

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MARCELO EMÍLIO BEIRÃO**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS E PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL-1 $\beta$   
ATENUAM O PROCESSO INFLAMATÓRIO DE LESÃO MUSCULAR  
EM RATOS WISTAR**

**CRICIÚMA  
Dezembro 2022**

**MARCELO EMÍLIO BEIRÃO**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS E PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL-1 $\beta$   
ATENUAM O PROCESSO INFLAMATÓRIO DE LESÃO MUSCULAR  
EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

**CRICIÚMA**

**Dezembro 2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B422p Beirão, Marcelo Emílio.

Plasma rico em plaquetas e peptídeo inibidor de IL-1 $\beta$  atenuam o processo inflamatório de lesão muscular em ratos Wistar / Marcelo Emílio Beirão. - 2022.

70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.  
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Músculos - Ferimentos e lesões. 2. Plasma rico em plaquetas. 3. Interleucina-1beta. 4. Inflamação. 5. Peptídeos. I. Título.

CDD 23. ed. 616.74

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT, sendo apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 405

Com início às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 10 (dez) de fevereiro de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 226/Bloco S o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **MARCELO EMÍLIO BEIRÃO**, sob a orientação do **Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**, intitulada “**PLASMA RICO EM PLAQUETAS E PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL1- $\beta$  ATENUAM O PROCESSO INFLAMATÓRIO DE LESÃO MUSCULAR EM RATOS WISTAR**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Prof. Dr. Alessandro Haupenthal (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesesseis) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 10 (dez) de fevereiro de 2023 (dois mil e vinte e três).

**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
Coordenador do PPGCS

**Samiris Albano Pereira**  
Assistente Administrativo

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família que me estimulou ao retorno como aluno à universidade, depois de muitos anos na docência. Aos meus colegas de laboratório, serei sempre grato pelo grande auxílio prestado e sem eles os experimentos e a pesquisa ficariam muito comprometidos. Destaco entre eles Mateus Cardoso Colares que, sempre solícito, com muita paciência e sabedoria, foi um verdadeiro mestre na troca de ideias e no direcionamento da pesquisa.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira, meu ex- aluno na sua formação no curso de Fisioterapia da Unesc e hoje com muita honra meu professor, que com seu vasto conhecimento científico aceitou o encargo de me orientar. A todos vocês, minha sincera gratidão.

*Se tens um filho regozija-te! Mas, consciente da graça que o Grande Arquiteto do Universo te deu. Faze com que, até os dez anos, ele te obedeça; até os vinte, te ame; e até a morte, te respeite. Até os dez anos, sê o seu mestre; até os vinte, sê o seu pai; e até a morte, sê o seu amigo. Pensa sempre em dar-lhe bons princípios e ensina-lhes boas maneiras; inculca nele a retidão e a honestidade sem máculas.*

## RESUMO

As lesões musculares estão entre as mais frequentes na prática esportiva, sendo uma das principais causas de afastamento de atletas em suas modalidades. A resposta inflamatória e as espécies reativas de oxigênio produzidas no processo de reparação tecidual, caso não controladas em sua fase inicial, podem produzir um quadro crônico com perda da característica histológica normal. O plasma rico em plaquetas (PRP) obtido do sangue autólogo é considerado um recurso útil no processo de reparação tecidual por conter uma concentração de plasma com grande quantidade de plaquetas e fatores de crescimento quando comparado com o sangue total. A interleucina (IL) 1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória e a inibição da sua atividade pode ser adequada para que haja um acelerado reparo da lesão. Bloqueadores da ação desta citocina já existem no mercado, mas seu alto custo limita o acesso e uso clínico. Em função disso, a presente pesquisa se propôs a utilizar um peptídeo inibidor baseado na molécula do receptor antagonista IL-1(IL-1RA) com capacidade de atenuar as respostas desencadeadas pela IL-1 $\beta$ , através do bloqueio do receptor funcional, na fase inflamatória da reparação tecidual. Persiste na literatura dúvidas em relação à concentração leucocitária no preparo do PRP e quais situações estariam indicadas. Assim, um dos objetivos deste trabalho é avaliar a ação do PRP rico em leucócitos (PRP-RL), do PRP pobre em leucócitos (PRP-PL), isolados ou associados a um peptídeo antagonista dos domínios 1 e 2 do receptor 1 de IL-1 $\beta$  (PAD1-2) e também o uso isolado deste no controle do processo inflamatório inicial pós-lesão muscular traumática induzida em animais. Primeiramente, sob anestesia, 6 ratos machos Wistar foram submetidos à punção cardíaca para retirada de 7 mL de sangue para obtenção do PRP-RL e PRP-PL. Após, foram utilizados mais 84 ratos machos Wistar divididos em sete grupos de doze animais: Sham; Lesão Muscular (LM); LM + PRP-RL; LM + PRP-PL; LM + PAD1-2; LM + PRP-RL+ PAD1-2; LM + PRP-PL + PAD1-2. Foi induzido sob anestesia, um trauma muscular contusional nos animais e no quinto dia feita eutanásia por decapitação em guilhotina e dissecação do gastrocnêmio. Parâmetros histológicos avaliaram infiltrados de células inflamatórias e por RT-qPCR foi avaliada a expressão gênica do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF-kB) e IL-1 $\beta$ . Por ELISA foram avaliados os níveis proteicos de citocinas pró e anti-inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa - TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10 e fator de transformação de crescimento beta - TGF- $\beta$ ) e avaliada por espectrofotômetro a produção de oxidantes, defesa antioxidante e danos oxidativos (NO, DCF, SOD, GSH, Carbonil e Sulfidril). Em todos os parâmetros avaliados foram obtidos redução dos marcadores inflamatórios e oxidantes com manutenção do equilíbrio oxiredutor, de forma mais evidente nos grupos tratados com PRP-PL + PAD1-2 que permite afirmar que houve regulação do processo inflamatório inicial que auxilia na transição mais efetiva para a fase regenerativa do reparo tecidual.

**Palavras-chave:** lesão muscular; plasma rico em plaquetas; inflamação; interleucina; peptídeo.



## ABSTRACT

Muscle injuries are among the most frequent in sports practice, being one of the main causes of removal of athletes in their modalities. The inflammatory response and reactive oxygen species produced in the tissue repair process, if not controlled in its initial phase, may produce a chronic condition with loss of normal histological characteristic. Platelet-rich plasma (PRP) obtained from autologous bloods considered a useful resource in the tissue repair process because it contains a plasma concentration with a large amount of platelets and growth factors when compared to whole blood. Interleukin (IL)  $1\beta$  is a pro-inflammatory cytokine and inhibition of its activity may be adequate for accelerated repair of the lesion. Blockers of the action of this cytokine already exist in the market, but its high cost limits access and clinical use. As a result, the present research aimed to use an inhibitory peptide based on the IL-1 antagonist receptor molecule (IL-1RA) with the ability to attenuate the responses triggered by IL- $1\beta$ , through functional receptor blockage, in the inflammatory phase of tissue repair. Doubts regarding leukocyte concentration in the preparation of PRP persists in the literature and which situations would be indicated. Thus, one of the objectives of this study is to evaluate the action of leukocyte-rich PRP (PRP-RL), leukocyte-poor PRP (PRP-PL), isolated or associated with an antagonist peptide of IL- $1\beta$  receptor 1 and 2 (PAD1-2) and also its isolated use in controlling the initial inflammatory process after animal-induced traumatic muscle injury. First, under anesthesia, 6 male Wistar rats were submitted to cardiac puncture to remove 7 mL of blood to obtain the PRP-RL and PRP-PL. After that, 84 Wistar male rats were divided into seven groups of twelve animals: Sham; Muscle Injury (MI); MI + PRP-RL; MI + PRP-PL; MI + PAD1-2; MI + PRP-RL + PAD1-2; MI + PRP-PL + PAD1-2. He was induced under anesthesia, a contusional muscle trauma in the animals and on the fifth day euthanized by guillotine decapitation and gastrocnemius dissection. Histological parameters evaluated inflammatory cell infiltrates and by RT-qPCR the gene expression of nuclear transcription Kappa B (NF- $\kappa$ B) and IL- $1\beta$  was evaluated. By ELISA, the protein levels of pro and anti-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha - TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10 and beta growth transformation factor - TGF- $\beta$ ) were evaluated and evaluated by spectrophotometer the production of oxidants, antioxidant defense and oxidative damage (NO, DCF, SOD, GSH, Carbonil and Sulfhydryl). In all parameters evaluated, reduction of inflammatory and oxidizing markers was obtained with maintenance of oxyreducing balance, more evident in the groups treated with PRP-PL + PAD1-2, which allows to affirm that there was regulation of the initial inflammatory process that assists in the transition more effective for the regenerative phase of tissue repair.

**Keywords:** muscle injury; platelet-rich plasma; inflammation; interleukin; peptide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Atuação dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos tipo 1 (M1) e tipo 2 (M2) na lesão muscular .....	15
<b>Figura 2</b> – Regeneração do músculo esquelético dependente da resposta inflamatória .....	16
<b>Figura 3</b> - Ação das enzimas antioxidantes no organismo: SOD, CAT e GSH.....	22
<b>Figura 4</b> - Etapas para obtenção PRP.....	29
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de trauma muscular. ....	34
<b>Figura 6</b> – Extração do sangue e armazenamento do PRP. ....	36
<b>Figura 7</b> – Desenho experimental da pesquisa .....	38
<b>Figura 8</b> – Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre a expressão gênica relativa de NF-kB e IL-1 $\beta$ .. ....	40
<b>Figura 9</b> – Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias.....	44
<b>Figura 10</b> - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento. ....	45
<b>Figura 11</b> - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de oxidantes.....	46
<b>Figura 12</b> - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de dano oxidativo e antioxidantes.....	47
<b>Figura 13</b> - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre a análise histológica.....	48

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	LESÃO MUSCULAR	13
1.2	LESÃO TECIDUAL E INFLAMAÇÃO	14
1.3	INTERLEUCINA 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	18
1.4	LESÃO MUSCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO	19
1.5	PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	23
1.6	PLASMA RICO EM PLAQUETAS RICO E POBRE EM LEUCÓCITOS	25
1.7	PEPTÍDEO ANTAGONISTA DOS DOMÍNIOS 1 e 2 DO RECEPTOR 1 DE IL-1 $\beta$ (PAD1-2)	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1	PROCEDIMENTOS ÉTICOS	33
3.2	ANIMAIS	33
3.3	MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA POR CONTUSÃO	33
3.4	PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	35
3.5	PEPTÍDEO ANTAGONISTA DOS DOMÍNIOS 1 E 2 DO RECEPTOR 1 DE IL-1 $\beta$ (PAD1-2)	36
3.6	DESENHO EXPERIMENTAL	37
3.7	PROTOCOLO DE HISTOLOGIA	38
3.8	TESTES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS	38
3.8.1	RT-qPCR	38
3.8.2	Marcadores Inflamatórios	39
3.8.3	Parâmetros de Estresse Oxidativo	39
3.8.4	Determinações do Conteúdo Proteico	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>59</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT - Catalase  
DCFH-DA - 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína  
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio  
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio  
EGF - Fator de Crescimento Epidermal  
FGF - Fator de Crescimento Fibroblástico  
GPx - Glutathione Peroxidase  
GR - Glutathione Redutase  
GSH - Glutathione  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio  
IFN $\gamma$  - Interferon Gama  
IK $\beta$  - Indutor do Fator Kappa B  
IL - Interleucina  
IL-1RA - Receptor Antagonista de IL-1  
M1 - Macrófagos tipo 1  
M2 - Macrófagos tipo 2  
MEF2 - Potenciador Específico de Miócito  
MMP - Metaloproteinase de Matriz  
MDA - Malondialdeído  
MMP - Metaloproteinases  
MPO - Mieloperoxidase  
MPS - Sistema Fagocitário Mononuclear  
MAP quinase - Proteína-Quinases Ativadas por Mitógenos  
NAC - N-acetilcisteína  
NADPH - Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida  
NADPH oxidase - Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Oxidase  
NO - Óxido Nítrico  
NOs - Óxido Nítrico Sintase  
NF- $\kappa$ B - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion Superóxido  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - Oxigênio Singlete

OH<sup>-</sup> - Hidroxila

PAD1-2 - Peptídeo Antagonista dos Domínios 1 e 2

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PPFC - Plasma Pobre em Fator de Crescimento

PRFC - Plasma Rico em Fator de Crescimento

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

PRP-RL - Plasma Rico em Plaquetas Rico em Leucócitos

PRP-PL - Plasma Rico em Plaquetas Pobre em Leucócitos

SOD - Superóxido Dismutase

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TGF- $\alpha$  - Fator de Transformação de Crescimento  $\alpha$

TGF- $\beta$  - Fator de Transformação de Crescimento  $\beta$

VEGF - Fator de Crescimento Vascular endotelial

XO - Xantina Oxidase

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LESÃO MUSCULAR

O sistema muscular esquelético é constituído por fibras musculares estriadas esqueléticas, alongadas, dispostas paralelamente, com citoplasma e um ou vários núcleos em sua periferia, com um aspecto estriado característico ao microscópio, constituídas por 75% de água e 20% de proteína. A matriz extracelular é fundamental para o funcionamento normal do músculo, para manter sua integridade e para o reparo pós lesão (Rezende et al., 2015).

