração da intensidade de sinal nas sequências ponderadas em T1 e T2, com hipersinal intrasubstancial, com contornos irregulares e mal definidos.

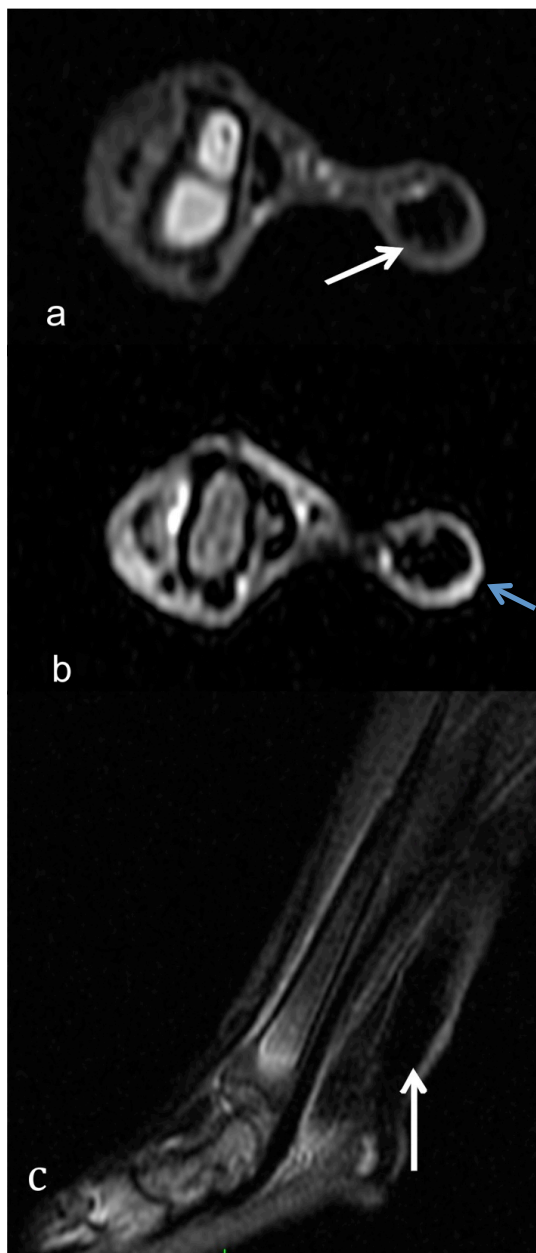


Figura 10: Imagens na RM do tendão de Aquiles (seta branca) do coelho numero 2 do grupo 1 (controle), **a.** corte axial T2, com saturação de gordura, **b.** corte axial, T1 (seta azul no paratenon) **c.** corte sagital T2 com saturação de gordura. Observar a homogeneidade de sinal do tendão que encontra-se difusamente hipointenso.

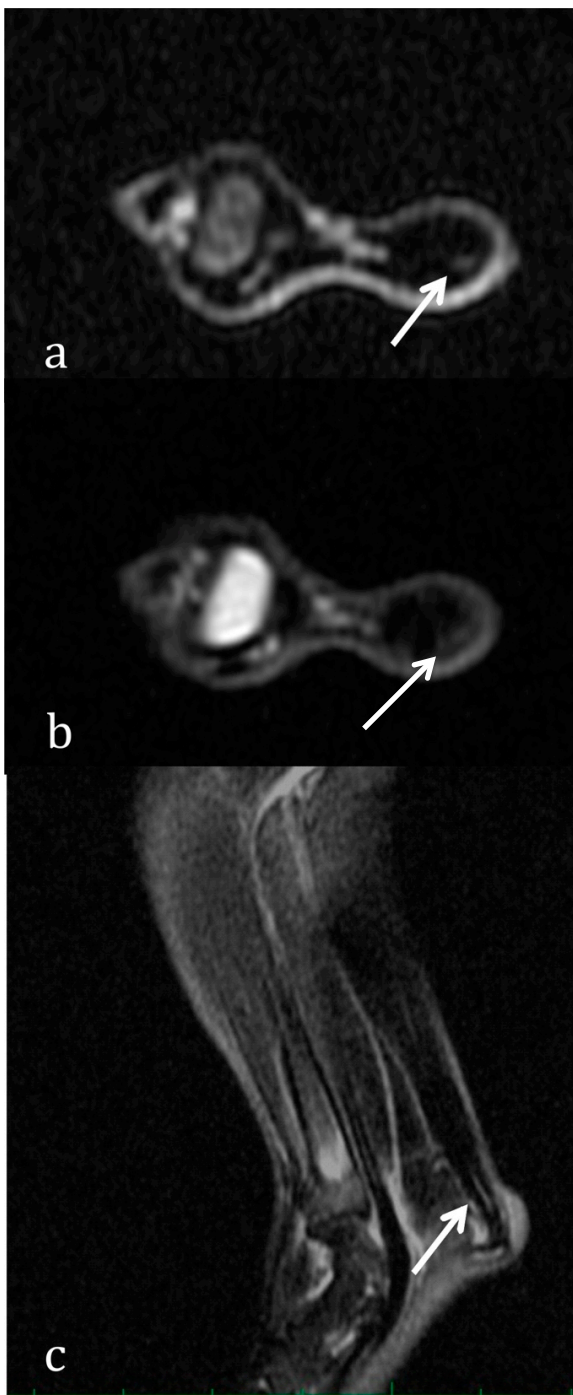


Figura 11: Imagens na RM do tendão de Aquiles do coelho número 2 do grupo 2 (sem PRP). **a.** corte axial T1; **b.** corte axial T2, com saturação de gordura, **c.** corte sagital T2. Observar a heterogeneidade do tendão que apresenta focos de hiperintensidade de sinal em T1 e T2 (setas) .

Na fase com perfusão, no grupo controle na sequência perfusional (Figura 12), não se observou captação de contraste significativa na análise subjetiva, realizada pela visualização direta das imagens. A bainha tendínea apresentou-se fina sem realce pelo meio de contraste. O estudo da curva de captação de contraste demonstrou uma discreta captação tendínea.

Nos casos operados sem (Figura 13) e com PRP (Figura 14), nas sequências com uso de contraste, observou-se intenso realce pelo meio de contraste, na porção peri e intratendínea, facilmente visibilizado nas fases com contraste e no mapa colorido. A bainha tendínea apresentou-se espessada com intenso realce pelo meio de contraste. O estudo da curva de captação de contraste mostrou intenso realce na região de cicatrização.

A variável artéria tibial mostrou uma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos com e sem PRP, no grupo controle a média foi de 1420 URM (Unidades de Ressonância Magnética), desvio padrão de 770. No grupo 2 (sem PRP), o valor médio foi de 1107 URM, desvio padrão de 274 e no grupo 3 (com PRP) o valor médio foi de 721 URM, com desvio padrão de 265.

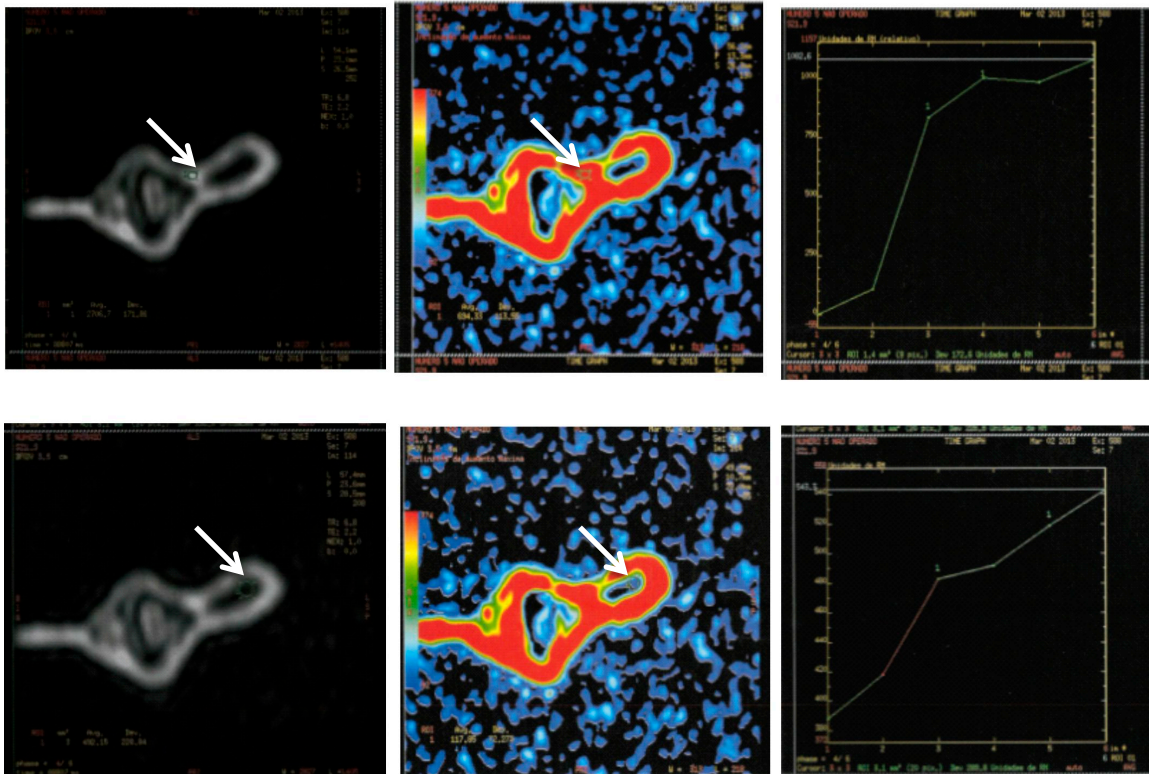


Figura 12. Coelho 2 do grupo 1 (controle). **a.** ROI (seta) no interior da artéria tibial, **b.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **c.** curva de captação de contraste na artéria tibial. **d** ROI no interior do tendão, **e.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **f.** curva de captação de contraste no tendão.

