

Eventos anátomo patológicos na reparação da lesão aguda em tendões de aquiles de ratas, utilizando plasma rico em plaquetas

Anatomic pathological events in reparation of acute achilles tendons lesions in rats treated with platelet-rich plasma

Francisco A. Cejas Rodriguez¹, Carlos Mauricio Figueredo², Claudia E. Sotomayor³, Hugo A. Cejas⁴

Descritores:

Tendão do calcâneo/patologia; Traumatismos dos tendões; Plasma rico em plaquetas; Ratos Wistar

Keywords:

Achilles tendon/pathology; Tendons injuries; Platelet-rich plasma; Rats, Wistar

¹ Ortopedia e Traumatologia, Torres, RS, Brasil.

² Departamento de Bioquímica Clínica, Faculdade de Ciências Químicas, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina.

³ Centro de Investigaciones em Bioquímica Clínica e Imunología, Faculdade de Ciências Químicas, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina.

⁴ Departamento de Patologia, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina.

Autor correspondente:

Francisco A. Cejas Rodriguez
Rua Carlos Barbosa 49 – Predial
CEP: 95560-000 – Torres, RS, Brasil.
Tels.: (51) 9899-2772 / 3664-2329
E-mail: facejas@hotmail.com

Conflito de interesse:
não

Recebido em:
09/06/2015

Aceito em:
07/07/2015

RESUMO

Objetivo: Comparamos, sob visão anatômica e histopatológica, os eventos na cicatrização de tendões de Aquiles agudamente lesionados em 2 grupos de ratas. Um deles tratado com PRP e o outro não. **Métodos:** Para isso utilizamos 18 ratas Wistar, onde 5 foram sacrificadas para a obtenção de PRP, 7 sofreram secções cirúrgicas de seus tendões de Aquiles e foram tratadas com PRP e 6 sofreram as mesmas secções cirúrgicas, porém não receberam PRP. E observamos o aspecto das feridas operatórias e histopatológicos dos tendões de Aquiles, em representantes de ambos os grupos, em 4 períodos de tempo diferentes. **Resultados:** Obtivemos uma melhor resposta inflamatória/reparadora nos grupos tratados com PRP. **Conclusão:** Concluímos que sua utilização implica numa mais rápida e melhor cicatrização aguda do tendão de Aquiles. E que este trabalho pode servir como estímulo para estudos em humanos.

ABSTRACT

Objective: The authors compare in anatomical and histopathological vision, the events in the healing of acutely injured Achilles tendons in two groups of rats. With and without the use of PRP respectively. **Methods:** We use 18 Wistar rats, where 5 were sacrificed to obtain PRP, 7 underwent surgical sections of his Achilles tendons and where treated with PRP and 6 underwent the same surgical section, however not received the PRP. And we study the appearance of the surgical wound, and the Achille's histopathology of representatives from both groups, in four different postoperative periods of time. **Results:** A better inflammatory response/repair in the groups treated with PRP was observed. **Conclusions:** The utilization of PRP means for faster and better healing of acute Achilles tendons. And this may serve as a stimulus for further studies in humans.

INTRODUÇÃO

Existem três fases de cicatrização e cura do tendão lesado. A inflamatória, a proliferativa e finalmente, a fase de remodelação.⁽¹⁾

A cura e remodelação das feridas com plaquetas ativadas têm sido amplamente difundidas.⁽²⁻⁵⁾

As plaquetas possuem mediadores químicos nos seus citoplasmas que normalmente são ativados por moléculas do soro já na primeira fase, e que desempenham um importante papel na cura das feridas. Regulando o metabolismo, mitogênese, quimiotaxia e diferenciação celular.⁽⁶⁾

Estas moléculas são conhecidas como fatores de crescimento: TGF beta, fator de crescimento de transformação beta. FGF, fator de crescimento fibroblástico. IGF, fator de crescimento igual à insulina. VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. EGF, fator

de crescimento epidérmico. PDGF, fator de crescimento derivado das plaquetas.