As lesões musculares são muito comuns e na prática esportiva correspondem a aproximadamente um terço das lesões (Margato et al., 2020). Em um estudo que avaliou a incidência de lesões musculares em três temporadas consecutivas do campeonato brasileiro de futebol (2016, 2017 e 2018), foi identificada uma incidência de 7,7 lesões musculares a cada 1.000 h de treino e/ou jogo que corresponderam a 35% de todas as lesões. Deste montante, 38% dos casos envolveram os músculos isquiotibiais ou posteriores da coxa (Margato et al., 2020).

Todo esporte que exige um grande esforço físico, especialmente a força de contração excêntrica, pode gerar uma lesão muscular, como ocorre nos movimentos de *sprint*, salto de obstáculos e chutes, predispondo os atletas recreativos, amadores e profissionais ao desenvolvimento de lesões devido à grande demanda física. Este esforço intenso pode estar associado, ou não, a uma maior exposição à fatores de risco como o número excessivo de treinos e jogos, estresse e a presença de lesões prévias (Hyldahl et al., 2014). As lesões musculares mais frequentes são subdivididas em: atraumáticas, como câibras e o dolorimento muscular tardio, ambas causadas por desequilíbrios hidroeletrólíticos e fadiga, que normalmente respondem bem ao repouso; e as traumáticas, geradas por trauma direto como a contusão ou trauma indireto, que são os estiramentos (rupturas) parcial ou total que ocorrem comumente na contração excêntrica e geram maior incapacidade (SantAnna et al., 2022).

As lesões musculares são diagnosticadas pelo exame clínico e por exames radiológicos (ecografia ou ressonância nuclear magnética) e graduadas pela classificação do Consenso de Munique (2013), sendo responsáveis, dependendo do grau, pela prolongada ausência do esporte independentemente da idade ou modalidade (Mueller-Wohlfahrt et al., 2013). Além disso, podem exigir longa

reabilitação e readaptação, com uma taxa de reruptura de até 39% dentro de uma mesma temporada. Desta forma, a resposta insuficiente ao tratamento ou mesmo um tratamento inadequado, representa um problema substancial tanto para os atletas quanto para suas equipes (Silvers-Granelli et al., 2020).

## 1.2 LESÃO TECIDUAL E INFLAMAÇÃO

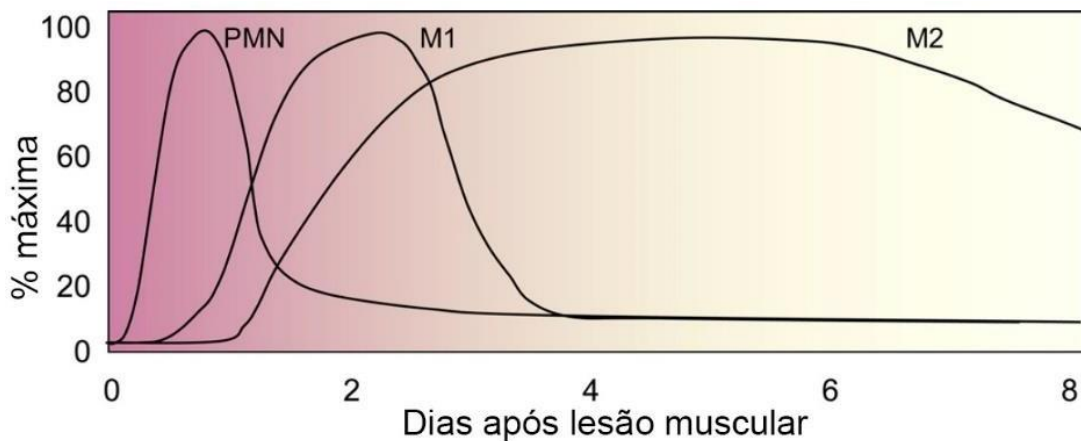
Independentemente do tipo de lesão, o processo de reparo é compartilhado entre todos os tecidos moles, com diferenças no tempo, duração das fases e interações entre os principais mediadores dependendo do tecido acometido (Middleton et al., 2012). Na literatura são descritas as três fases do processo de reparação tecidual como: primeiro a fase inflamatória com duração aproximada de dois a quatro dias; na sequência a fase de regeneração que perdura da segunda semana até a quarta/sexta semana após a lesão; finalmente a fase de reparação ou remodelação que pode prolongar-se por até três ou seis meses após lesão inicial (Tidball et al., 2010).

A cascata de reparação inicia imediatamente após a lesão tecidual, independente da sua causa, produzindo a desestruturação do sarcômero, ativando uma outra cascata, a da coagulação e hemostasia (Arvind et al., 2021). Com o extravasamento sanguíneo, que depende da extensão da lesão das fibras musculares e a formação do hematoma, ocorre a migração de fatores hemostáticos e mediadores inflamatórios para dentro da lesão (Arvind et al., 2021). Em seguida, inicia-se o sistema de agregação plaquetária, formado de coágulos e desenvolvimento de uma construção de matriz extracelular provisória. As plaquetas aderem às proteínas da matriz extracelular circulante e são ativadas desencadeando a liberação dos fatores bioativos dos grânulos alfa que incluem os diversos fatores de crescimento, citocinas e mediadores pró-inflamatórios (Tidball et al., 2010).

A fase seguinte à hemostasia é a inflamatória. Nesta fase os agentes quimiotáticos desempenham papel fundamental atraindo diferentes tipos de células para dentro da lesão. Microscopicamente ocorre a migração de células mononucleares, macrófagos e linfócitos capazes de secretar fatores de crescimento celular com funções específicas no processo inflamatório (Kaneko et al., 2019). Os neutrófilos são os primeiros a migrar na área da lesão já nas primeiras 1-2 horas após o dano, denominada fase inicial da inflamação. Em aproximadamente 48 a 72 horas

após a lesão, migram os macrófagos. Posteriormente, as últimas células a migrarem para a ferida, durante a fase inflamatória tardia, são os linfócitos (Mantovani et al., 2004).

Após o trauma seguido da cascata de coagulação e início da inflamação, os macrófagos passam a desempenhar importante papel entre a fase inflamatória e regenerativa. Estas células passam por dois estágios diferentes de ativação e são categorizadas em dois tipos principais: os macrófagos pró-inflamatórios classicamente ativados denominados de tipo 1 (M1) e os macrófagos anti-inflamatórios alternativamente ativados denominados de tipo 2 (M2), conforme demonstrado na figura 1 (Fadok et al., 1998; Fadok et al., 2001; Rea et al., 2018).



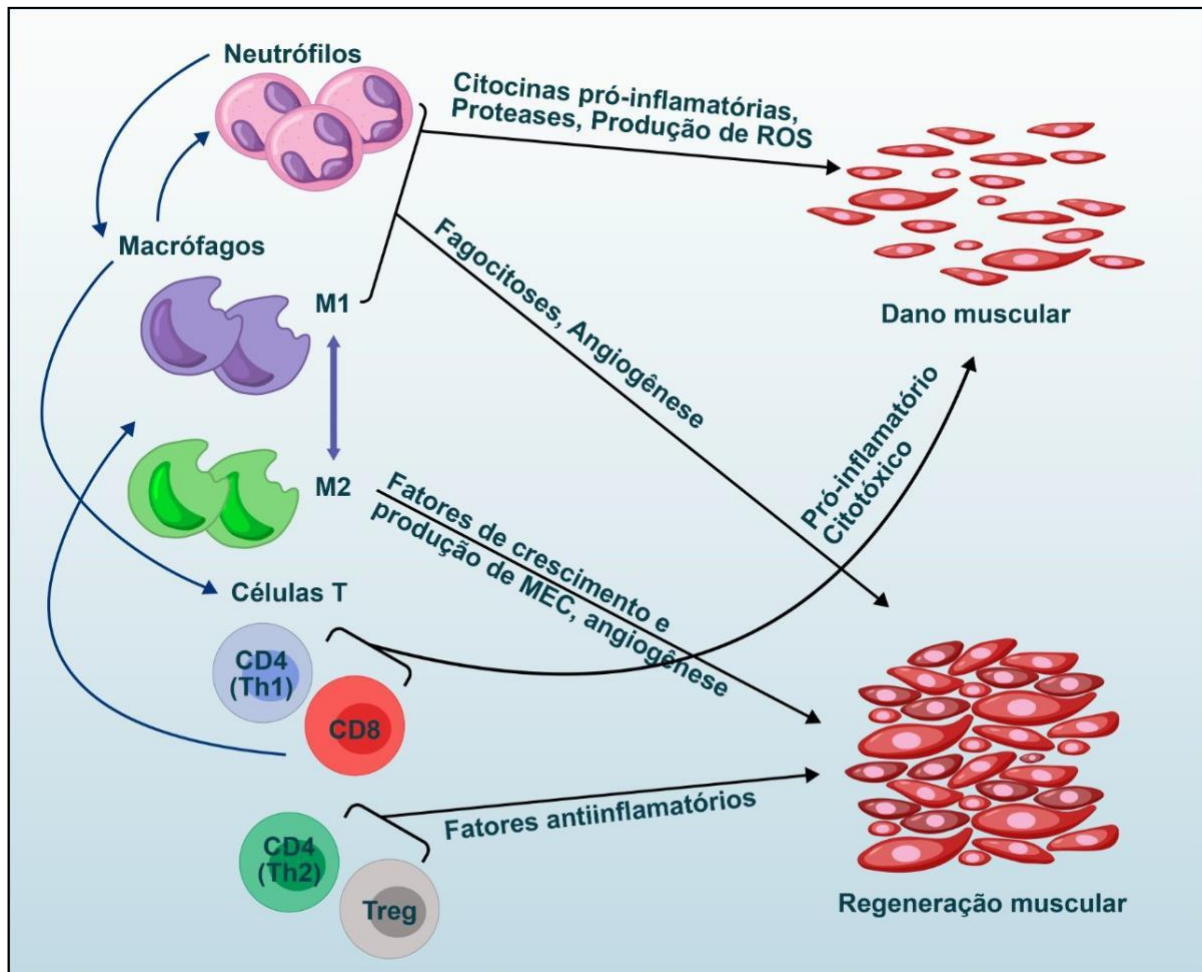
**Figura 1** - Atuação dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos tipo 1 (M1) e tipo 2 (M2) na lesão muscular (Adaptado de Tidball et al., 2010)

As interleucinas (IL) pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) além de ativar os macrófagos M1, que aumentam a permeabilidade local e aceleram a resposta inflamatória feita pelas células fagocitárias que migram para o tecido lesado, participam na geração de células T (linfócitos T), que atuam na resposta imune mediada por células e também na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), conhecido como um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória e no aumento da proliferação das células musculares. Por outro lado, as IL's anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) inibem os macrófagos M1 evitando a destruição celular e promovem a regeneração tecidual (Tidball et al., 2010; Glezer et al., 2022).