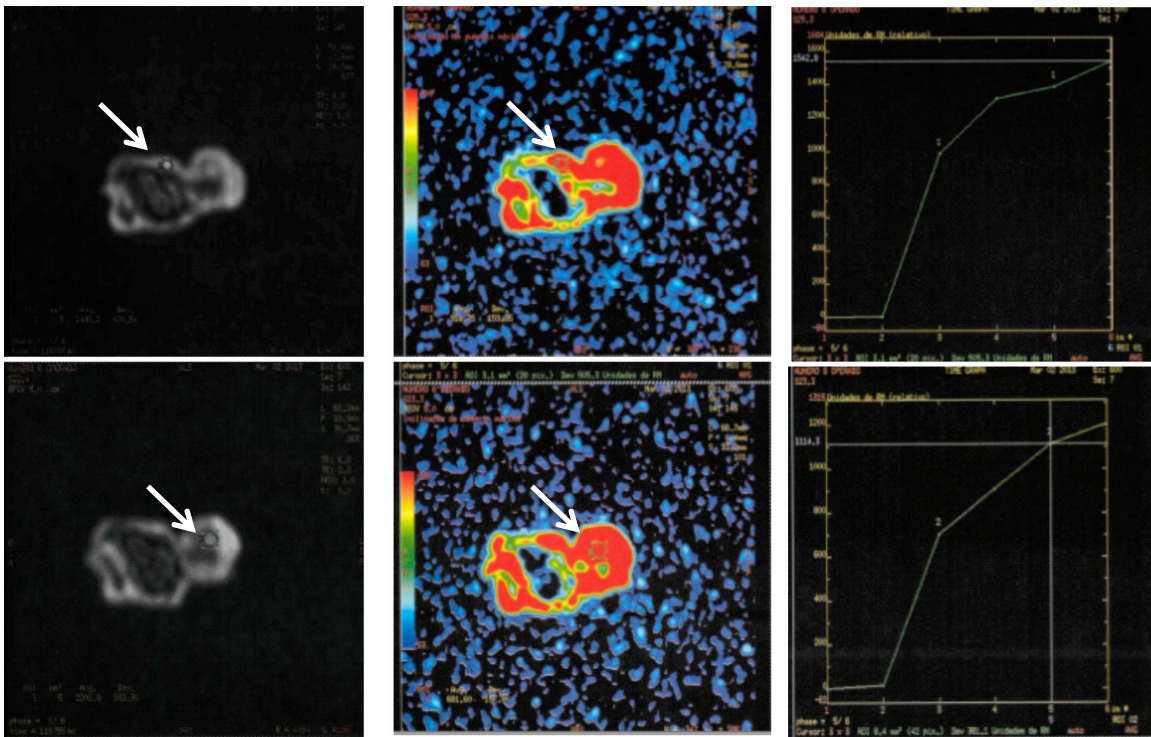


Figura 13. Coelho 9 do grupo 2 (operado sem PRP). **a.** ROI (setas) no interior da artéria tibial (seta), **b.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **c.** curva de captação de contraste na artéria tibial. **d.** ROI no interior do tendão, em sua porção onde apresenta maior realce com hipersinal (seta), **e.** mapa de cores demotrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste **f.** curva de captação de contraste no tendão.

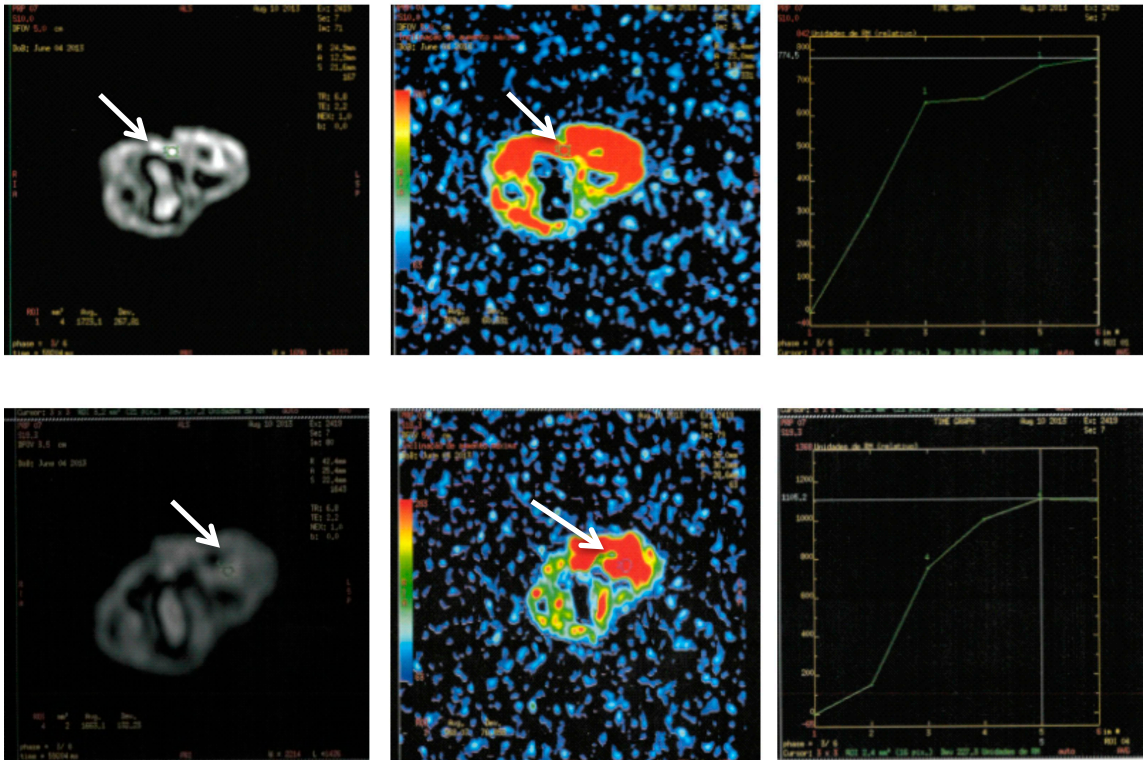


Figura 14. Coelho 9, do grupo 3 (operado com PRP). **a.** ROI no interior da artéria tibial (seta), **b.** mapa de cores demonstrando, em vermelho, áreas com inclinação de aumento máximo de contraste, **c.** curva de captação de contraste na artéria tibial. **d.** ROI no interior do tendão, em sua porção onde apresenta maior realce e heterogeneidade de sinal (seta), **e.** mapa de cores demonstrando em vermelho áreas com inclinação de aumento máximo de contraste no interior do tendão **f.** curva de captação de contraste no tendão.

Na figura 15, que mostra a comparação dos grupos com relação aos padrões de curvas de captação de contraste, observa-se que houve uma diferença significativa entre as curvas resultantes no grupo controle com relação aos outros grupos ($p < 0,0001$), rejeitando-se a hipótese nula de que todos os conjuntos de dados pudessem ser ajustados por um único modelo. Porém, não houve diferença significativa entre o grupo operado sem e operado com PRP ($p > 0,05$).

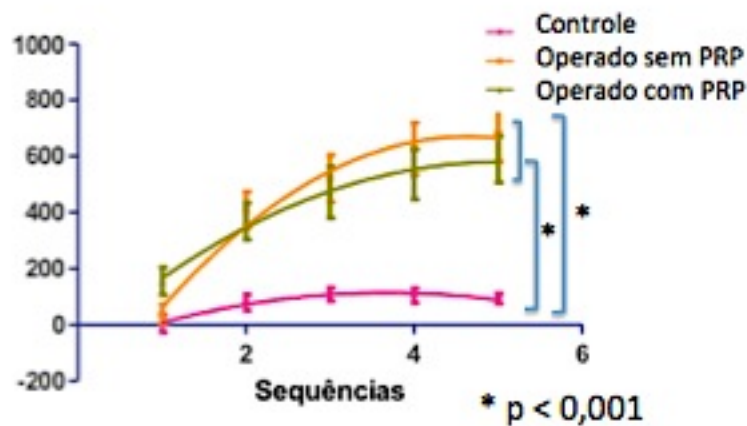


Figura 15. Padrões de curvas de captação de contraste, mostrando valores de unidade de ressonância magnética (eixo y) e número da sequência da ressonância no tempo (eixo x) dos grupos.

5.3 Variáveis diâmetro ântero-posterior (DAP) e transverso (DT) do tendão de Aquiles.

A tabela 3 mostra que os diâmetros ântero-posterior e transverso foram maiores nos grupos 2 (sem PRP) e 3 (com PRP) em relação ao grupo 1 (controle), com diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Entre os três parâmetros não houve diferença entre os grupos com e sem injeção de PRP .

Tabela 3: Média \pm desvio padrão das variáveis diâmetro ântero-posterior, transverso *.

Parâmetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	Controle	Sem PRP	Com PRP
Ap (mm)	4,22 \pm 0,57 ^a	5,53 \pm 1,16 ^b	5,96 \pm 1,10 ^b
T (mm)	3,32 \pm 0,58 ^a	5,53 \pm 1,43 ^b	5,28 \pm 1,90 ^b

*Médias com diferentes sobrescritos diferem-se estatisticamente mediante pós teste de Tukey ($p < 0,05$); Ap (diâmetro ântero-posterior), T (diâmetro transversal).

5.4 Análise histológica

O tendão normal apresenta fibras organizadas, eosinófilas, normoposicionadas (Figura 16). As fibras colágenas apresentaram no grupo operado, sem (Figura 17) e com PRP (Figura 18), desorganização de sua arquitetura, fibras tendíneas de aspecto desordenado, com maior número de núcleos, possivelmente relacionado a proliferação dos fibroblastos.

Foi observado espessamento difuso do tecido peritendinoso (bainha tendínea) nos grupos operados. O volume do tendão na porção tendínea diminuiu nos grupos operados com os espaços preenchidos por tecido colágeno de aspecto neoformado. Múltiplos vasos proliferados e neoformados de paredes finas. Redução do tecido gorduroso na bainha tendínea. Junto à área de ressecção do tendão observa-se área de cicatrização irregular.



500 μ m



Figura 16: Corte histológico transversal do tendão de Aquiles de coelho do grupo 1 (controle). Observa-se uma citoarquitetura preservada, com fibras tendíneas organizadas, eosinofílicas, vasos esparsos e bainha tendínea com fina espessura, homogênea e organizada (seta). Coloração HE .

( ampliação).