Precisamente, em centro de investigação de referência e utilizando fatores de crescimento derivados das plaquetas, (PDGF ativados), projetamos este trabalho experimental em ratas. Nas quais provocamos uma ruptura cirúrgica nos seus tendões de Aquiles e assim avaliamos a cicatrização de forma clínico-cirúrgica e histopatológica, nas mesmas e seus grupos controles.

MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia, Departamento de Bioquímica Clínica, Cibici (Centro de Investigación em Bioquímica Clínica e Imunologia), da Universidade Nacional de Córdoba, Argentina e no biotério deste Departamento foram praticados os atos cirúrgicos nas ratas.

Utilizaram-se 18 ratas Wistar fêmeas de 2,5 a 3 meses de vida, mantidas no biotério de acordo com as normas internacionais. E o plasma rico em plaquetas extraído a partir do sangue das mesmas.

O trabalho consta de três fases:

1. Preparação do plasma rico em plaquetas a partir de umas das ratas.
2. Secção cirúrgica do tendão de Aquiles da pata posterior esquerda, aplicação de PRP e fechamento da ferida. Obviamente no grupo controle não colocamos PRP.
3. Avaliação anatomopatológica de ambos os grupos.

Preparação do plasma rico em plaquetas

- A. Numa rata previamente anestesiada, puncionamos seu coração para extrair com seringa e agulha, 5 cc. de sangue. Nesta sangue acrescentamos 0,5 cc. de citrato de sódio ao 3,8% (anticoagulante), num tubo de ensaios Falcon estéril.
- B. Centrifugamos isto a 1.200rpm por 10 minutos.
- C. O material centrifugado mostrou 3 capas: uma superficial do soro, uma intermediaria pequena e branca e uma vermelha de eritrócitos. Tubo A: Da primeira capa superficial do soro: tomamos 1 cc; (deixamos o resto para o seguinte passo); e colocamos num tubo Falcon que chamamos de tubo A. Neste tubo adicionamos 0,3 cc de gluconato de Ca ao 10% e o levamos a banho com agua fervente por 15 minutos. Resultado: obtemos um Ativador de Plaquetas de aspecto gelatinoso.

D. Tubo B: Com uma pipeta retiramos o sedimento intermediário e a este agregamos mais 1 cc da camada superficial do soro, colocamos tudo isto num outro tubo Falcon, (tubo B). Centrifugamos a 2.000rpm por 10 minutos. Resultado: pequeno sedimento rico em plaquetas.

- Das 18 ratas, 5 foram utilizadas para a extração do soro ativador plaquetário e as plaquetas.
- Aos 3 dias da cirurgia, foram sacrificadas: 1 rata controle e 1 rata tratada.
- Aos 7 dias da cirurgia, mais 2 controle e 2 tratadas.
- Aos 10 dias: 2 controles e 3 tratadas.
- Finalmente aos 15 dias: 1 controle e 1 tratada. Nas 7 ratas tratadas procedemos a dissecar cirurgicamente seus tendões de Aquiles, e seccioná-los com o bisturi. Logo disto colocamos o conteúdo do tubo B (plaquetas), e acrescentamos o conteúdo do tubo A, (Ativador das plaquetas). Fechamos com Mononylon e finalmente sacrificamos as mesmas aos 3, 7, 10 e 15 dias do procedimento mencionado.

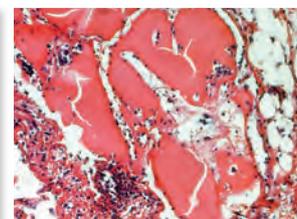
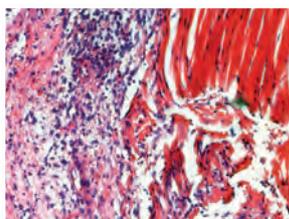
RESULTADOS