O início da fase regenerativa, que se intercala com o final da fase inflamatória, caracteriza-se pela progressiva fagocitose dos neutrófilos apoptóticos



pelos macrófagos M1, supressão da expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (figura 2), pelo aumento da expressão do fator de transformação de crescimento alfa (TGF- $\alpha$ ) e também uma importante expressão dos fatores reguladores miogênicos (Ziemkiewicz et al., 2021).



**Figura 2** – Regeneração do músculo esquelético dependente da resposta inflamatória (Adaptado de Ziemkiewicz et al., 2021)

Alguns fatores de crescimento, como fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), regulam a proliferação e diferenciação celular associadas à ativação das células satélites, elementos fundamentais no processo de regeneração celular. As células-satélites são ativadas diferenciando-se em miotúbulos multinucleares dispostos ordenadamente para a regeneração musculoesquelética (Rubinstein e Kelly, 2004).

À medida que a inflamação diminui, a reconstituição tecidual se inicia e as células endoteliais e os fibroblastos se acumulam no local da lesão para sintetizar o

tecido de granulação. A angiogênese e fibroplasia ocorrem simultaneamente, fornecendo oxigênio, nutrientes e uma matriz muito hidratada sustenta os altos níveis de atividade celular. Os fibroblastos desempenham um papel importante na produção das substâncias desta matriz (colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido hialurônico), que interagem com as células para mediar migração, crescimento e diferenciação (Villalta et al., 2009).

A fase final do processo de cicatrização envolve a maturação e remodelação da lesão. Nessa fase, o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o TGF- $\beta$  estimulam a proliferação e a migração de fibroblastos, além de estimular a síntese de componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. A remodelação ocorre quando os fibroblastos aumentam a expressão do colágeno tipo I e as metaloproteinases de matriz (MMP's) quebram as cadeias desorganizadas do colágeno antigo, principalmente do tipo III (Rubinstein e Kelly, 2004).

O equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno resulta no desenvolvimento de uma cicatriz normal, onde as fibras de colágeno são rearranjadas em pequenos feixes paralelos ao longo das linhas de tensão, mais uma vez predominantemente do fenótipo tipo I. O fim do reparo é sinalizado pela apoptose de células vasculares e miofibroblastos à medida que seu trabalho é completado, convertendo o tecido de granulação rico em células, em tecido cicatricial preenchido por colágeno (Monsanto et al., 2019).

A fase de maturação varia em duração, dependendo da extensão da lesão, além das características individuais e das capacidades específicas de cicatrização do tecido envolvido. Somado a isso, fatores fisiopatológicos e metabólicos podem afetar a cicatrização de feridas, incluindo as causas locais como isquemia, hipóxia tecidual, infecção e desequilíbrio de fator de crescimento, bem como causas sistêmicas consoante ao uso crônico de medicamentos como os corticosteroides, doenças metabólicas e estado nutricional. Conforme a literatura, alterações nutricionais e a síndrome metabólica podem conduzir a um desequilíbrio de macrófagos M1 e M2, resultando na invasão de fatores pró-inflamatórios, prejudicando a recuperação tecidual (Talukder et al., 2011).

### 1.3 INTERLEUCINA 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

A IL-1 $\beta$  é uma das citocinas pró-inflamatórias mais conhecidas e investigadas, sua via de sinalização está associada à imunidade inata, com ativação de cascatas características de receptores do tipo *Toll-like* e cascatas clássicas do NF- $\kappa$ B e MAP quinases (Nosenko et al., 2019). Essa citocina faz parte da família IL-1, que possui 11 membros, na qual sete moléculas possuem ação agonista do receptor (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  e IL-36 $\gamma$ ), três são moléculas antagonistas de receptores (IL-1RA, IL-36RA e IL-38) e uma possui ação anti-inflamatória (IL-37) (Garlanda et al., 2013; Dinarello et al., 2018). A partir das ativações pelas cascatas, a IL-1 $\beta$  desencadeia respostas como aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio, associado ao estímulo de expressão de quimiocinas, que promovem o aumento na atividade de linfócitos e infiltração de células inflamatórias para o espaço extravascular (Naik et al., 2017).

Dentre as células inflamatórias, primeiramente os neutrófilos invadem rapidamente o tecido muscular após aumento da carga ou lesão aguda e suas concentrações podem permanecer elevadas por períodos de até 5 dias pós lesão (Tidball, 2005). Estudos indicam que o excesso de neutrófilos invasores no músculo provoca modificações histológicas no tecido causada pela liberação de proteases como parte da intensa atividade fagocitária. Além disso, altas concentrações de moléculas citolíticas e citotóxicas são liberadas e podem danificar o músculo ou outros tecidos saudáveis adjacentes. Desta forma, o papel da IL-1 $\beta$  na quimiotaxia de neutrófilos para o tecido pode contribuir para dano muscular através das lesões celulares secundárias (Tidball, 2017).

Ainda, o aumento persistente nos níveis de IL-1 $\beta$  pode promover a inibição de síntese de proteínas no tecido muscular e valores elevados desta citocina por um período acima de 48 horas (fase inflamatória da reparação tecidual) pode causar inibição da diferenciação dos mioblastos pelas células satélites, limitando a resposta regenerativa e retardando o processo de cura (Garlanda et al., 2013). Além disso, outros sinais relevantes são desencadeados pelo excesso de IL-1 $\beta$ , como a redução na expressão de fatores de crescimento e degradação de proteínas da membrana extracelular devido a altos níveis de MMP.

A família de IL-1 possui dois receptores específicos, o receptor de interleucina 1 do tipo 1 (IL-1R1) e o receptor de interleucina 1 do tipo 2 (IL-1R2), sendo

que o primeiro possui ação pró-inflamatória por desencadear a cascata de sinalização intracelular necessária para ocasionar a ação biológica. Já o segundo, possui ação anti-inflamatória indireta, pois quando ocorre a ligação do agonista no receptor IL-1R2, o mesmo não é ativado, visto que essa ligação não ocasiona uma cascata de sinalização intracelular (Dinarello et al., 2018; Kaneko et al., 2019). Portanto, o desenvolvimento de moléculas com capacidade de bloquear IL-1 $\beta$  ou sua sinalização através do seu receptor, representam uma opção promissora para atenuar a resposta inflamatória e progressão do processo regenerativo (Boraschi et al., 2013).

#### 1.4 LESÃO MUSCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO

Uma das causas da ativação da inflamação também ocorre pelo aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) incluindo os radicais hidroxila e o superóxido ou das espécies reativas de nitrogênio (ERN) como o nitrito, no sangue e nos tecidos, pela redução da molécula de O<sub>2</sub>, durante e após a lesão muscular. Isto gera uma degeneração tecidual, perda da função e um desequilíbrio na condição biológica tecidual, ocasionando o estresse oxidativo com aumento constante na produção destas espécies (Rice-Evans et al., 1997; Silveira et al., 2012).

Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente (Halliwell, 2000; Barbieri et al., 2011).

Na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessa, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila

(OH<sup>-</sup>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxila (ROO) e alcoxila (RO); e os não-radicalares: oxigênio (O<sub>2</sub>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ácido hipocloroso (HOCl). Dentre as ERN estão o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) (Barreiros, 2006).

Estudos estabelecem que as ERO e as ERN são de extrema importância na regulação de funções celulares e que atuam como mensageiros em diversos sistemas biológicos durante o metabolismo celular. Quase todos os eventos, incluindo a sobrevivência, tem sido associado à remoção e aceitação de elétrons, que impacta sobre outras moléculas e causam estresse oxidativo durante eventos fisiológicos e patológicos (Pinho et al., 2022).

Os principais e mais importantes mecanismos de produção de ERO na lesão muscular são: o aumento na produção de superóxido mitocondrial, a ativação do complexo fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido (NADPH oxidase) e a ativação da xantina oxidase (XO). Na mitocôndria, uma das formas de produção de ERO é devido ao escape de elétrons entre o complexo I e ubisemiquinona e entre ubisemiquinona e o complexo III gerando maior parte dos superóxidos produzidos (Powers et al., 2011; Drose e Brandt, 2012). Estima-se que de 2-4% do oxigênio mitocondrial seja reduzido a superóxido. Para Robbins (1995), lesões celulares, como no tecido muscular, são acompanhadas por alterações funcionais e morfológicas nas mitocôndrias, em que o aparecimento de poros na membrana altera sua permeabilidade permitindo entrada ou escape de substâncias e prejudicando a homeostase, podendo levar à morte celular (Halliwell, 2000).

A ativação de leucócitos após o dano muscular, estimula a produção das ERO, em particular os neutrófilos, que são as maiores fontes de produção de superóxido pela reação NADPH-oxidase. O complexo NADPH-oxidase produz quantidades significativas de superóxido em diferentes tecidos. Essa formação ocorre a partir da transferência de elétrons para o oxigênio em processos em que o tecido lesionado apresenta elevado consumo do mesmo. Este processo é conhecido como *respiratory burst* e ocorre em situações de intensa fagocitose (Jiang et al., 2011).

A geração de metabólitos do oxigênio resulta da rápida ativação de uma NADPH-oxidase de leucócito, chamada oxidase de fagócito, que oxida o NADPH, e no processo, converte o oxigênio em O<sub>2</sub><sup>-</sup>. O superóxido é então convertido, por desmutação espontânea, em peróxido de hidrogênio (O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Essas ERO

atuam como radicais livres e na destruição de microrganismos (Robbins, 2010; Talukder et al., 2011).

Já a XO liga-se a um elétron da redução do  $O_2$  formando o superóxido, além de também poder ser convertida da forma reduzida (xantina desidrogenase) para forma oxidada por proteases intracelulares que pode ser ativada pelo cálcio. As citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  podem aumentar a produção de oxidantes por uma estimulação direta de neutrófilos que produzem radical superóxido, aumentando a atividade da XO. Portanto, é necessário um balanço coordenado na produção de oxidantes após lesão muscular, para sinalizar células imunes sem ocorrência de dano oxidativo (Page e Powell, 1998; Toumi H., 2003).