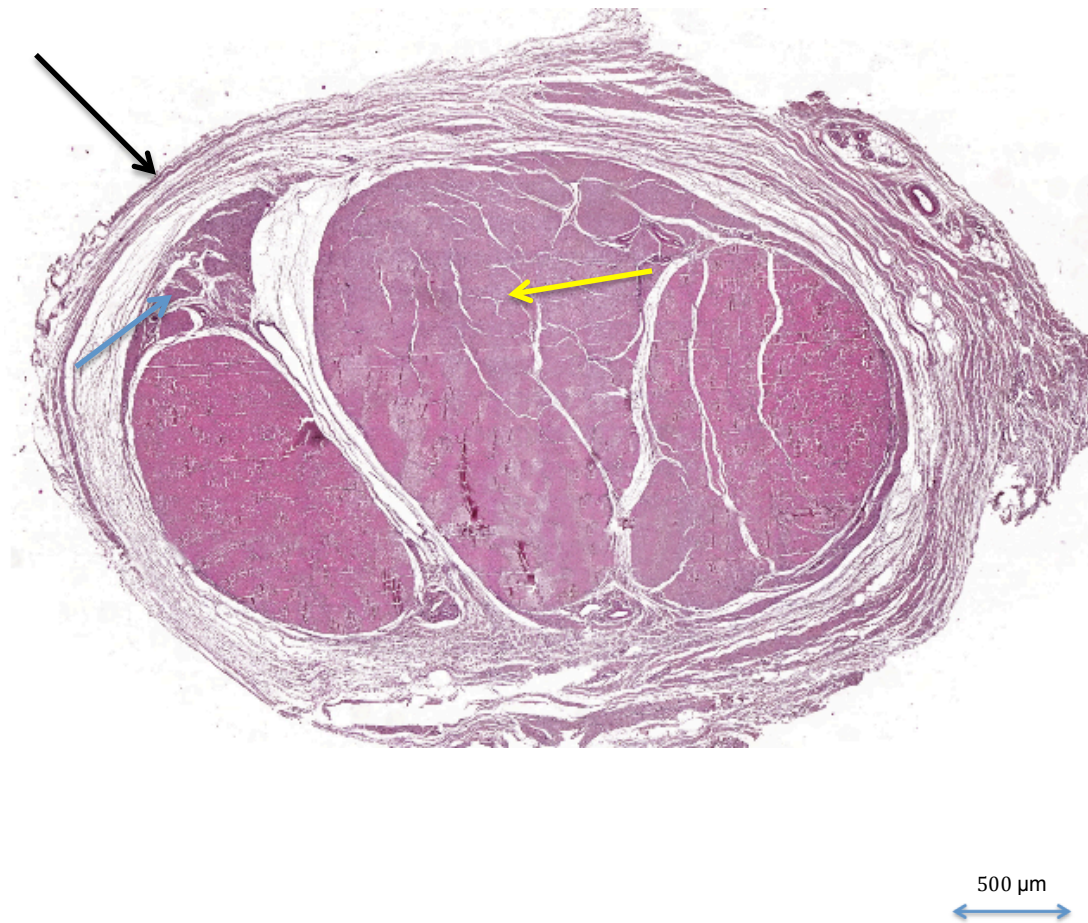


Figura 17: Corte transversal do tendão de Aquiles de coelho do grupo 2 (sem PRP), demonstrando a área de ressecção do tendão com fibrose em cunha (seta azul) e próximo à mesma observa-se região com de perda da eosinofilia, desorganização arquitetural com maior número de núcleos (seta amarela). Observa-se um espessamento da bainha tendínea e desorganização de suas fibras colágenas (seta preta). Coloração HE. (←→ ampliação).



500 μm
↔

Figura 18: Corte transversal do tendão de Aquiles de coelho do grupo 3 (com PRP), demonstrando a área de ressecção do tendão com fibrose em cunha (seta azul) e junto a esta região observa-se área com perda da eosinofilia, desorganização arquitetural com maior numero de núcleos (seta amarela). Observa-se um espessamento da bainha tendínea e desorganização de suas fibras colágenas (seta preta). Coloração HE. (↔ ampliação).

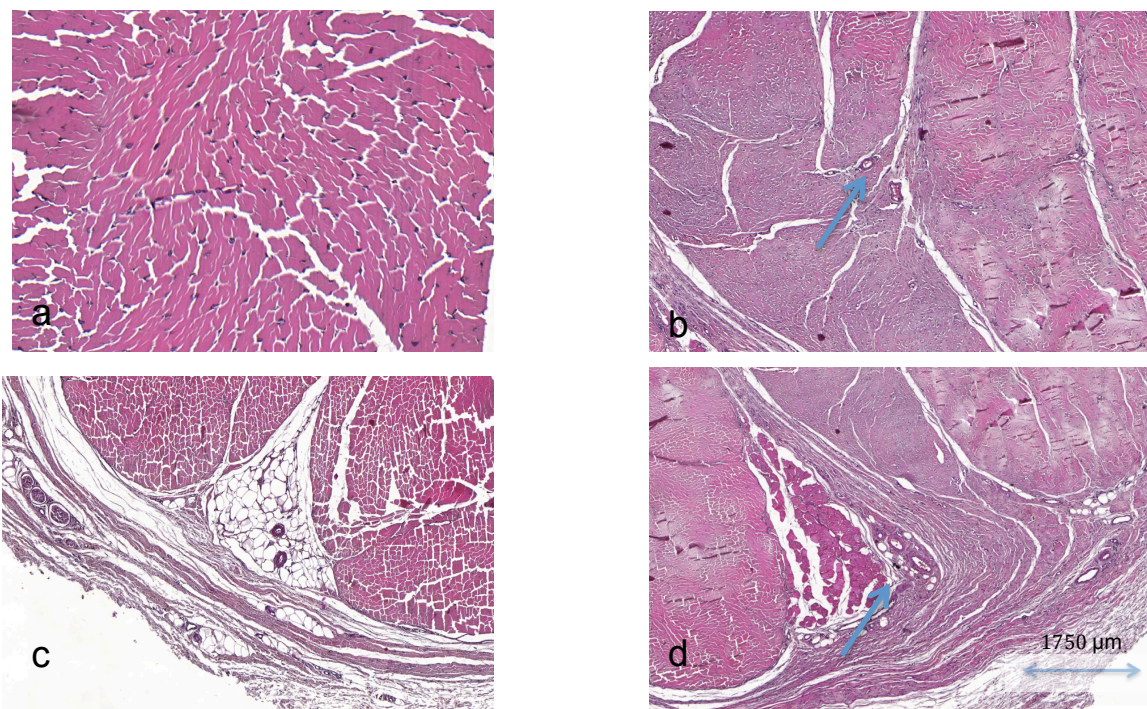
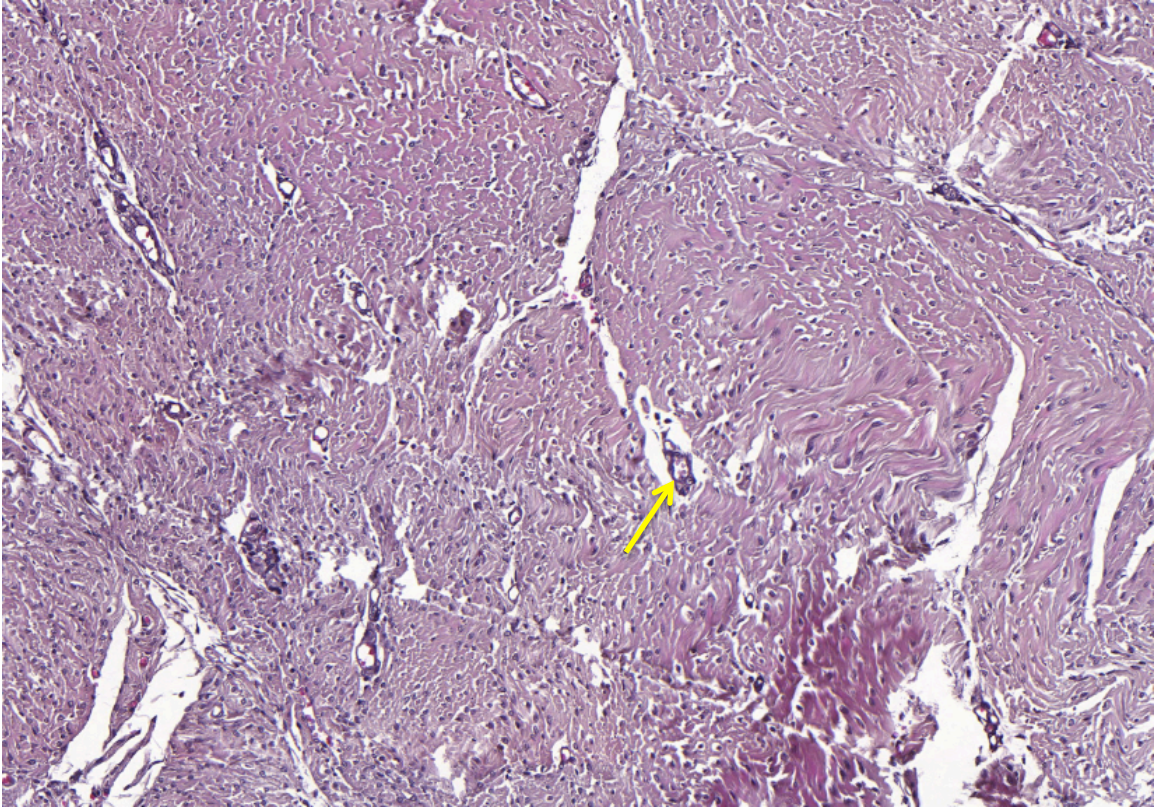
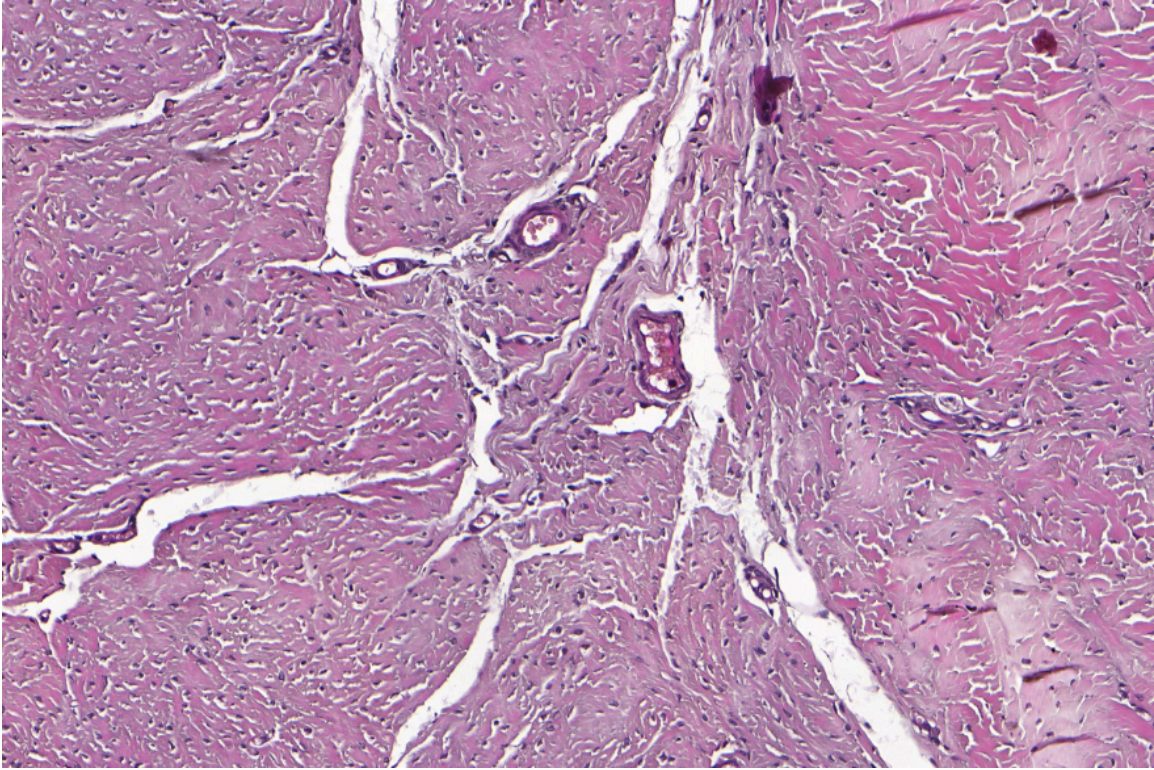