Aos 3 dias

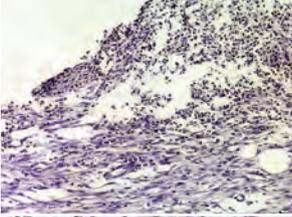
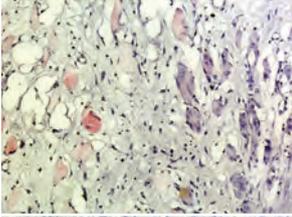
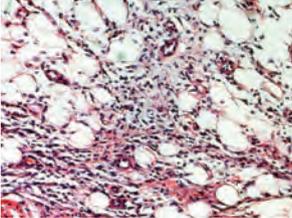
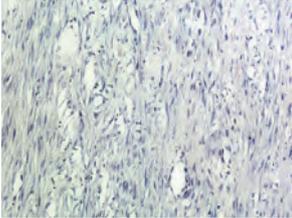
Rata controle	Rata tratada com PRP
Quase não caminha.	Idem a controle.
Macroscopia	Macroscopia
Não há continuidade do tendão. O edema é importante.	Os achados são similares aos da rata controle. Idem a foto ao lado.



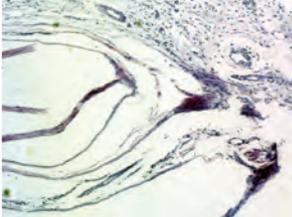
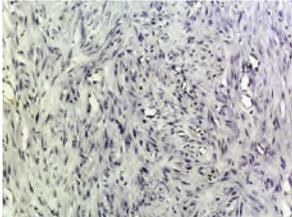
Microscopia	Microscopia
Intenso infiltrado inflamatório com predomínio leucocitário neutrófilo.	Vemos material proteináceo, correspondente ao plasma injetado em áreas específicas. Menor intensidade de infiltrado inflamatório e edema.



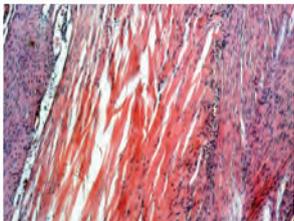
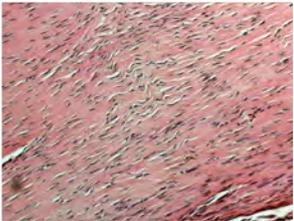
Aos 7 dias

Ratas controle	Ratas tratadas com PRP
Caminham com dificuldades	Idem às ratas controles
Macroscopia	Macroscopia
Nas feridas operatórias observamos áreas de deiscência ulceradas, a maior de 2mm. Os tendões apresenta nódulo cinza claro aderido à pele. Menor a 1mm.	As feridas operatórias estão fechadas, somente um pequeno ponto menor de 1mm está deiscente. Os tendões estão inteiros, contínuos, engrossados no setor correspondente a lesão e cicatrizados totalmente.
	
Microscopia	Microscopia
A epiderme junto a lesão encontra-se engrossada com hiperqueratose, acantose e papilomatose. Na derme há granulomas de corpo estranho, (ao fio de sutura), com células gigantes tipo corpo estranho, macrófagos, linfócitos e leucócitos neutrófilos. Além disto, na derme profunda há proliferação fibroblástica irregular e vasos sanguíneos de neoformação sem orientação definida.	Importante proliferação fibroblástica. Os fibroblastos estão orientados seguindo as linhas de força. Numa área há fibras musculares presas pela fibrose. Outro setor mostra fibras nervosas com engrossamento perineural. O infiltrado inflamatório é notoriamente pequeno, com alguns linfócitos, leucócitos e macrófagos.
	
	

Aos 10 dias

Ratas controle	Ratas tratadas com PRP
Caminha com muito pouca dificuldade.	Caminham sem dificuldades.
Macroscopia	Macroscopia
A cicatrização da pele ainda não é completa. Os tendões encontra-se cicatrizados, porém todo aderido à pele, assim como engrossados.	As feridas operatórias estão cicatrizadas, a pele não se apresenta aderida e há uma melhor continuidade de fibras sem engrossamentos no tendão.
	
Microscopia	Microscopia
Proliferação fibroblástica irregular, abundantes vasos sanguíneos de neoformação e aprapamento de fibras musculares necróticas e fragmentadas. O infiltrado inflamatório continua importante. As fibras nervosas apresentam fenômenos degenerativos com importante engrossamento nervoso perineural.	Confirma-se a continuidade das fibras músculo-tendíneas. A proliferação fibroblástica segue as linhas de força com muito pouco envolvimento das fibras musculares estriadas. Algumas fibras nervosas possuem escasso engrossamento perineural. O infiltrado inflamatório linfocitário é mínimo.
	