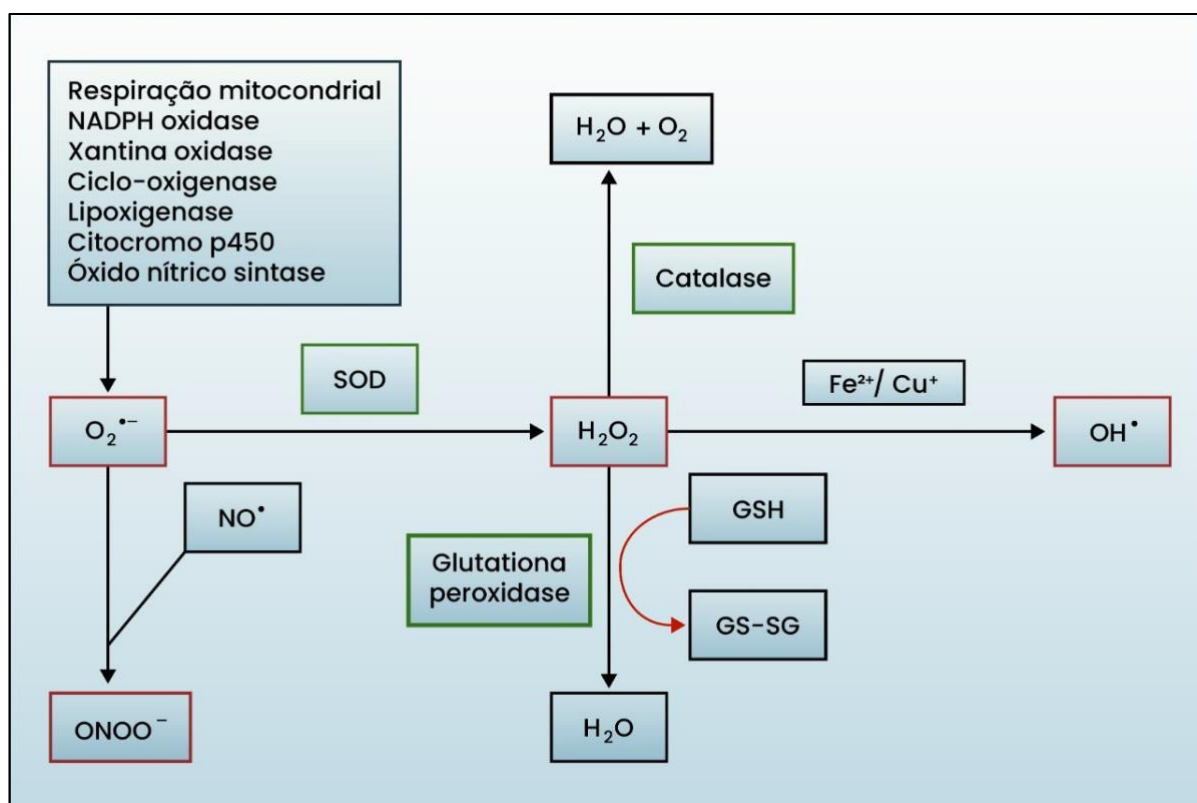
O grupamento carbonila (aldeídos e cetonas) é produzido nas cadeias laterais da proteína quando elas são oxidadas e os derivados proteicos carbonila podem ser gerados pela clivagem oxidativa das proteínas, conduzindo à formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado. O teor da proteína carbonil é atualmente o indicador mais utilizado de oxidação proteica e pode ser detectado um acúmulo em doenças inflamatórias como a artrite, diabetes e Alzheimer (Paraboni et al., 2022).

Por outro lado, para suprimir o aumento descontrolado das ERO, o organismo trabalha com mecanismos reguladores de defesas antioxidantes caracterizados como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (Halliwell e Gutteridge, 2007). As proteções ou sistemas antioxidantes do organismo contra as ERO e ERN ocorrem pela proteção enzimática (macromoléculas) ou pelo sistema não enzimático (micromoléculas), que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) estão entre as principais ações antioxidantes e representam as macromoléculas que podem atuar diretamente contra as ERO e ERN (Scandalius, 2005).

A SOD catalisa e realiza a destruição do radical  $O_2^-$ , convertendo-o em  $O_2$  e  $H_2O_2$ . A ação desta enzima permite a eliminação do superóxido, mesmo em baixas concentrações (Halliwell, 2000). Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém  $Cu^{2+}$  (cobre) e  $Zn^{2+}$  (zinco) como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda forma de SOD contém  $Mn^{2+}$  (mangânês) como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua

atividade aumenta com o estresse oxidativo (Eiserich et al., 1996).

Por sua vez, como apresentado na figura 3, a espécie reativa peróxido de hidrogênio resultante da ação da SOD sobre o radical superóxido, pode ser neutralizada pela enzima catalase (CAT) que atua na dismutação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  ou pela enzima glutaciona (GSH) operando em ciclos entre sua forma oxidada, conhecida como glutaciona peroxidase (GPx) ou em sua forma reduzida, denominada glutaciona redutase (GR). A GSH reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  em presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada pela ação da GR que usa o NADPH como cofator (Butterfield et al., 2009; Biswas, 2016).



**Figura 3** - Ação das enzimas antioxidantes no organismo: SOD, CAT e GSH (Adaptado de Biswas, 2016).

Apesar destes efeitos danosos, o radical  $\text{O}_2^-$  tem grande importância para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. O radical  $\text{O}_2^-$  é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do  $\text{O}_2$  com gasto de uma molécula de NADPH (Babior, 1997).

## 1.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Dentre os possíveis tratamentos para lesões musculares estão as técnicas de reabilitação fisioterápica, terapia hiperbárica e a ortobiologia, que vêm sendo desenvolvida e aperfeiçoada ao longo dos anos, entre elas o uso do PRP. O avanço no conhecimento da ciência básica relacionada ao reparo da lesão muscular e da medicina regenerativa a nível musculoesquelético, especialmente no comportamento das células satélites e a resposta imune ao trauma, propicia por meio da terapia biológica, a possibilidade de uma melhora na qualidade e na velocidade da cicatrização tecidual (Andia e Maffulli, 2018).

O termo PRP surgiu no início dos anos 70 por hematologistas descrevendo plasma com uma concentração de plaquetas maior que o sangue periférico (Andia, 2015), sendo uma fonte autógena, pouco onerosa e rica em de fatores de crescimento, que é preparada a partir do sangue total retirado do próprio paciente. É atóxico, imunogênico e formado por plaquetas, leucócitos e plasma. Sua utilização emerge progressivamente desde a década de 90, inicialmente na odontologia e nas últimas duas décadas na medicina por promover forte estímulo ao reparo tecidual (Seow et al., 2020).

Após coleta do sangue venoso periférico, por meio da centrifugação do sangue, é obtido um pequeno volume de plasma contendo alta concentração de plaquetas que atua no processo de hemostasia, cicatrização e reepitelização tecidual (Everts et al., 2020). Qualquer protocolo de obtenção do PRP deve concentrar plaquetas no seu nível máximo para que corresponda aos resultados clínicos relatados na literatura. Mas, além de uma alta concentração plaquetária com grande liberação de fatores de crescimento, é muito importante que seja mantida a integridade das plaquetas. Os fatores de crescimento devem ser liberados de plaquetas viáveis, uma vez que no ato de exocitose granular a plaqueta completa a estrutura terciária das proteínas do fator de crescimento. As plaquetas fragmentadas podem desgranular grandes quantidades de fatores de crescimento com efetividade diminuída (Grambart et al., 2015; Chellini et al., 2019).

Vários protocolos são descritos para a obtenção do plasma concentrado, porém sem que se tenha uma padronização ideal e um consenso internacional para a classificação dos tipos de PRP. De acordo com o protocolo de Anitua (1999), após a primeira centrifugação há separação em três camadas: a mais inferior formada pelas



células vermelhas, o “buffy coat” (BC) que é rico em leucócitos e plaquetas na camada intermediária e acima o plasma acelular subdividido em plasma pobre em fatores de crescimento (PPFC) e o plasma rico em fatores de crescimento (PRFC). Após uma segunda centrifugação é descartado 1 mL da camada superior, correspondente ao PPFC restando a porção logo acima do BC que quando coletada isoladamente caracteriza o PRP pobre em leucócitos (PRP-PL) ou quando coletada em associação com o BC caracterizando o PRP rico em leucócitos (PRP-RL) (Anitua, 1999; Solakoglu et al., 2020).

Ainda, para que as plaquetas sejam verdadeiramente concentradas a partir do sangue autólogo, devem ser utilizados protocolos de dupla centrifugação executadas com precisão para que se obtenha plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras. Além do número de centrifugações, fatores como o tempo e a força aplicada nas centrifugações, também influenciam na qualidade do PRP (Collins et al., 2021). Caso não seja realizado de acordo, a eficácia terapêutica do PRP pode ser reduzida, especialmente se houver fragmentação das plaquetas e liberação dos fatores de crescimento precocemente (Marx, 2001; Everts et al., 2020).

Ademais, é importante mencionar que alguns estudos que discutem a eficácia e o uso do PRP nas lesões musculares, relatam que o uso em humanos não obteve respaldo para utilização em virtude de não haver diferença no tempo de reabilitação final (Grassi et al., 2018; Silvers-Granelli et al., 2021). Por outro lado, também há estudos que relatam resultados positivos com o PRP (Yu Ty et al., 2021; Arumugam et al., 2021), inclusive descrevendo ausência de complicações com o procedimento, principalmente por apresentar evidências que dão suporte ao uso do PRP com a indução da cura pela redução da inflamação e regulação da resposta anabólica por liberação do TGF- $\beta$ , VEGF e do FGF (Seow et al., 2020).

Estudos experimentais e clínicos vêm revelando os efeitos da injeção intralesional de PRP em lesões musculares e, de modo geral, os achados desses estudos reportam melhor regeneração muscular, aumento de neovascularização e redução de fibrose (Quarteiro et al., 2015). Todavia, apesar de haver estudos que apresentaram a técnica de preparo de PRP em ratos, principalmente correlacionando a importância da quantidade e velocidade da centrifugação com a concentração de plaquetas no PRP, ainda há a necessidade da padronização dos procedimentos para o preparo do PRP (Yagizi Júnior et al., 2015; Everts et al., 2020).

Outro aspecto importante é não ter sido encontrado na literatura autores

que descartassem as propriedades curativas atribuídas a concentrações aumentadas de fatores autólogos de crescimento tecidual e proteínas em nível celular. A expectativa é que esses fatores, quando introduzidos no local da lesão aumentem o recrutamento, proliferação e a diferenciação das células envolvidas no processo de reparação promovendo o reparo acelerado e com melhor diferenciação tecidual (Arumugam et al., 2021).

O uso clínico do PRP é progressivamente estudado, incluindo reparo das lesões musculotendíneas, lesões condrais, lesões ósseas e no tratamento de lesões de pele como as úlceras crônicas em pés diabéticos. Porém, são necessários estudos mais aprofundados tanto *in vitro* quanto *in vivo* para melhor definição acerca do tema, especialmente adotando protocolos que visam uma maior concentração de plaquetas no plasma, pois ainda há muito desencontro dentro da literatura em relação aos mesmos (Quarteiro et al., 2015).

## 1.6 PLASMA RICO EM PLAQUETAS RICO E POBRE EM LEUCÓCITOS

A grande controvérsia ainda existente envolvendo a terapia com PRP é a concentração dos componentes celulares, especialmente os leucócitos. Em trabalhos mais recentes muito se tem debatido sobre a nomenclatura e diferenciação entre o PRP rico ou pobre em leucócitos, inclusive em quais condições patológicas estariam indicados (Hammond et al., 2009; Collins et al., 2021). Dependendo da técnica de preparo os leucócitos, especialmente os monócitos, podem ser proeminentes ou não no PRP e suas manifestações e capacidades regenerativas ainda são muito pouco discutidas na literatura (Kyle et al., 2019).

Os leucócitos são encontrados no sangue periférico atuando como elemento chave do sistema imunológico normal. O agrupamento de leucócitos inclui neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e os monócitos. Plaquetas e leucócitos interagem em múltiplas e diferentes formas incluindo a ativação plaquetária para transmigração e melhora no recrutamento dos leucócitos para as áreas de lesão (Pavlovic et al., 2016).