Figura 19: Corte histológico ampliado do tendão da figura 18 **a.** demonstrando corte ampliado com fibras organizadas, eosinofílicas, normoposicionadas. **b.** corte ampliado da região da seta amarela na figura 18 demonstrando aumento do número dos núcleos celulares, com consequente aumento do número de células, neoformação vascular (seta) e fibras desordenadas **c.** demonstrando corte ampliado na bainha tendínea com espessura preservada, vasos esparsos **d.** corte ampliado da região da bainha tendínea demonstrando a mesma espessada, com fibras desorganizadas, com áreas de neoformação vascular (seta). Coloração HE. (\longleftrightarrow ampliação).



1500 µm
↔

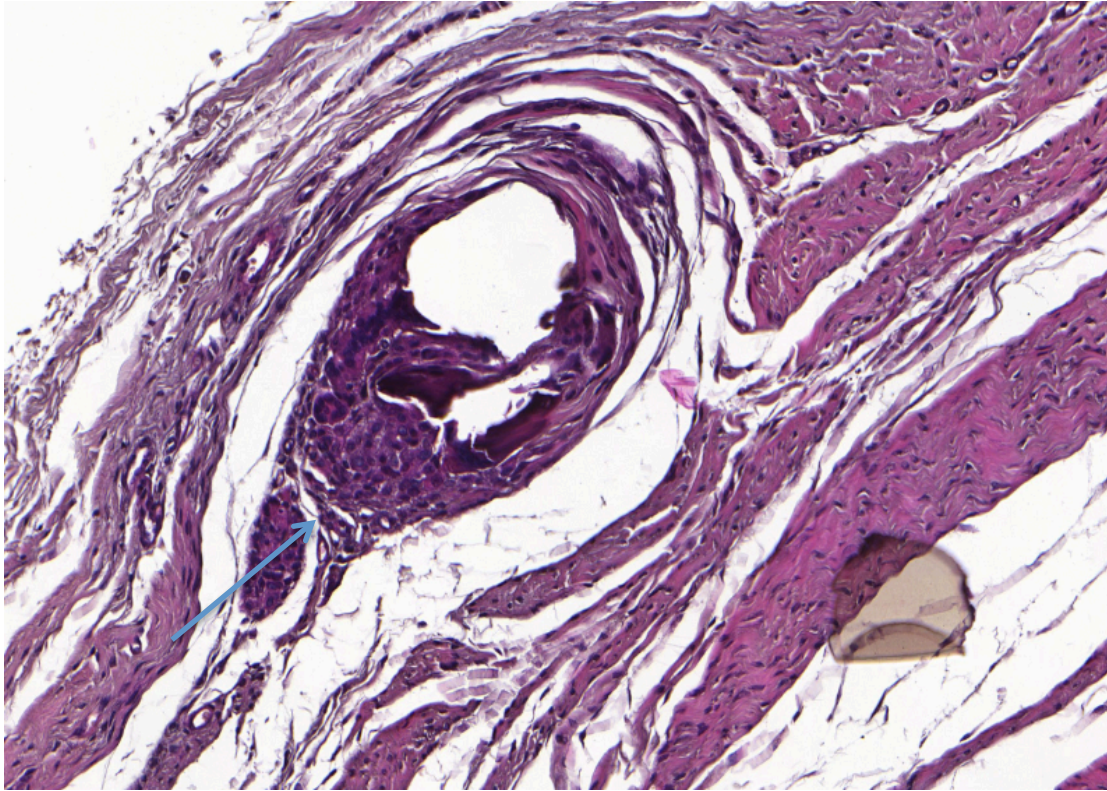
Figura 20: Corte ampliado da região da seta amarela na figura 19 demonstrando aumento do número dos núcleos celulares, com conseqüente aumento do número de células, neoformação vascular (seta) e fibras desordenadas. Coloração HE. (↔ ampliação).



1500 μm
↔

Figura 21: corte com maior ampliação do animal 2 grupo 2 demonstrando os vasos neoformados no interior da área de tendão em borda da região cicatricial, Coloração HE .

(↔ ampliação).



2050 μm

Figura 22: Detalhe de reação de corpo estranho de ponto cirúrgico para marcação do local da ressecção tendínea (seta) (HE). (\longleftrightarrow ampliação).

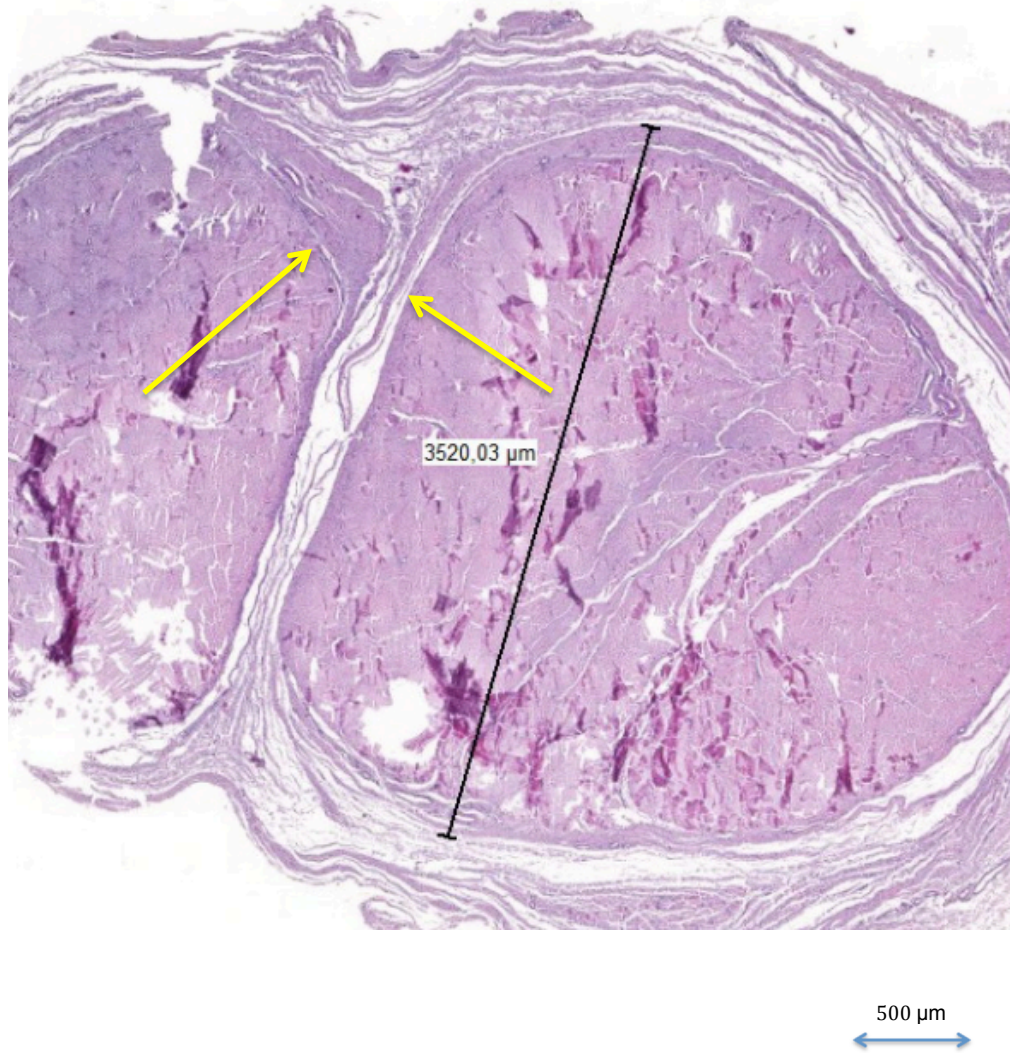


Figura 23: Corte transversal do tendão de Aquiles no coelho 2 do grupo 2, (intervenção cirúrgica sem aplicação de PRP), demonstrando área de fibrose (seta) que se correlaciona com área de hipersinal à RM (HE).

(← → ampliação).

5.5 Correlação entre as imagens da RM e achados histológicos nos três grupos estudados.

No grupo controle (Figura 25), o tendão de Aquiles tem o seguinte aspecto à histologia homogeneamente eosinofílico, fibras colágenas organizadas, de contornos regulares e limites definidos. O que na RM correspondeu à porção tendínea com aspecto hipointenso, homogêneo, com contornos regulares e limites definidos e discreto realce pelo meio de contraste.