Aos 15 dias

Rata controle	Rata tratada com PRP
Caminha sem dificuldades.	Idem as ratas controles.
Macroscopia	Macroscopia
Ao abrir a pele vemos um tendão mais engrossado e aderido aos planos vizinhos. Já cicatrizado. Pata da esquerda na fotografia.	Tendão contínuo com aparente grau de normalidade. Pata da direita da fotografia.
	
Microscopia	Microscopia
Encontra-se um infiltrado inflamatório predominantemente leucocitário e algumas áreas o infiltrado é linfoide. No setor de corte há colágeno denso e fibroblastos com distribuição irregular.	A proliferação fibroblástica é ordenada, seguindo as linhas de força e o infiltrado inflamatório é ainda muito menor do que no dia 10.
	

DISCUSSÃO

Como sabido, quando um tecido é danificado, sucedem-se uma série de eventos que dão lugar à reparação e/ou regeneração tissular. Do que vamos abordar, infere-se uma cadeia de eventos no tecido mesenquimal que promovem a cicatrização e regeneração dos tendões lesionados cirurgicamente, simulando uma rotura traumática. Para isto, primeiro levamos em conta que frente à lesão podem ocorrer três acontecimentos básicos (Figura 1).

Neste estudo avaliamos basicamente a reparação e/ou cicatrização de uma lesão cirurgicamente provocada no tendão de Aquiles, simulando uma ruptura aguda do mesmo. Também devemos precisar que o acionar das plaquetas ativadas não são avaliadas neste trabalho, e nenhuma ação de regeneração. Somente são avaliados os acontecimentos de reparação do tecido com dano agudo experimental.

O tecido mesenquimal possui um baixo nível de replicação, porém frente a estímulos pode rapidamente proliferar e reparar/regenerar o tecido lesionado. Este ciclo celular têm um mecanismo de regulação de replicação onde intervém muitas moléculas, (os fatores de crescimento), em diferentes vias inter-relacionadas. Os fatores de crescimento conhecidos são: TGF beta, (Fator de transformação beta). FGF, (fator de crescimento fibroblástico). IGF, (Fator de crescimento igual à insulina). VEGF, (fator de crescimento endotelial vascular) e PDGF, (Fator de crescimento de origem plaquetário).

Em base a estes mecanismos, é sabido que as plaquetas liberam fatores de crescimento; (PDGF); estes são uma família de proteínas ligadas entre si, contidas em grânulos e liberadas quando ativadas. Atuam de forma parácrina assim como estimulam os fibroblastos.



Figura 1. Eventos na reparação/regeneração celular

De acordo com estes conhecimentos, temos realizado a separação, estimulação e utilização dos fatores plaquetários. E observado a sequência de eventos na reparação dos tendões de Aquiles em ratas tratadas com estes e outras ratas sem nenhum tratamento, para servir de grupo controle.

As fases de reparação das ratas não tratadas, demonstraram que a formação do coágulo, o edema, a formação de tecido de granulação, a proliferação de fibroblastos e do colágeno resultam mais irregulares e abundantes do que nas ratas tratadas.

Nas ratas tratadas observamos que a cicatrização é ordenada e os fibroblastos seguem melhor as linhas de força. Cabe destacar o francamente mais rápidos que são estes eventos nelas, como demonstrado nas microfotografias no tempo de observação clínica utilizado.

Os animais tratados recuperaram sua marcha normal e a continuidade do tendão, organizados por fibroblastos bem ordenados, pouco colágeno e sem infiltrado inflamatório. Confirmamos isto neste experimento, e da maneira mais ilustrativa possível vemos que há coincidências com as observações científicas e clínicas do tema, onde já há um consenso das boas evoluções clínicas nas reparações agudas.⁽⁷⁻¹¹⁾

Restam obviamente mais estudos nos mecanismos da regeneração dos estádios crônicos, por lesão ou degeneração, pois nestes casos os resultados são diferentes.⁽¹²⁾ Assim como seu uso com outros materiais e a relação com os outros fatores de crescimento.^(10,13,14) Por último, o procedimento bioquímico utilizado para a obtenção do plasma rico em plaquetas é adequado e tem sido profusamente reportado na bibliografia.