A presença ou ausência de leucócitos na formulação influencia fortemente na função do PRP, pois dependendo da finalidade do tratamento e do local da aplicação, os leucócitos podem ter efeitos positivos ou negativos. O aumento da concentração dos leucócitos está relacionado com as concentrações aumentadas de

citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 (Cavallo et al., 2014).

Controvérsias existem na classificação, na compreensão da bioformulação do PRP, na concentração ideal de plaquetas e em particular dos leucócitos (Hersant et al., 2019). Autores descrevem que várias são as classificações do PRP e que versam sobre concentração celular, dose ideal, eficácia, pureza e ativação, mas nenhuma delas é validada a nível de consenso internacional. As barreiras para o uso dessas classificações incluem o problema da simplificação excessiva das mesmas ou uma tendência das classificações se tornarem cada vez mais complexas, podendo representar barreiras para grupos de pesquisa menores que podem não ter os recursos para analisar em suas preparações no mesmo padrão das corporações farmacêuticas de grande escala (Dohan et al., 2009; Collins et al., 2021).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados dos megacariócitos que se diferenciam na linhagem de células mieloides. Contém os grânulos  $\alpha$ , as unidades de armazenamento de plaquetas, que estudos sugerem conter uma abundância de fatores de crescimento e são as precursoras no processo de reparo tecidual, mas em tecidos em que não há um bom suprimento vascular como os tendões, ligamentos e cartilagens resulta em baixos níveis de fatores de crescimento, e nestes locais, a aplicação de PRP se justificaria a fim de introduzir níveis supra fisiológicos de fatores de crescimento (Blair e Flaumenhaft, 2009; Cianforlini et al., 2015; Tsai et al., 2018).

Há questionamentos relativos à importância da presença ou ausência dos leucócitos no preparo do PRP e se isto influenciaria na resposta inflamatória e quais as indicações do PRP-RL e PRP-PL seriam as mais apropriadas, se as lesões agudas ou crônicas (Sathish et al., 2022; Ziegler et al., 2019). A natureza do mecanismo de ação do PRP sugere que, em teoria, possa ser aplicado à várias situações patológicas musculoesqueléticas para auxiliar os processos naturais de reparação. Uma revisão sistemática e metanálise de seis ensaios clínicos randomizados avaliando a eficácia do PRP na redução do tempo de reabilitação para retorno ao esporte, demonstrou que o tempo foi significativamente menor (em média 7,17 dias) no grupo PRP (Grassi et al., 2018).

No entanto, quando apenas os estudos duplo-cegos ou estudos incluindo apenas lesões nos músculos isquiotibiais foram incluídas na análise, nenhuma diferença significativa foi observada. Além disso, as taxas de relesão foram semelhantes entre PRP e controles em todos os estudos. Não houve diferenças

significativas em relação à dor, força muscular, flexibilidade, função muscular ou cura por avaliação ecográfica ou por ressonância magnética (Grassi et al., 2018). Dois estudos usaram PRP-PL, dois usaram PRP-RL e dois não determinaram o tipo de PRP. Desta forma, os resultados são variados e o tipo de PRP (rico ou pobre) mais adequado ainda é desconhecido (A Hamid et al., 2014).

Em conclusão ao seu trabalho de revisão sobre as indicações para utilização do PRP, Collins (2021) afirmou que deve ser enfatizado que não há tendências específicas de melhores resultados de um tipo de PRP (PRP-RP ou PRP-PL) em relação a outro e que as implicações da concentração de leucócitos no PRP não são bem conhecidas e relatadas. Isso se deve às metodologias dos estudos analisados não sendo especificamente projetado para responder à pergunta: "Qual tipo de PRP é melhor para esta indicação?"

Portanto, como não há comparação entre essas duas formulações de PRP para qualquer indicação, conclusões definitivas não podem ser feitas. Isto destaca a importância de pesquisas futuras para comparar a eficácia da formulação de PRP em todas as aplicações, ou pelo menos indicar claramente qual formulação de PRP está sendo usada para que possa ser classificado com precisão.

Embora não tenha havido comparação direta dos tipos de PRP para diferentes aplicações dentro da literatura, o PRP-RL parece ser mais eficaz em tendinopatias crônicas. Isso possivelmente se deve a um maior aporte de leucócitos e citocinas no tecido degenerado que pode estimular novamente o processo inflamatório e a remodelação tecidual (Meheux et al., 2016). Em contraste, o PRP-PL parece ser mais benéfico na patologia da cartilagem haja vista que o PRP-RL tem demonstrado causar uma resposta inflamatória aguda significativamente maior com aumento da morte celular de sinoviócitos (Dragoo et al., 2012; Braun et al., 2014).

Em um estudo comparando a influência do PRP-RL e corticosteroides no tratamento da epicondilite lateral aguda, pacientes foram avaliados na segunda e sexta semanas, terceiro mês e sexto mês. Uma considerável melhora dos sintomas no grupo do PRP-RL foi observada no sexto mês comparado ao uso de corticosteroides. Como resultado destes efeitos os autores concluíram que o aumento da concentração dos leucócitos no PRP pode impactar na reparação do tendão a longo prazo podendo este fato ser atribuído à melhora nas condições do tecido reparado pelo estímulo da resposta inflamatória local (Gautam et al., 2015).

Por outro lado, outro estudo relativo ao uso do PRP na epicondilite lateral

aguda não houve uma diferença significativa em relação à eficácia do PRP indiferentemente do tipo (PRP-RL ou PRP-PL), com a afirmação do autor de que esta condição em nada alterou o curso do tratamento realizado (Palakuri e Muthu, 2020).

Os métodos existentes de preparo do PRP não alcançam de forma similar as mesmas concentrações plaquetárias ou leucocitárias, esses fatores podem justificar muito do criticismo a respeito da eficácia e da aplicabilidade do PRP, além de haver pouca informação sobre a quantidade ideal de células para um melhor reparo tecidual. Há na literatura diversos protocolos para obtenção do PRP com o número de repetição das centrifugações dependendo do método a ser usado (Sabarish et al., 2015).

Desta forma, em tese o uso do PRP-RL na lesão muscular aguda poderia promover o retardo no processo de cicatrização, pois as ações das células pró-inflamatórias injetadas, sendo adicionadas às já naturalmente existentes, poderiam levar a um prolongamento da fase inflamatória e conseqüente atraso no processo de reparo tecidual diminuindo a elasticidade e contratilidade muscular, devido a uma menor ativação dos macrófagos M2 (Wasterlain et al., 2013; Li H et al., 2016; Hersant et al., 2019).

Dentre estas células pró-inflamatórias, a população de monócitos é heterogênea e originada de células progenitoras na medula óssea no sistema celular hematopoiético, na corrente sanguínea e migram para os tecidos periféricos dependendo do estímulo gerado. Durante a inflamação os monócitos circulantes deixam a corrente sanguínea e são recrutados para os tecidos lesados ou degenerados. Eles podem atuar também como células efectoras ou progenitoras de macrófagos. Monócitos, macrófagos e as células dendríticas representam o sistema fagocitário mononuclear (MPS), que tem como característica típica a plasticidade na sua expressão gênica (Das et al., 2015).

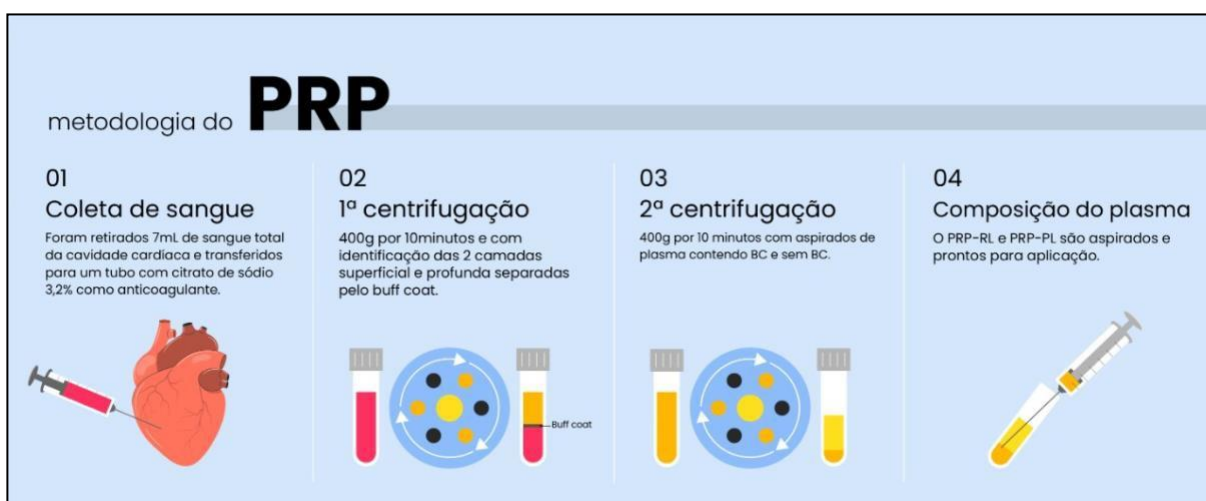
Nos tecidos degenerados os macrófagos residentes, fatores de crescimento de ação local, as citocinas pró-inflamatórias e células necróticas ou apoptóticas iniciam a diferenciação dos monócitos em populações celulares do MPS (Wynn e Vannella, 2016). Com isso, quando o PRP com altas concentrações de leucócitos é injetado no local da lesão, há maior volume de diferenciação de monócitos provocando maiores alterações celulares (Ehrenfest et al., 2012; Röszer, 2015).

Na sequência, o macrófago M2 que são células de ação anti-inflamatória com alta capacidade de fagocitose, produzem também componentes de matriz

extracelular, fatores quimiotáticos, angiogênicos e IL-10. Em adição à defesa, os macrófagos M2 podem também diminuir a resposta inflamatória sendo subdivididos em M2A, M2B e M2C dependendo do estímulo, com o macrófago M2C sendo o principal ativador da IL-10 (Tidball, 2017).

*In vivo* a tradução destes subtipos é difícil com os tecidos contendo normalmente populações mistas de macrófagos. Por outro lado, trabalhos descrevem que os macrófagos M1 podem se modificar mais rapidamente para o fenótipo M2 baseados na sinalização do estímulo gerado no local da lesão com maior número de células inflamatórias e/ou aumento no nível de IL-4 e IL-10. A partir destes dados também é possível supor que os preparos de PRP contendo alta concentração de monócitos e macrófagos (PRP- RL) podem contribuir para o melhor reparo tecidual por causa da maior capacidade de reparo do tecido anti-inflamatório e dos recursos de sinalização celular (Ferrante e Leibovich, 2012; Liu et al., 2016).

Diversos estudos foram feitos em humanos, coelhos e equinos e poucos estudos com protocolos de centrifugação em ratos. Destes se destaca o estudo de Yazigi Júnior et al., (2015) que descreve que o método mais eficaz de obtenção de concentrado de plaquetas ocorreu nas amostras submetidas a duas centrifugações (400 g por 10 minutos + 400 g por 10 minutos), conforme ilustrado na figura 4.



**Figura 4** - Etapas para obtenção PRP. 01: Aspiração sangue periférico; 02: Primeira centrifugação e separação porção superior plasma com ou sem “buffy coat”; 03: Segunda centrifugação do plasma; 04: Obtenção isolada do PRP-PR ou RL pronto para aplicação (Próprio autor, 2022)

## 1.7 PEPTÍDEO ANTAGONISTA DOS DOMÍNIOS 1 e 2 DO RECEPTOR 1 DE IL-1 $\beta$ (PAD1-2)

Outro promissor tratamento advém da bioinformática capaz de desenvolver peptídeos de ação específica e direcionada no organismo. Assim, no presente estudo utilizou-se um peptídeo capaz de reduzir a sinalização desencadeada pela IL-1 $\beta$ . Este peptídeo possui como base a atuação e estrutura da IL-1RA, que é uma molécula antagonista do receptor do tipo 1 da família de interleucina 1, secretada por vários tipos de células, incluindo células imunes, células epiteliais e adipócitos, que atua como inibidor natural do efeito pró-inflamatório de IL-1 $\beta$  (De Pieri, 2022).