Os grupos operados apresentaram-se de aspecto semelhante, o tendão de Aquiles tem aspecto, à histologia, de áreas em cunha com tecido fibrocicatricial, ricas em fibras colágenas de aspecto desordenado. Apresentaram espessamento difuso da bainha tendínea, principalmente em sua porção posterior. Esses achados na RM correspondem a uma alteração da intensidade de sinal intrasubstancial, com focos de hipersinal e espessamento da bainha tendínea, que apresentou irregularidade dos contornos, notando-se intenso realce pelo meio de contraste.

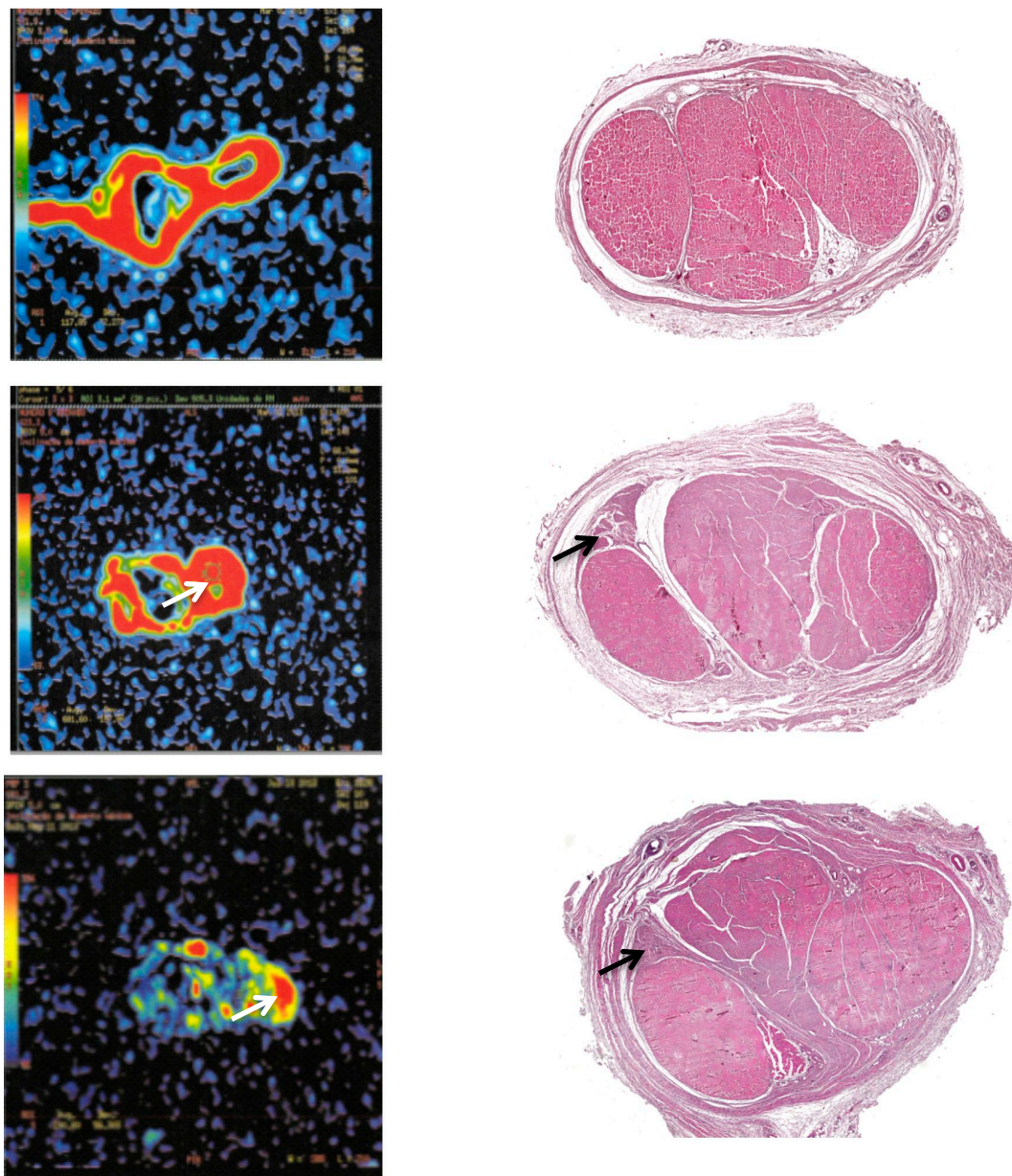


Figura 24. Correlação das imagens histológicas (imagem de histologia das figuras 16, 17 e 18), à direita e RM com perfusão (imagem de RM das figuras 12, 13 e 14) à esquerda nos três grupos estudados. Observar que as regiões fibrocontráteis (seta preta) corresponderam as áreas com focos de hipercaptação de contraste na RM (seta branca) .

5.6 Medidas dos diâmetros ântero-posterior e transversal pela microscopia

A figura 25 mostra que houve diferença estatisticamente significativa na variável medida ântero-posterior entre o grupos operados e o controle, mas não entre dois grupos operados sem e com PRP.

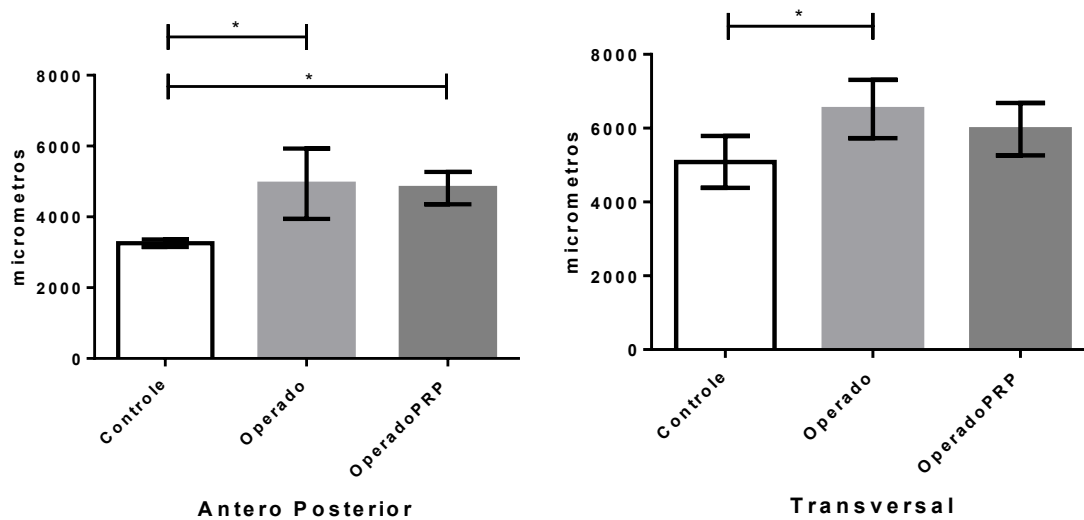


Figura 25: Análise das medidas microscópicas dos diâmetros dos tendões de Aquiles nos três grupos estudados. **a** diâmetro ântero-posterior **b** diâmetro transversal. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.0 DISCUSSÃO

6.1 Modelo animal

O estudo das tendinopatias e rupturas do tendão de Aquiles, com relação à cirurgia e reparação, depende muito de modelos animais^{61,62}. O coelho tem sido utilizado para a pesquisa do tendão porque é amplamente disponível, de fácil manejo e o tamanho do tendão de Aquiles é adequado, tanto para a avaliação histológica, como por imagem^{62,63,64}.

O coelho foi escolhido como modelo animal, também pela facilidade da coleta de sangue na orelha em quantidade suficiente para o preparo do PRP, pois o mesmo animal utilizou o PRP produzido de seu próprio sangue evitando reações cruzadas. Porém, esta coleta deve ser na artéria, pois quando tentou-se obter o sangue por punção venosa, observou-se que o fluxo sanguíneo era lento e a quantidade escassa, o que desencadeava a coagulação do sangue, mesmo com a utilização de anticoagulante (citrato de sódio) na seringa da coleta. O mesmo não aconteceu quanto repetiu-se o método na punção arterial.

6.2 Concentração de plaquetas no PRP

Vários métodos são descritos para a obtenção do PRP. Tentou-se replicar as velocidades de centrifugação recomendadas sem, entretanto, obter-se êxito. Somente após várias tentativas é que se conseguiu padronizar as velocidades de centrifugação. A primeira centrifugação (800 rpm) foi mais lenta para evitar que as plaquetas sedimentassem na interface com as hemácias. Nesta

velocidade elas permaneciam no plasma sobrenadante, enquanto após a segunda centrifugação, que foi mais rápida (3000 rpm), as plaquetas se concentraram na porção inferior do plasma, denominado de plasma rico em plaquetas. Para confirmar-se que os dois terços superiores do plasma eram pobres em plaquetas foi realizada dosagem das mesmas nesta porção, e que posteriormente foi descartada.

A concentração ideal de plaquetas no PRP ainda não é bem definida, porém é citada a concentração em torno de 600 000/mm³,^{65,66}. No presente estudo, a concentração média de plaquetas foi de 895 000/mm³, o que representou um aumento médio de 2,44 vezes a concentração de plaquetas no sangue periférico, e esteve dentro do preconizado como satisfatório pela maior parte dos estudos que abordam este assunto^{6,7,67,68,69}.

A presença de leucócitos pode influenciar as propriedades do PRP, devido à presença de mieloperoxidase, que tem atividade pró-inflamatória e variações nas quantidades de fatores de crescimento, alguns presentes nos leucócitos. A concentração de leucócitos mostrou ser residual no PRP obtido neste estudo (média de 0,91/mm³).

6.3 Ressonância magnética sem perfusão como método de avaliação

O tendão de Aquiles humano é, geralmente, o mais comprometido nos membros inferiores^{70,71}. A literatura apresenta resultados sobre a utilidade deste método no exame da tendinopatia do Aquiles. Karjalainen *et al*⁷² examinando

tendões de Aquiles com ressonância magnética documentaram a sensibilidade da RM na detecção de anormalidades em cerca de 94% nos casos da presença de dor no Aquiles, com uma especificidade de 81% e acurácia de 89%. A concordância interobservador para os resultados de RM foi boa em todas as categorias, no entanto, vários pesquisadores demonstraram uma sobreposição dos achados de imagem em indivíduos sintomáticos e assintomáticos^{73,74}. A presença de heterogeneidade de sinal e aumentos sutis de sinal intrasubstancial ou pequenos focos puntiformes de aumento de sinal em T1 pode representar anatomia normal da fásia ou pequenos vasos⁷³. Em outro estudo, demonstrou-se que em indivíduos assintomáticos, áreas de isosinal em T2 pode representar tendinopatia assintomática/degeneração mucoide. No entanto, áreas de hipersinal T2 e tendões espessados foram associados a sintomas crônicos⁷⁴. Diante disso, sugere-se a importância de avaliação de novos métodos de imagem, como sequencias adicionais aos estudos padrão como a perfusão que estamos testando.