Segundo publicação de 2010 do Comitê Olímpico Internacional: “mais evidências são necessárias antes de formular recomendações para a administração de PRP em lesões de tendões nos humanos”. Sendo assim, os autores concluíram que, com este trabalho, podemos encorajar a realização de estudos similares. Assim como sua utilização e avaliação em seres humanos.⁽¹⁵⁾

CONCLUSÕES

O estudo em tendões de Aquiles de ratas tratadas com plasma rico em plaquetas ativadas, em comparação com grupo controle, demonstrou uma melhor reação inflamatória/reparadora destas.

Macroscópica e clinicamente, peças e ratas tratadas tiveram melhor aspecto das feridas operatórias com menor volume e aderência cicatricial do tendão. O com-

portamento dos animais tratados evidenciou maior rapidez no retorno as funções do membro.

Microscopicamente, as ratas tratadas demonstraram uma cicatrização mais ordenada, com fibroblastos seguindo as linhas de força, menor presença de colágeno e sem infiltrados inflamatórios.

Esta equipe multidisciplinar de profissionais atuantes no Brasil e Argentina, nas áreas de Ortopedia/Cirurgia do pé e tornozelo, Bioquímica e Patologia; confirmam mediante este estudo experimental em ratas, a eficiência clínica e anatomopatológica do uso de plasma rico em plaquetas ativadas. Nas lesões agudas dos tendões de Aquiles.

REFERÊNCIAS

1. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(1):187-202. Review.
2. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(8):987-96. Review.
3. Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005;23(2):281-6.
4. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.* 2004;75(1):93-9.
5. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, Nagae M, Arai Y, Kawata M, Kubo T. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol.* 2008;215(3):837-45.
6. Geaney L, Arciero R, DeBerardino T, Mazzocca A: The Effects of platelet – rich plasma on tendon and ligament: Basic science and clinical application. *Oper Tech Sport Med.* 2011; 19:160-4.
7. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 200;35(2):245-51.
8. Maestro Fernandez A, Martínez Renobales J, Sánchez Zaparain I, Rodríguez Lopez L: Cirugía abierta y plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en roturas agudas del tendón de Aquiles. *Patol Aparato Locomotor.* 2007; 5 (Supl I):79-82.
9. Fernández-Sarmiento JA, Domínguez JM, Granados MM, Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, Gómez-Villamandos RJ, Muñoz-Rascón P, Martín de Las Mulas J, Millán Y, García-Ballebó M, Cugat R. Histological study of the influence of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of divided Achilles tendons in sheep. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(3):246-55.
10. Kim HJ, Nam HW, Hur CY, Park M, Yang HS, Kim BS, Park JH. The effect of platelet rich plasma from bone marrow aspirate with added bone morphogenetic protein-2 on the Achilles tendon-bone junction in rabbits. *Clin Orthop Surg.* 2011;3(4):325-31.
11. Gaweda K, Tarczynska M, Krzyzanowski W. Treatment of Achilles tendinopathy with platelet-rich plasma. *Int J Sports Med.* 2010; 31(8):577-83.

12. de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, Tol JL. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;303(2):144-9.
13. Sarrafian TL, Wang H, Hackett ES, Yao JQ, Shih MS, Ramsay HL, Turner AS. Comparison of Achilles tendon repair techniques in a sheep model using a cross-linked acellular porcine dermal patch and platelet-rich plasma fibrin matrix for augmentation. *J Foot Ankle Surg*. 2010;49(2):128-34.
14. Lyras DN, Kazakos K, Tryfonidis M, Agrogiannis G, Botaitis S, Kokka A, Drosos G, Tilkeridis K, Verettas D. Temporal and spatial expression of TGF-beta1 in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma. *Foot Ankle Surg*. 2010;16(3):137-41.
15. Engebretsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, Everts P, Hamilton B, Huard J, Jenouire P, Kelberine F, Kon E, Maffulli N, Matheson G, Mei-Dan O, Menetrey J, Philippon M, Randelli P, Schamasch P, Schweltnus M, Vernec A, Verrall G. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med*. 2010;44(15):1072-81.