A IL-1RA inibe as atividades da IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas à IL-1 $\beta$ . Esta citocina antagonista age se ligando ao receptor da citocina IL-1 $\beta$ , no entanto sem estimular efeitos de cascatas subsequentes. Portanto, ao interagir sem acionar os receptores de IL-1 $\beta$ , a IL-1RA inibe a transcrição de fatores pró-inflamatórios ao mesmo tempo que ocupa receptores que porventura poderiam ser utilizados por citocinas IL-1 $\beta$  (Woodell-May et al., 2020). Desta forma, a área da proteômica, uma das que se sobressaem na bioinformática, possibilita a busca por peptídeos mais estáveis quimicamente, com fácil conservação, com capacidade de atenuar as respostas desencadeadas pela IL-1 $\beta$  por meio do bloqueio de seu receptor funcional (Peng e Gygi, 2018).

No cenário atual, informações da estrutura e características de proteínas, tais como citocinas, podem ser exploradas a partir de bases virtuais. Assim, a arquitetura tridimensional da interação entre a IL-1RA e o receptor IL-1R1 pode ser localizada no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Zhang et al., 2008). Ainda, com o auxílio de programas de visualização de proteínas como o *Swiss PDB Viewer* (Guex e Peitsch, 1997), os aminoácidos-chaves da IL-1RA, ou seja, aqueles que possuem interação com o receptor IL-1R1 podem ser identificados. Com isso é possível a avaliação e seleção manual dos resíduos que obtenham interação com o receptor IL-1R1, conseqüentemente, favorecendo o sequenciamento de peptídeos (Machado de Ávila et al., 2014; De Pieri, 2022).

A partir da visualização da estrutura IL-1RA foram considerados aminoácidos-chaves aqueles aminoácidos da molécula IL-1RA que interagem e fazem ligação com os domínios do receptor. Foram preditos dois peptídeos com base nas interações com os diferentes domínios do receptor IL-1R1 e denominados PAD1-2

que interagem com os domínios 1 e 2 e que não apresentam citotoxicidade e foram eficazes na diminuição dos níveis proteicos de IL-1 $\beta$  (Zaccaron, 2021; De Pieri, 2022).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a ação de diferentes tipos de PRP e do PAD1-2, tanto isolados quanto associados, como método de controle do processo inflamatório em um modelo animal de lesão muscular traumática em ratos Wistar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar no 5º dia, após lesão muscular em ratos Wistar, a expressão gênica de NF- $\kappa$ B e IL-1 $\beta$  através de RT-qPCR;
- Quantificar no 5º dia, após lesão muscular em ratos Wistar, os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ );
- Avaliar no 5º dia, após lesão muscular em ratos Wistar, a produção de oxidantes, dano oxidativo e sistema antioxidante;
- Quantificar no 5º dia, após lesão muscular em ratos Wistar, o infiltrado inflamatório através de análise histológica.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado sob protocolo 11/2022 pela Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7), além de também estarem em conformidade com as diretrizes ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020).

#### 3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 90 ratos Wistar machos com dois meses de vida, pesando entre 200g – 300g, oriundos da colônia de reprodução do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense e agrupados em gaiolas específicas, mantidos em temperatura ambiente controlada entre  $20 \pm 22$  °C ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água *ad libitum*.

Primeiramente, sob anestesia, 6 ratos machos Wistar foram submetidos à punção cardíaca para retirada de sangue e os demais 84 machos Wistar foram divididos nos grupos de estudo.

Ao término do experimento os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação em guilhotina, acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para conservação em freezer na própria universidade. Após isso, os animais foram coletados e transportados por uma empresa terceirizada onde os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos são conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

#### 3.3 MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA POR CONTUSÃO

A lesão muscular traumática foi feita de acordo com o modelo padrão para produção da lesão de músculo estriado esquelético em patas traseiras dos animais (figura 5) desenvolvido por Rizzi et al. (2006), com a prensa lesionadora do Centro

Industrial Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS), que produz a lesão por deslocamento de uma massa metálica (0,459 Kg) através de uma guia com 18 cm de altura com o impacto produzindo uma energia cinética de 0,811 J, conforme especificações do equipamento.



A



B



C

**Figura 5-** Mecanismo de trauma muscular. (A) A prensa lesionadora sem elevação. (B) Altura para iniciar o impacto (18cm) (C) Momento da queda/impacto a ser realizada em região posterior da pata direita dos animais (Próprio autor, 2022)

### 3.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Dos 90 animais destinados ao experimento, foram utilizados 6 ratos Wistar, aleatoriamente escolhidos, para coleta de sangue por punção direta da cavidade cardíaca (figura 6A). De cada animal foram retirados 7 mL de sangue total e acondicionados em tubos de coleta, acrescido de 1,0 mL de citrato de sódio 3,2 % como anticoagulante. Adotando como padrão o procedimento descrito por Yazigi Júnior et al. (2015), o sangue coletado e foi então submetido a duas centrifugações a 400 g por 10 minutos sendo que na primeira foi separado o plasma do concentrado de hemácias, obtendo-se o PRP total. Uma vez separadas as camadas do plasma em diferentes frascos, com e sem “buffy coat” (BC), foi realizada a segunda centrifugação com o PRP-RL (com BC) e PRP-PL (sem BC) depositando-se no fundo dos tubos de coleta, quando então são aspirados e prontos para uso (figura 6B). A camada superior, o plasma pobre em plaquetas, é descartada. O sangue total e os PRP pobre e rico em leucócitos foram submetidos à contagem de plaquetas em equipamento hematológico (CELLTAC ES – MEK 7300) para avaliar sua concentração, e depois estando pronto para aplicação intramuscular. A contagem de leucócitos dos PRPs foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer, onde foram contados os quatro quadrantes externos, cujo volume total é de 0,4 mm<sup>3</sup>.

A contagem de plaquetas e leucócitos em ambos os PRPs comparando com a contagem do sangue total foi de 602.000 plaquetas e 10.3x10<sup>3</sup>/uL leucócitos, no PRP-PL 894.000 plaquetas e 6x10<sup>3</sup>/uL leucócitos e no PRP-RL com 1.325.000 plaquetas e 56x10<sup>3</sup>/uL leucócitos.



A



B

**Figura 6** – Extração do sangue e armazenamento do PRP. (A) Técnica de punção cardíaca. (B) Frascos contendo o PRP-RL, PRP-RL e PAD1-2

### 3.5 PEPTÍDEO ANTAGONISTA DOS DOMÍNIOS 1 E 2 DO RECEPTOR 1 DE IL-1 $\beta$ (PAD1-2)

Por meio de ferramentas de bioinformática, foram realizadas análises *in silico* a fim de obter a sequência do peptídeo PAD1-2, baseado nos aminoácidos da molécula IL-1RA que interagem com os domínios 1 e 2 do receptor do tipo 1. O mesmo foi sintetizado utilizando um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida conforme descrito por Merrifield (1969) e adaptado por Machado de Ávila et al. (2014). O método consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica com a adição de sucessivos resíduos da porção C-terminal para N-terminal e disponível para aplicação após liofilização. O desenvolvimento e síntese do peptídeo inibidor de IL-1 $\beta$  utilizado nesse trabalho, foi realizado e cedido em parceria com o grupo de pesquisa em Biotecnologia Aplicada do Laboratório de Fisiopatologia Experimental – UNESC. A partir de uma revisão bibliográfica associada a análises *in vitro* não publicadas do grupo de pesquisa, a concentração de peptídeo utilizada para o tratamento tópico foi de 1 (um)

mg/mL.

### 3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 84 ratos Wistar (com dois meses de vida pesando entre 200-300 g), para atender a demanda proposta no projeto, que foram divididos em sete grupos experimentais com doze animais cada, de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1** - Descrição e Quantidade de Animais em Cada Grupo

Nº	Descrição do grupo	n
I	Sham	12
II	LM (Lesão Muscular)	12
III	LM + PRP-RL (Plasma rico em plaquetas rico em leucócitos)	12
IV	LM + PRP-PL (Plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos)	12
V	LM + PAD1-2 (Peptídeo antagonista dos domínios 1 e 2 do receptor 1 de IL-1 $\beta$ )	12
VI	LM + PRP-RL + PAD1-2	12
VII	LM + PRP-PL + PAD1-2	12

Todos os animais (com exceção do grupo Sham) foram submetidos a anestesia com isoflurano 4% via inalatória para indução da lesão muscular pela prensa lesionadora. Vinte e quatro horas após a lesão, foi injetado sob anestesia, o PRP e/ou PAD1-2 nos grupos de trauma (II, III, IV, V, VI, VII).

O PRP aplicado, foi coletado sob anestesia por punção da cavidade cardíaca de animais adicionais, que não pertenciam ao grupo sham ou dos grupos de tratamento. Em seguida foi preparado o PRP e injetado em dose única intralesional de 0,05 mL de PRP- RL nos grupos III e VI e de 0,05 mL de PRP-PL nos grupos IV e VII. Também foi realizada a injeção de 0,05 mL do PAD1-2 no grupo V e a combinação de PRP-RL ou PRP-PL e peptídeo inibidor nos grupo VI e VII (0,05 mL de cada solução). No quinto dia após a lesão os animais foram anestesiados e eutanasiados para dissecação do gastrocnêmio, coleta e acondicionamento do músculo para análises histológicas, moleculares e bioquímicas conforme desenho experimental da figura 7.



**Figura 7**– Desenho experimental da pesquisa (Próprio Autor, 2022)

### 3.7 PROTOCOLO DE HISTOLOGIA

As amostras teciduais do gastrocnêmico direito foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 24 horas. Posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. Através da coloração de hematoxilina-eosina (H&E) foi possível quantificar o infiltrado inflamatório. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 600x, sendo capturados quatro campos oculares por corte (5 animais / grupo). As imagens foram gravadas com o auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas no software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA). A contagem do infiltrado inflamatório foi realizada através da utilização do Plugin “Cell Counter” do software considerando a coloração nuclear de células inflamatórias.

### 3.8 TESTES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS

#### 3.8.1 RT-qPCR

A análise de expressão gênica dos marcadores NF-κβ e IL-1β foi realizada através de PCR – Real Time. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol®

(Life Technologies) e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O RNA obtido foi solubilizado em 30 µl de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20°C. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria em absorbância a 260 nm e 280nm. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm estiverem entre 1,8 e 2,0. Logo após, o DNA complementar foi sintetizado através da transcriptase reversa M-MLV, que promove uma fita de DNA complementar a partir de RNA de fita simples. A parte final inclui a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, por meio do sistema do corante SYBR Green, que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação.

### **3.8.2 Marcadores Inflamatórios**

As amostras foram processadas e a placa foi sensibilizada para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) foi utilizado o método *enzyme-linked immuno absorbent assay* (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

### **3.8.3 Parâmetros de Estresse Oxidativo**

#### **3.8.3.1 Oxidantes**

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ERO de acordo com o método descrito por Lebeland e Bondy (1992).

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras serão incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). Os resultados serão calculados em µmol Nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).



### 3.8.3.2 Marcadores de Danos Oxidativos

Pelo conteúdo de proteínas oxidadas foi determinado a partir do conteúdo total de tióis na presença de DTNB (reagente de Ellman ou ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) e lido espectrofotometricamente a 412nm (Aksenov e Markesbery, 2000).