No presente estudo encontrou-se correlação entre o achado de hipersinal intrasubstancial em T2 e focos de isossinal em T1 e a presença de alterações cicatriciais à histologia. Nos tendões dos coelhos controle não observamos alteração de sinal intrasubstancial à ressonância ou alterações à histologia.

6.4 Ressonância magnética com perfusão como método de avaliação

O coelho tem sido amplamente utilizado para pesquisa em relação ao tendão de Aquiles^{62,63,64}. No entanto, poucos estudos avaliaram este tendão utilizando a RM^{75,76,77}.

Estudos experimentais mostram que o maior efeito do PRP ocorre nas fases iniciais da cicatrização e regeneração tecidual^{19,20,21}, e por esta razão, optou-se por realizar a RM decorridos 30 dias do procedimento cirúrgico. Teve-se a intenção de avaliar a cicatrização em fase de remodelação que, usualmente, inicia-se na segunda e terceira semana do processo cicatricial. Desta maneira, seria compatível com o tempo mínimo para início do seguimento nos estudos clínicos que utilizam a RM para avaliar seus efeitos em relação ao uso de PRP como tratamento de lesões tendíneas e ligamentares^{78,79}.

A RM do tendão de Aquiles de coelho no plano axial, com 2 mm de espessura, permite uma visão detalhada que corresponde às relações particularmente encontradas em anatomia seccional. As imagens sagitais, com 2 mm de espessura, foram menos úteis, o que pode ser explicado pela reduzida dimensão dos tendões e à rotação dos mesmos em relação ao plano ântero-posterior.

6.5 Resultados da artéria tibial posterior, diâmetro AP e Transversal

A variável artéria tibial mostrou uma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos com e sem PRP. Não houve diferença na técnica cirúrgica e não se esperava que o PRP pudesse ter causado um efeito de massa ou síndrome compartimental sobre o membro acometido. O achado somente sugere uma diferença fisiológica no grupo, talvez por motivos de arrefecimento da sala. Entretanto, este parâmetro (artéria tibial) não teve o propósito de diferenciar os resultados com relação ao uso do PRP e foi uma medida apenas para confirmar a presença do contraste no membro avaliado.

Alguns estudos tem avaliado a medida do diâmetro ântero posterior e transversal e/ou a área em região de cicatrização como medidas da área de cicatrização^{80,81}, com resultados conflitantes. No entanto optou-se por realizar este tipo de medida por se correlacionar com as medidas de imagem e terem interessante importância na prática clínica.

Os resultados obtidos em relação às medidas dos diâmetros antero-posterior e transversal, não apresentaram diferenças entre os grupos sem PRP e com PRP, o que permitiu a conclusão de que o uso PRP não interferiu nestas medidas, decorridos 30 dias da intervenção cirúrgica. Esperava-se que as medidas no grupo com uso de PRP estivessem mais próximas daquelas do grupo controle. Entretanto, quando observou-se uma diferença significativa, com ambos apresentando medidas superiores em relação ao grupo controle, permitiu-se inferir que o processo cicatricial foi responsável por esta diferença.

Este fato foi confirmado pela análise histológica que mostrou grande parte do tendão substituída por tecido cicatricial, além de uma bainha tendínea espessada.

No presente estudo apenas as medidas dos diâmetros foram utilizadas como variável quantitativa para avaliação da regeneração tendínea. Estas medidas poderiam traduzir o resultado da cicatrização. Pode ser que tenha havido diferenças quanto a expressão de outros potenciais marcadores, como por exemplo, aqueles de fibrose e angiogênese. Porém, estas medidas não foram realizadas nesta etapa deste estudo. Novos estudos deverão ser realizados para elucidar questões da influência do PRP nestes parâmetros.

6.6 Valores das sequências de RM com perfusão

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as curvas resultantes no que diz respeito ao grupo controle e ao grupo operado, não houve diferença entre os grupos operados com e sem PRP. Esse resultado provavelmente se deve ao fato do tendão normal, no grupo controle, usualmente, não apresentar realce significativo pelo meio de contraste, por apresentar menor vascularização, inclusive em estudos histológicos, que demonstram que a sua vascularização é provida, sobretudo, pela bainha tendínea⁸². Não é esperado, portanto, para o tendão sem cirurgia, realce intenso pelo meio de contraste, em virtude de se tratar de uma estrutura considerada relativamente pouco vascularizada.

O principal achado deste estudo foi a diferença do pico máximo de realce

de contraste na perfusão/ DCRM do tendão de Aquiles, entre os grupos que sofreram intervenção cirúrgica e o controle. O mecanismo pelo qual observa-se o realce de contraste nas tendinopatias e no pós-operatório não é totalmente compreendido. Sabe-se que o agente de contraste, primeiramente, se distribui no interior do compartimento vascular e depois se difunde para o interstício extracelular. O aumento da vascularização e/ou permeabilidade vascular, ou mesmo o aumento do volume do estroma intersticial, pode explicar a elevação do realce em áreas patológicas e não no tecido normal circundante, como foi também demonstrando nos casos comparativos de imagem de ressonância com a análise histológica^{83,84}.

6.7 Eficácia do PRP

Os ensaios clínicos empregando o PRP em tendões e ligamentos, como rupturas do tendão de Aquiles²⁴, tendinopatia patelar^{25,26}, epicondilite do cotovelo²³ e lesões do ligamento cruzado anterior^{29,30} geraram resultados conflitantes, dependendo do tipo de estudo e do desfecho avaliado. Grande parte dos estudos não são prospectivos ou randomizados e, desta forma, seu nível de evidência é limitado^{85,86}.

Neste estudo não se observou diferenças entre os grupos com e sem o uso do PRP. Nossos resultados estão de acordo com Schepull *et al*⁸⁷, que em 2010, em um estudo prospectivo e randomizado, não demonstraram eficácia do PRP no tratamento de lesões do tendão de Aquiles. Em consonância, também, com Nin *et al*²⁹ que avaliaram o efeito do PRP nos resultados clínicos de

reconstrução do ligamento cruzado anterior com aloenxerto de ligamento da patela, em um estudo prospectivo, randomizado, duplo cego, em um total de cem pacientes. Estes autores não observaram diferença entre os grupos com relação à estabilidade articular, presença de sinais inflamatórios, escala de dor, ou imagem de ressonância magnética nos pacientes com uso de PRP.

Um estudo biomecânico do tecido regenerado poderia acrescentar valiosas informações. Foram publicados estudos experimentais avaliando o efeito de fatores de crescimento isolados, e mais recentemente do PRP, na regeneração do ligamento da patela em ratos e coelhos. Esses estudos demonstraram aumento da resistência, rigidez e regeneração tecidual do ligamento com o uso dessas substâncias^{33,20}. Entretanto, este tipo de avaliação não foi possível de ser realizada em nosso meio, pela indisponibilidade de equipamentos adequados.

6.8 Análise histológica

O estudo histológico dos grupos não operado e operado apresentavam alterações consequentes a cirurgia sobre o tendão. Entre os grupos operados com e sem PRP, não houve diferença entre os grupos com relação a presença de áreas de fibrose, o desarranjo arquitetural das fibras colágenas e vasos neoformados pelo método de hematoxilina eosina.

Na variável medida transversal não existiu diferença entre os grupos operados e houve diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre o grupo controle e o grupo operado sem PRP, devido a sobreposição dos desvios

padrão, portanto estatisticamente, não houve a diferença. Como o trabalho envolveu um experimento, possivelmente com mais um ou dois experimentos iguais pudéssemos mostrar essa diferença biológica, de maneira estatística.

O estudo histológico utilizando a coloração HE foi realizado também em outros estudos que avaliaram a cicatrização tendínea em modelos experimentais, pelo método de qualificação da cicatrização^{88,89,90}, utilizando técnica e descrições compatíveis à utilizada neste estudo. Outros trabalhos que, utilizaram modelos experimentais de lesão do tendão de Aquiles com uso de PRP, como de Parafioriti et al⁹¹, demonstraram resultados semelhante a este, em seus grupos com 4 semanas após a cirurgia. No entanto Kaux et al⁹², avaliando diferenças entre os grupos com lesão tendínea, com PRP em ratos, quando analisou diferenças entre os grupos quando avaliado o tipo de colágeno, observou aumento do colágeno tipo I com 30 dias após cirurgia.

Na avaliação histológica das tendinopatias como do Aquiles, do manguito rotador, na origem do tendão extensor radial curto do carpo (epicondilite lateral) e do tendão patelar (*Jumpers Knee*), um achado frequente é o aumento da matriz extracelular^{93,94}. Observa-se, ainda, um desarranjo das fibras colágenas, aumento da vascularização e celularidade, mas sem qualquer célula de infiltrado inflamatório⁹⁵. Achados semelhantes ao que encontramos em nosso estudo animal, o que sugere ajuda a corroborar o potencial de estudo por meio da DCRM, nestes pacientes.

7.0 CONCLUSÃO

Na avaliação feita por meio de ressonância magnética e análise histológica, a utilização do PRP não influenciou na regeneração do tendão de Aquiles, decorridos 30 dias da intervenção cirúrgica.

8.0 PERSPECTIVAS

Estudos envolvendo marcadores específicos para a neovascularização e angiogênese, em fases do processo cicatrização, poderão ser desenvolvidos para elucidar questões quanto ao papel do PRP nas diferentes fases da cicatrização tecidual, assim como estudos funcionais também poderão ser úteis para melhor interpretação dos resultados histológicos e por imagem.

Este trabalho poderá abrir um campo de estudo para ajudar a compreender o processo de cicatrização após cirurgia e o uso do PRP no mesmo⁹⁶. Alguns estudos demonstram a correlação entre áreas de dor máxima e hipervascularidade máxima, em tendões, abrindo campo para métodos que avaliem a vascularização dos tecidos^{97,98, 99}.

A perfusão/DCRM é uma técnica com potencial de demonstrar alterações no tendão de Aquiles operados, com diferentes padrões de realce de contraste, em relação ao grupo controle e poderia ser usada em estudos científicos, especialmente, em ensaios clínicos, no controle dos diferentes tipos de tratamento, desde a ruptura à tendinose.

9. REFERÊNCIAS

-
- ¹ Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; Mar. 101(3) :e37–e44
- ² Gasling VLW, Acil Y, Springer IN, Hubert N, Wilffag J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; Jul; 108(1) :45–48
- ³ Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46
- ⁴ Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schonberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP et al Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extracorp Technol;* 2006 Jun;38(2):174-87.
- ⁵ Borzini P, Mazzucco L. Platelet gels and releasates. *Curr Opin Hematol* 2005 Nov;12(6):473-9.
- ⁶ Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Mar;58(3):297-300; discussion -1.
- ⁷ Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Nov;62(11):1403-7.
- ⁸ Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet- rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Jan;107(1):229-37; discussion 38-9.
- ⁹ Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Kluter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion.* 1999 Feb;39(2):144-8.
- ¹⁰ Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc.* 2003 Oct;35(10):1648-52.

-
- ¹¹ Carreon LY, Glassman SD, Anekstein Y, Puno RM. Platelet gel (AGF) fails to increase fusion rates in instrumented posterolateral fusions. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 May 1;30(9):E243-6.
- ¹² Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. An analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range of motion. *Int Orthop*. 2007 Jun;31(3):309-13.
- ¹³ Galasso O, Mariconda M, Romano G, Capuano N, Romano L, Ianno B, et al. Expandable intramedullary nailing and platelet rich plasma to treat long bone non-unions. *J Orthop Traumatol*. 2008 Sep;9(3):129-34.
- ¹⁴ Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*. 2003 Nov;33(5):381-94.
- ¹⁵ Borzini P, Mazzucco L. Platelet gels and releasates. *Curr Opin Hematol*. 2005 Nov;12(6):473-9.
- ¹⁶ Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009 Nov;37(11):2259-72.
- ¹⁷ Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med*. 2008 May;42(5):314-20.
- ¹⁸ Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Long-term explant culture of rabbit flexor tendon: effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and serum on matrix metabolism. *J Orthop Res*. 1991 Jul;9(4):503-15.
- ¹⁹ Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med*. 1999 May-Jun;27(3):363-9.
- ²⁰ Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand*. 2000 Oct;71(5):513-8.

-
- ²¹ Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand*. 2004 Feb;75(1):93-9.
- ²² Anaguchi Y, Yasuda K, Majima T, Tohyama H, Minami A, Hayashi K. The effect of transforming growth factor-beta on mechanical properties of the fibrous tissue regenerated in the patellar tendon after resecting the central portion. *Clin Biomech* (Bristol, Avon). 2005 Nov;20(9):959-65.
- ²³ Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2006 Nov;34(11):1774-8.
- ²⁴ Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007 Feb;35(2):245-51.
- ²⁵ Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Presti ML, Russo A, Bondi A, et al. Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury*. 2009 Jun;40(6):598-603.
- ²⁶ Filardo G, Kon E, Della Villa S, Vincentelli F, Fornasari PM, Marcacci M. Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee. *Int Orthop*. 2010 Aug;34(6):909-15.
- ²⁷ de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Jan 13;303(2):144- 9.
- ²⁸ Silva A, Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet- rich plasma accelerate tendon healing? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009 Jun;17(6):676-82.
- ²⁹ Nin JR, Gasque GM, Azcarate AV, Beola JD, Gonzalez MH. Has platelet-rich plasma any role in anterior cruciate ligament allograft healing? *Arthroscopy*. 2009 Nov;25(11):1206-13.
- ³⁰ Radice F, Yanez R, Gutierrez V, Rosales J, Pinedo M, Coda S. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligament grafts with and without autologous platelet-derived growth factors. *Arthroscopy*. 2010 Jan;26(1):50-7.

-
- ³¹ Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Prado R, Muruzabal F, Andia I. Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology. *Arthroscopy*. 2010 Apr;26(4):470-80.
- ³² Wright-Carpenter T, Klein P, Schaferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med*. 2004 Nov;25(8):588-93.
- ³³ Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, et al. The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009 Nov;129(11):1577-82.
- ³⁴ Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Jun;14(3):357-62.
- ³⁵ Karjalainen PT, Aronen HJ, Pihlajamaki HK, et al. Magnetic resonance imaging during healing of surgically repaired Achilles tendon ruptures. *Am J Sports Med* 1997 Mar;25(2):164–71.
- ³⁶ Lladó GP, Costa FC, Beiras AC, Dominguez JF, Romo AI, Borreguero LJ, Galvez CP, Fernandez RS. Guías de práctica clínica de la sociedad española de cardiología en resonancia magnética. *Rev Esp cardiol*. 2000 Apr; 53 (4) :542-559.
- ³⁷ Thanh NTK. Magnetic Nanoparticles. From Fabrication to Clinical Applications . 2012, pp. 584, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- ³⁸ Kim RJ, Chen EL, Lima JAC, et al. Myocardial Gd-DTPA kinetics determine MRI contrast enhancement and reflect the extent and severity of myocardial injury after acute reperfused infarction. *Circulation*, 1996 Dec 15;94(12):3318-26.
- ³⁹ Arai AE. Magnetic resonance first-pass myocardial perfusion imaging. *Top magn reson imaging* 2000 Dec;11(6):383-98.
- ⁴⁰ Guo J, Reddick WE, Glass JO, Ji Q, Billups CA, Wu J, Hoffer FA, Kaste SC, Jenkins JJ, Ortega Flores XC, Quintana J, Villarroel M, Daw NC. Dynamic

contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a prognostic factor in predicting event-free and overall survival in pediatric patients with osteosarcoma. *Cancer*. 2012 Aug 1;118(15):3776-85.

⁴¹ Cimmino MA, Barbieri F, Boesen M, Paparo F, Parodi M, Kubassova O, Scarpa R, Zampogna G. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of articular and extraarticular synovial structures of the hands in patients with psoriatic arthritis. *J Rheumatol Suppl*. 2012 Jul;89:44-8.

⁴² Asakawa DS, Blemker SS, Gold GE, Delp SL. Dynamic magnetic resonance imaging of muscle function after surgery. *Skeletal Radiol*. 2006 Dec;35(12):885-6.

⁴³ Shalabi A, Kristoffersen-Wiberg M, Papadogiannakis N, Aspelin P, Movin T. Dynamic contrast-enhanced mr imaging and histopathology in chronic achilles tendinosis. A longitudinal MR study of 15 patients. *Acta Radiol*. 2002 Mar;43(2):198-206.

⁴⁴ Verstraete KL, Vanzielegem B, De Deene Y, et al.: Static, dynamic and first-pass MR imaging of musculo- skeletal lesions using gadodiamide injection. *Acta Radiol*. 1995 Jan;36(1):27-36.

⁴⁵ Hartley KG, Damon BM, Patterson GT, Long JH, Holt GE. J MRI techniques: a review and update for the orthopaedic surgeon. *Am Acad Orthop Surg*. 2012 Dec;20(12):775-87.

⁴⁶ Stavrou M, Seraphim A, Al-Hadithy N, Mordecai SC. Treatment for Achilles tendon ruptures in athletes *J Orthop Surg*. 2013 Aug;21(2):232-5.

⁴⁷ Suchak AA, Bostick GP, Beaupre LA, Durand DC, Jomha NM. The influence of early weight-bearing compared with non-weight-bearing after surgical repair of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Sep;90(9):1876-83.

⁴⁸ Twaddle BC, Poon P. Early motion for Achilles tendon ruptures: is surgery important? A randomized, prospective study. *Am J Sports Med*. 2007 Dec;35(12):2033-8.

⁴⁹ Khan RJ, Fick D, Keogh A, Crawford J, Brammar T, Parker M. Treatment of acute Achilles tendon ruptures: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Oct;87(10):2202-10.

-
- ⁵⁰ Ferrero G, Fabbro E, Orlandi D, et al. Ultrasound-guided injection of platelet-rich plasma in chronic Achilles tendinopathy. *J Ultrasound*. 2012 Oct 8;15(4):260-6.
- ⁵¹ Volpi P, Quaglia A, Schoenhuber H, et al. Growth factors in the management of sport-induced tendinopathies: results after 24 months from treatment. A pilot study. *J Sports Med Phys Fitness*. 2010 Dec;50(4):494-500.
- ⁵² Monto RR. Platelet rich plasma treatment for chronic Achilles tendinosis. *Foot Ankle Int*. 2012;May;33(5):379-85.
- ⁵³ Gaweda K, Tarczynska M, Krzyzanowski W. Treatment of Achilles tendinopathy with platelet-rich plasma. *Int J Sports Med*. 2010 Aug;31(8):577-83.
- ⁵⁴ Finnoff JT, Fowler SP, Lai JK, et al. Treatment of chronic tendinopathy with ultrasound-guided needle tenotomy and platelet-rich plasma injection. *PMR*. 2011 Oct;3(10):900-11.
- ⁵⁵ Hernández-Martínez JC, Vásquez CR, Ceja CB, Fuentes CC, Sesma JF, Benítez AG. Comparative study on animal model of acute Achilles tendon rupture with surgical treatment using platelet-rich plasma. *Acta Ortop Mex*. 2012 May-Jun;26(3):170-3.
- ⁵⁶ Sadoghi P, Rosso C, Valderrabano V, Leithner A, Vavken P. The role of platelets in the treatment of Achilles tendon injuries. *J Orthop Res*. 2013 Jan;31(1):111-8. Review. Erratum in: *J Orthop Res*. 2013 Aug;31(8):1332.
- ⁵⁷ http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias.html.
- ⁵⁸ http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf
- ⁵⁹ D'Agostino, R.B. "Tests for Normal Distribution" in *Goodness-Of-Fit Techniques 1986* edited by RB D'Agostino and MA Stepenes, MacelDecker,
- ⁶⁰ Chapter 18 of J Zar, *Biostatistical Analysis*, 1984 2nd edition, Prentice-Hall.
- ⁶¹ Beason DP, Kuntz AF, Hsu JE, Miller KS, Soslowsky LJ. Development and evaluation of multiple tendon injury models in the mouse. *J Biomech*. 2012 May 11;45(8):1550-3.
- ⁶² Yasuda T, Kinoshita M, Abe M, Shibayama Y. Unfavorable effect of knee immobilization on Achilles tendon healing in rabbits. *Acta Ortho Scand* 2000.71:69–73.