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

### 3.8.3.3 Atividades das Enzimas Antioxidantes

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm) segundo Bannister e Calabrese (1987) e os resultados expressos em U SOD/mg proteína.

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin & Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado na amostra homogeneizada após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µm de ácido 2-nitrobenzóico (5,5'- Ditiobis, reagente de Ellmans, DTNB). O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 minutos. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras (Hissin e Hilf, 1976).

### 3.8.4 Determinações do Conteúdo Proteico

O teor de proteína a partir de tecido muscular homogenizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com a técnica de Lowry (Lowry et al., 1951). O reagente Folin fenol foi adicionado para ligar-se à proteína e será lentamente reduzido passando de amarelo para azul. A absorbância foi lida a 750nm.

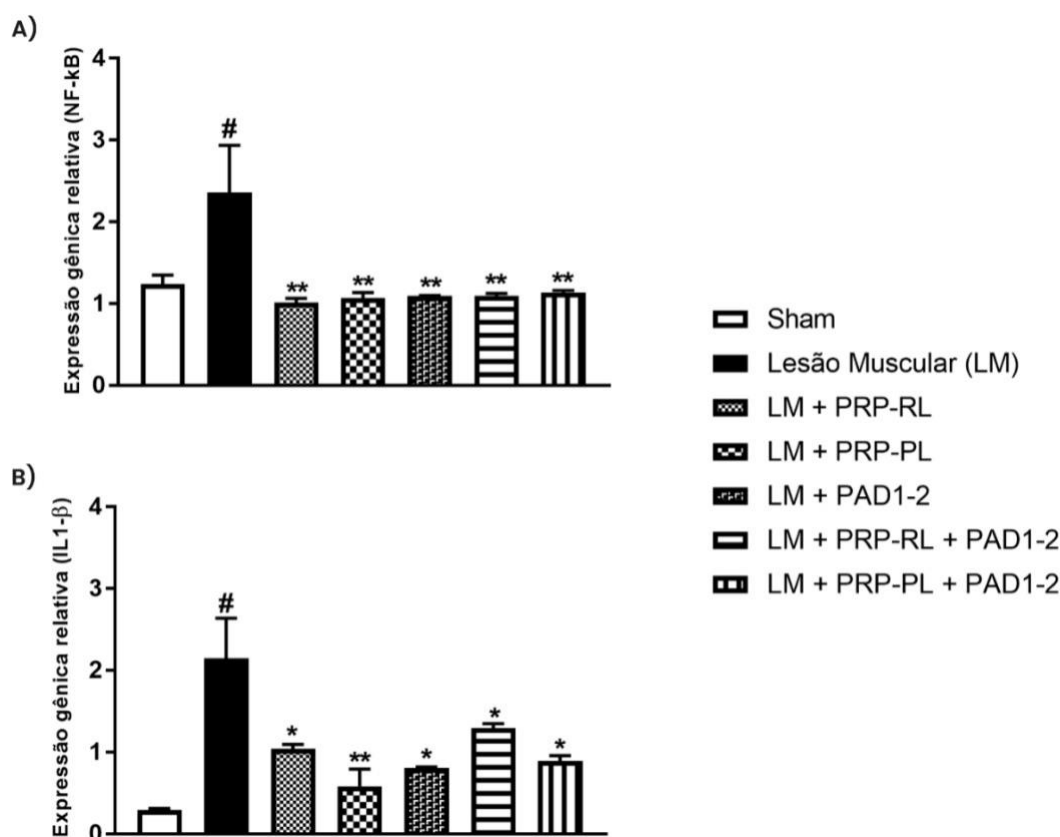
### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos em média +/- erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste *post hoc Tukey*. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de  $p < 0,05$ . Foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 7 como pacote estatístico.

## 4 RESULTADOS

### 4.8 EXPRESSÃO GÊNICA (RT-qPCR)

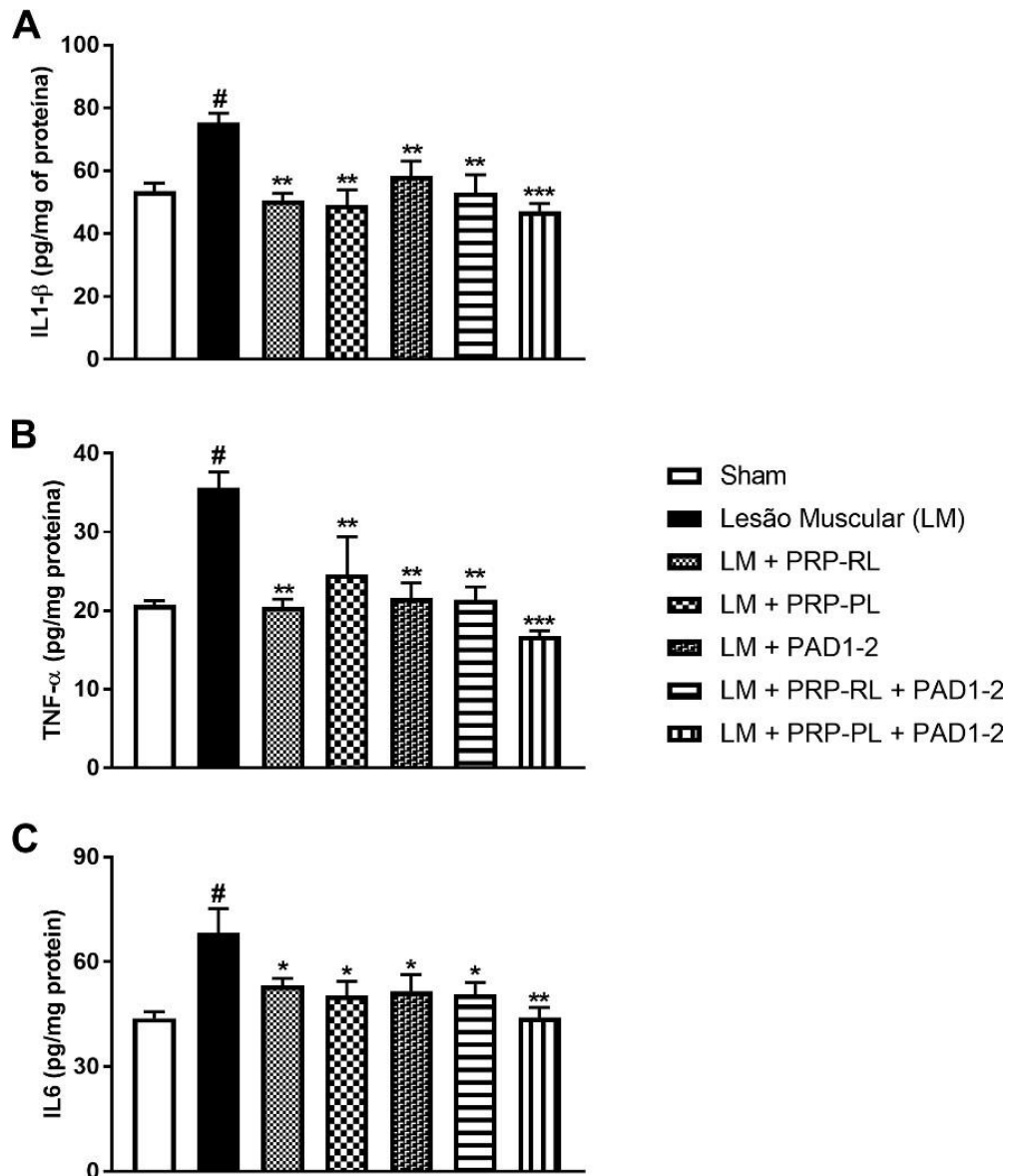
Dentre as análises realizadas, avaliou-se a estimulação da expressão gênica relacionada às proteínas NF- $\kappa$ B e IL-1 $\beta$  associadas a processos pró-inflamatórios. Na figura 8, o grupo LM apresentou aumento significativo da expressão gênica relativa de NF- $\kappa$ B (figura 8A) e IL-1 $\beta$  (figura 8B) quando comparado ao grupo controle em ambas as avaliações ( $p < 0.05$ ). Entretanto, em todos os grupos tratados houve diminuição da expressão gênica relativa de NF- $\kappa$ B ao compará-los com o grupo LM ( $p < 0.05$ , figura 8A). Da mesma maneira, quando comparado com o grupo LM, todos os grupos tratados obtiveram diminuição significativa da expressão gênica relativa de IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ , figura 8B), principalmente o grupo LM+PRP-PL ( $p < 0.01$ ).



**Figura 8** – Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre a expressão gênica relativa de NF- $\kappa$ B e IL-1 $\beta$ . Abreviações: NF- $\kappa$ B, fator nuclear kappa B; IL, interleucina. Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM em que: # $p < 0.05$  v.s grupo sham; \* $p < 0.05$  v.s grupo LM; \*\* $p < 0.01$  v.s grupo LM.

#### 4.9 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Avaliou-se também a estimulação de quadros pró-inflamatórios por meio de citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Na figura 9, os resultados apresentaram que no grupo LM houve aumento significativo de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em comparação com o grupo Sham ( $p < 0.05$ ), conforme imagens A, B e C respectivamente. Enquanto isso, nas imagens A e B, todos os grupos tratados apresentaram comportamento dos dados semelhante ao grupo controle, isto é, apresentaram diminuição significativa quando comparado com o grupo LM nas análises de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), principalmente o grupo LM + PRP-PL + PAD1-2 que apresentou maiores valores de diferença significativa nestas análises ( $p < 0.001$ ). Do mesmo modo, na imagem C, todos os grupos tratados também apresentaram diminuição significativa quando comparado com o grupo LM nas análises de IL-6 ( $p < 0.05$ ), especialmente o grupo LM + PRP-PL + PAD1-2 que apresentou maiores valores de diferença significativa ( $p < 0.01$ ).

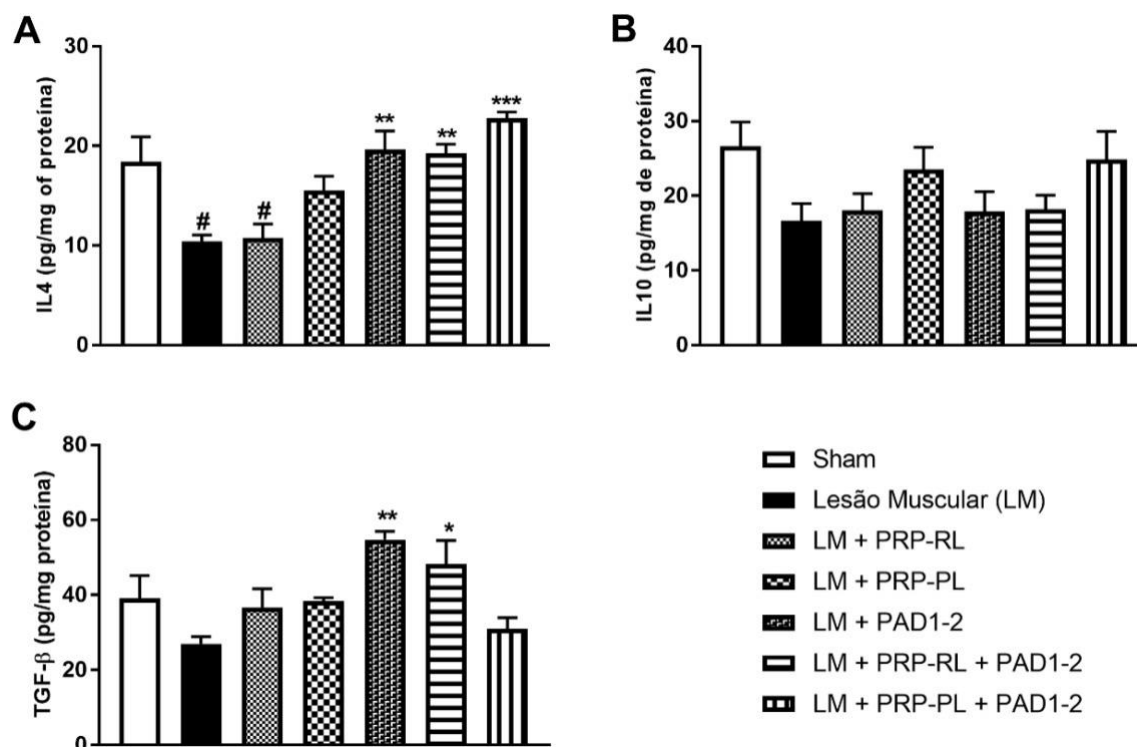


**Figura 9** – Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de citocinas pró inflamatórias. Abreviações: IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral. Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$  v.s grupo sham; \* $p < 0.05$  v.s grupo LM; \*\* $p < 0.01$  v.s grupo LM; \*\*\* $p < 0.001$  v.s grupo LM.