-
- ⁶³ Thermann H, Frerichs O, Biewener A, Krettek C. Healing of the Achilles tendon: an experimental study. *Foot Ankle Int.* 2001 Jun;22(6):478-83
- ⁶⁴ Jassem M, Rose AT, Meister K, Indelicato PA, Wheeler D. Biomechanical analysis of the effect of varying suture pitch in tendon graft fixation. *Am J Sports Med.* 2001 Nov-Dec;29(6):734-7.
- ⁶⁵ Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37(11):2259-72.
- ⁶⁶ Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001 Jun;10(4):225-8.
- ⁶⁷ Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA, What Is Platelet-Rich Plasma? *Oper Tech Sports Med.* 2011 Sept 19(3):142-148.
- ⁶⁸ Marx RE: Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001 Sept 10 (4):225-228.
- ⁶⁹ Russell RP, Apostolakos J, Hirose T, Cote MP, Mazzocca AD. Variability of Platelet-rich Plasma Preparations. *Sports Med Arthrosc.* 2013 Dec;21(4):186-90.
- ⁷⁰ Jahnke AH Jr, Messenger MT, Patterson JD. 1999. Common ankle injuries. In: Lillegard WA, Butcher JD, Rucker KS, editors. *Handbook of sports medicine: a symptom-oriented approach*, 2nd ed. Woburn (MA): Butterworth–Heinemann. p 1000–2000.
- ⁷¹ Schepsis AA, Jones H, Haas AL. Achilles tendon disorders in athletes. *Am J Sports Med.* 2002 Mar-Apr;30(2):287-305.
- ⁷² Karjalainen PT, Soila K, Aronen HJ, et al. MR imaging of overuse injuries of the Achilles tendon. *AJR Am J Roentgenol* 2000 Jul;175(1):251-60.
- ⁷³ Soila K, Karjalainen P, Aronen HJ, et al. High-resolution MR imaging of the asymptomatic Achilles tendon: new observations. *AJR Am J Roentgenol* 1999 Aug;173(2):323-8.
- ⁷⁴ Haims AH, Schweitzer ME, Patel RS, et al. MR imaging of the Achilles tendon: overlap of findings in symptomatic and asymptomatic individuals. *Skeletal Radiol* 2000 Nov;29(11):640-5.
- ⁷⁵ Blaiser RD, White R. Duration of immobilization after percutaneous sliding

heel–cord lengthening. *J Ped Orthop*. 1998 May-Jun;18(3):299-303.

⁷⁶ Seo Y, Ikoma K, Takamiya H, Kusaka Y, Tsoref L, Eliav U, Shinar H, Navon G. 1 H double-quantum-filtered MR imaging as a new tool for assessment of healing of the ruptured Achilles tendon. *Magn Reson Med*. 1999 Nov;42(5):884-9.

⁷⁷ Trudel G, Doherty GP, Koike Y, Ramachandran N, Lecompte M, Dinh L, Uthoff HK. Restoration of strength despite low stress and abnormal imaging after Achilles injury. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Nov;41(11):2009-16.

⁷⁸ Silva A, Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: Does the platelet- rich plasma accelerate tendon healing? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009 Jun;17(6):676-82.

⁷⁹ Vogrin M, Ruprecht M, Crnjac A, et al: The effect of platelet-derived growth factors on knee stability after anterior cruciate ligament reconstruction: A prospective randomized clinical study. *Wien Klin Wochenschr* 2010 May;122 Suppl 2:91-5.

⁸⁰ Andersson T, Eliasson P, Hammerman M, Sandberg O, Aspenberg P. Low-level mechanical stimulation is sufficient to improve tendon healing in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Nov;113(9):1398-402.

⁸¹ Schepull T, Kvist J, Aspenberg P. Early E-modulus of healing Achilles tendons correlates with late function: similar results with or without surgery. *Scand J Med Sci Sports*. 2012 Feb;22(1):18-23.

⁸² Kvist M, Jozsa L, Jarvinen M. Vascular changes in the ruptured Achilles tendon and paratenon. *Int Orthop* 1992;16(4):377-82.

⁸³ Sueyoshi E, Sakamoto I, Uetani M. Myocardial delayed contrast-enhanced MRI: relationships between various enhancing patterns and myocardial diseases. *Br J Radiol*. 2009 Aug;82(980):691-7.

⁸⁴ Boné B, Wiberg MK, Parrado C, Falkmer U, Aspelin P, Gad A. Mechanism of contrast enhancement in breast lesions at MR imaging. *Acta Radiol*. 1998 Sep;39(5):494-500.

⁸⁵ Barber FA. Editorial. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2013 Dec 21, (4).

-
- ⁸⁶ Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Apr; Issue 4.
- ⁸⁷ Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med.* 2011 Jan;39(1):38-47.
- ⁸⁸ Saygi B, Yildirim Y, Çabuko C, et al. The effect of dehydration and irrigation on the healing of Achilles tendon: an experimental study *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery.* 2008 Apr;14(2):103-9.
- ⁸⁹ Petrou CG, Karachalios TS, Khaldi L, Karantanas AH, Lyritis GP. Calcitonin effect on Achilles tendon healing. An experimental study on rabbits. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009 Jul-Sep;9(3):147-54.
- ⁹⁰ Virchenko O, Fahlgren A, Rundgren M, Aspenberg P. Early Achilles tendon healing in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008 Sep;128(9):1001-6.
- ⁹¹ Parafioriti A, Armiraglio E, Del Bianco S, Tibalt E, Oliva F, Berardi AC. Single injection of platelet-rich plasma in a rat Achilles tendon tear model. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2011 Dec 29;1(2):41-7.
- ⁹² Kaux JF, Drion PV, Colige A, Pascon F, Libertiaux V, Hoffmann A, Janssen L, Heyers A, Nusgens BV, Le Goff C, Gothot A, Cescotto S, Defraigne JO, Rickert M, Crielaard JM. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of Achilles tendons of rats. *Wound Repair Regen.* 2012 Sep-Oct;20(5):748-56.
- ⁹³ Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C. *Acta Orthop Scand.* Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients. 1997 Apr;68(2):170-5.
- ⁹⁴ Schweitzer ME, Karasick D. MR imaging of disorders of the Achilles tendon. *AJR Am J Roentgenol.* 2000 Sep;175(3):613-25.
- ⁹⁵ Kaeding C, Best TM. Tendinosis: pathophysiology and nonoperative treatment. *Sports Health.* 2009 Jul;1(4):284-92.
- ⁹⁶ Danielson P, Alfredson H, Forsgren S. Studies on the importance of sympathetic innervation, adrenergic receptors, and a possible local catecholamine production in the development of patellar tendinopathy (tendinosis) in man. *Microsc Res Tech.* 2007 Apr;70 (4):310-24.

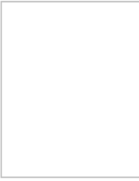
⁹⁷ Hoksrud A, Ohberg L, Alfredson H, et al. Color Doppler ultrasound findings in patellar tendinopathy (jumper's knee). *Am J Sports Med.* 2008 Sep;36(9):1813-20.

⁹⁸ Hoksrud A, Ohberg L, Alfredson H, et al. Ultrasound-guided sclerosis of neovessels in painful chronic patellar tendinopathy: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med.* 2006 Nov;34(11):1738-46.

⁹⁹ Khan KM, Bonar F, Desmond PM, et al: Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. Patellar tendinosis (jumper's knee): findings at histopathologic examination, US, and MR imaging. *Radiology.* 1996 Sep;200(3):821-7.

10. ANEXOS

10.1 PARECER DO CEUA

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 183 / 2012, relativo ao projeto intitulado "O USO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO TRATAMENTO DE LESÃO TENDINEA EM COELHOS", que tem como responsável VIVIAN RESENDE, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 03/07/2012. Este certificado espira-se em 03/07/2017.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 183 / 2012, related to the Project entitled "THE USE OF PLATELET RICH PLASMA (PRP) FOR TREATMENT OF TENDINEOUS LESION BY IN RABBITS", under the supervision of VIVIAN RESENDE, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/07/2012. This certificates expires in 03/07/2017.</p>	
<p>Renata Adriana Labanca de Almeida Santos Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 03/07/2012.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

10.2 Tabela 4.

Tabela 4. Valores de neutrófilo, linfócito, monócito, eosinófilo e basófilo no PRP.

Animais grupo PRP	Neutrófilo (x 10 ³ / ml)	Linfócito (x 10 ³ / ml)	Monócito (x 10 ³ / ml)	Eosinófilo (x 10 ³ / ml)	Basófilo (x 10 ³ / ml)
1	0,114	0,932	0,123	0,003	0,040
2	0,067	0,324	0,11	0,001	0,005
3	0,050	0,115	0,09	0,005	0,030
4	0,003	0,302	0,016	0,001	0,004
5	0,061	0,318	0,062	0,002	0,034
6	0,019	1	0,031	0,001	0,033
7	0,560	0,15	0,337	0,002	0,094
8	0,002	1,24	0,162	0,000	0,045
9	0,114	0,932	0,123	0,003	0,040
Média	0,11	0,59	0,12	0,002	0,04



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA REGENERAÇÃO DO
TENDÃO DE AQUILES EM COELHOS - AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA E HISTOPATOLOGIA.**

WILSON CAMPOS TAVARES JUNIOR

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores

Aprovada em 29 de abril de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Vivian Resende - Orientador
UFMG


Prof(a). Ubiratã Brum de Castro - Coorientador
UFMG


Prof(a). Adriana Maria Kakehasi
UFMG


Prof(a). Reginaldo Figueiredo
UFMG

Belo Horizonte, 09 de maio de 2014.



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO WILSON CAMPOS TAVARES JUNIOR

Realizou-se, no dia 09 de maio de 2014, às 14:00 horas, FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA REGENERAÇÃO DO TENDÃO DE AQUILES EM COELHOS - AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E HISTOPATOLOGIA*, apresentada por WILSON CAMPOS TAVARES JUNIOR, número de registro 2012655577, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Vivian Resende - Orientador (UFMG), Prof(a). Ubiratan Brum de Castro - Coorientador (UFMG), Prof(a). Adriana Maria Kakehasi (UFMG), Prof(a). Reginaldo Figueiredo (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 09 de maio de 2014.

Prof(a). Vivian Resende (Doutora)

Prof(a). Ubiratan Brum de Castro (Doutor)

Prof(a). Adriana Maria Kakehasi (Doutor)

Prof(a). Reginaldo Figueiredo (Doutor)