#### 4.10 CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS E FATOR DE CRESCIMENTO

Subsequentemente foi avaliado a estimulação de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 e o fator de crescimento TGF- $\beta$  que podem ser visualizadas na figura 10. Em A, os resultados apresentaram diminuição significativa de IL-4 no grupo LM e no grupo LM + PRP-RL em comparação com o grupo controle ( $p < 0.05$ ). No entanto, o grupo LM + PAD1-2 e grupo LM + PRP-RL + PAD1-2 apresentaram aumento significativo em comparação com o grupo LM ( $p < 0.01$ ), assim

como o grupo LM + PRP-PL + PAD1-2 que apresentou maiores valores significativos ( $p < 0.001$ ). Em C, o grupo LM + PRP-RL + PAD1-2 apresentou resultado de aumento significativo de TGF- $\beta$  em contraste com o grupo LM ( $p < 0.05$ ), além disso, o grupo LM + PAD1-2 apresentou aumento significativo ainda maior quando com o Grupo LM ( $p < 0.01$ ). Em B, não houve resultados significativos.

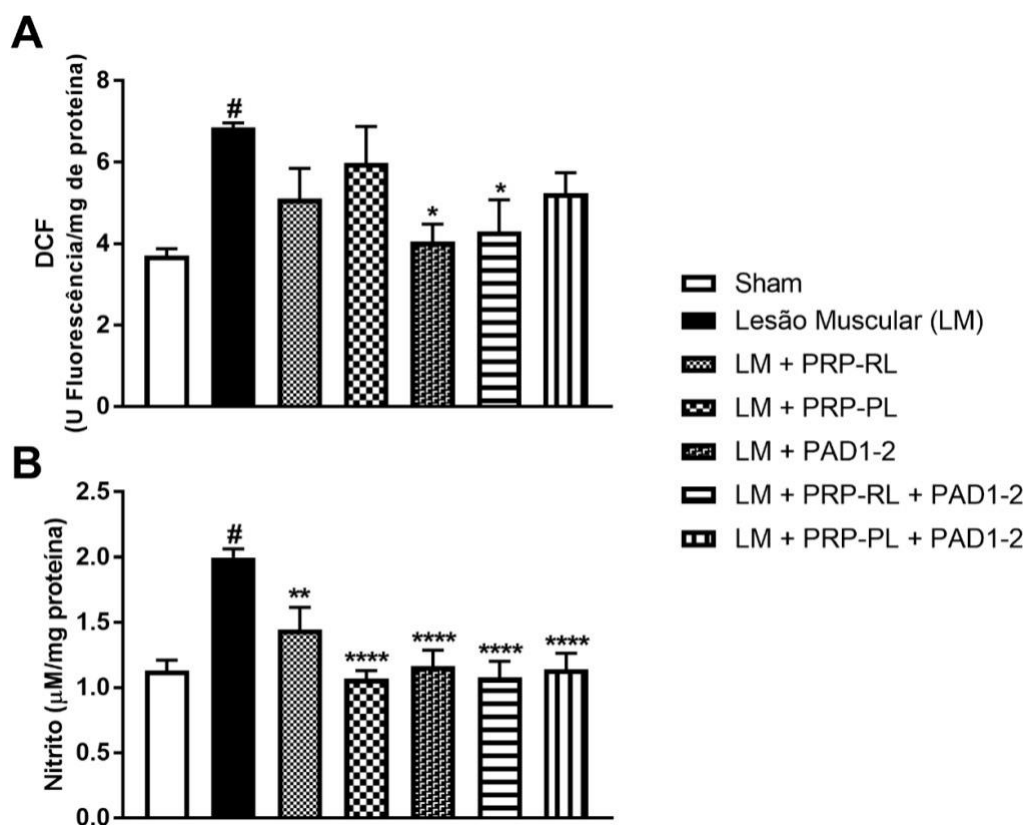


**Figura 10** - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento. Abreviações: IL, interleucina; TGF, fator de crescimento transformador. Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$  v.s grupo sham; \* $p < 0.05$  v.s grupo LM; \*\* $p < 0.01$  v.s grupo LM; \*\*\* $p < 0.001$  v.s grupo LM.

#### 4.11 OXIDANTES

Dentre os componentes para a avaliação do estresse oxidativo, avaliou-se a atividade de moléculas oxidantes conforme figura 11. Em A, o grupo LM apresentou aumento significativo de DCF em comparação ao grupo Sham ( $p < 0.05$ ). Além disso, nos grupos LM + PAD1-2 e o grupo LM + PRP-RL + PAD1-2 houve diminuição significativa de DCF em comparação ao grupo LM ( $p < 0.05$ ). Em B, o grupo LM apresentou aumento significativo de Nitrito em comparação ao grupo Sham ( $p < 0.05$ ). Enquanto isso, o grupo LM + PRP-RL indicou diminuição significativa de Nitrito quando comparado ao grupo LM ( $p < 0.01$ ) e os grupos LM + PRP-PL, LM + PAD1-2, LM +

PRP-RL + PAD1-2 e LM + PRP-PL + PAD1-2 apontaram diminuição significativa ainda maior de Nitrito em comparação ao grupo LM ( $p < 0.0001$ ).

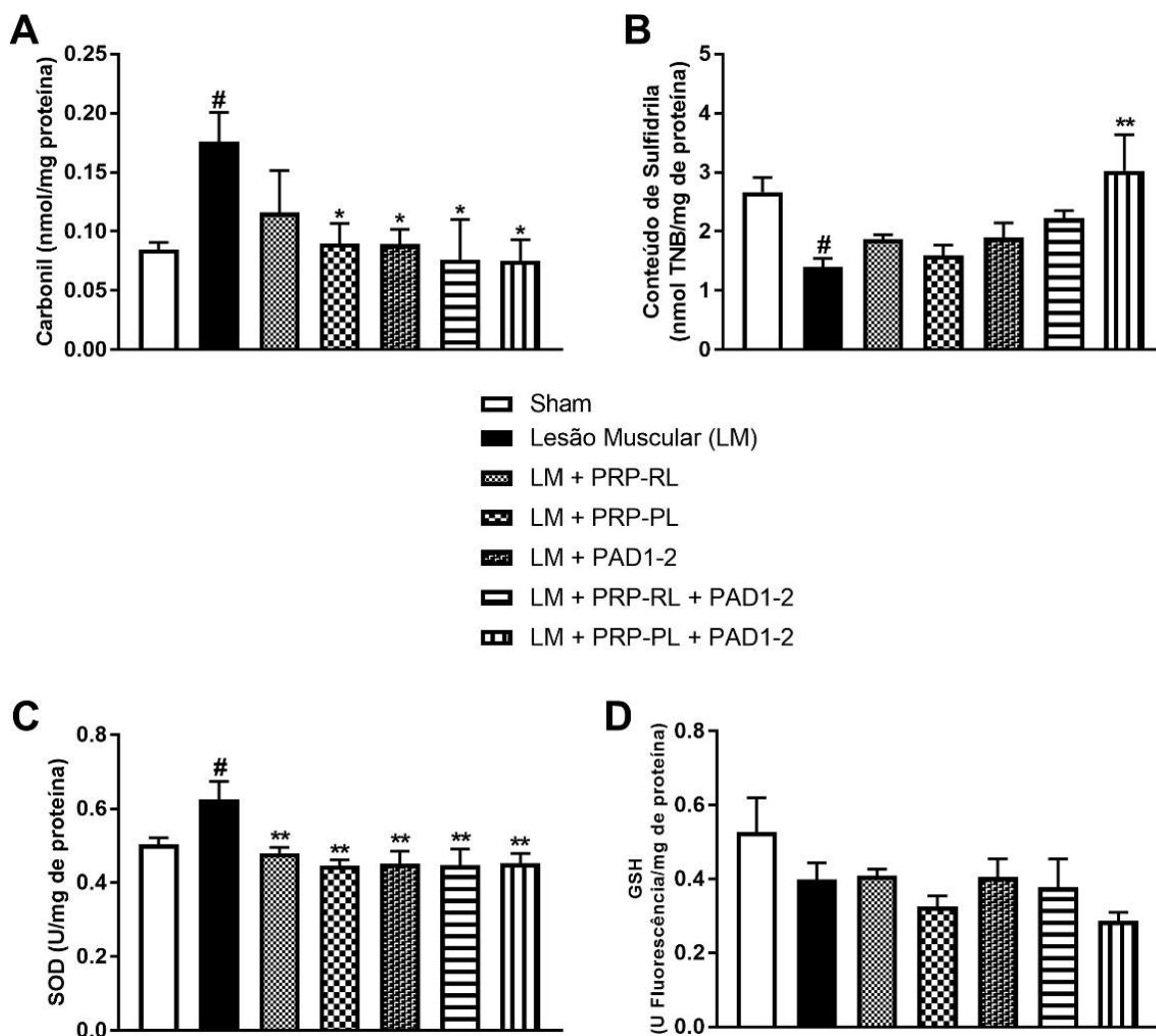


**Figura 11** - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de oxidantes. Abreviações: DCF, Diclofluoresceína. Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM em que: # $p < 0.05$  v.s grupo sham; \* $p < 0.05$  v.s grupo LM; \*\* $p < 0.01$  v.s grupo LM; \*\*\*\* $p < 0.0001$  v.s grupo LM.

#### 4.12 DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Nas demais análises dos componentes para avaliação do estresse oxidativo, avaliou-se o dano oxidativo (figura 12, A e B) e a atividade de enzimas antioxidantes (figura 12, C e D). Em A, o grupo LM obteve aumento significativo de carbonil quando comparado ao grupo Sham ( $p < 0.05$ ). Por outro lado, os grupos LM + PRP-PL, LM + PAD1-2, LM + PRP-RL + PAD1-2 e LM + PRP-PL + PAD1-2 apresentaram diminuição significativa em comparação com o grupo LM ( $p < 0.05$ ). Em B, o grupo LM manifestou diminuição significativa do conteúdo de sulfidril quando comparado ao grupo Sham ( $p < 0.05$ ). Já o grupo LM + PRP-PL + PAD1-2 apontou aumento significativo em comparação ao grupo LM ( $p < 0.01$ ). Em C, o grupo LM teve aumento significativo de SOD quando associado ao grupo Sham ( $p < 0.05$ ). Enquanto

isso, todos os grupos tratados apresentaram comportamento de dados semelhante ao grupo Sham e indicaram diminuição significativa ao compará-los com o grupo LM ( $p < 0.01$ ). Em D, não houve associações significativas.



**Figura 12** - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre os níveis de dano oxidativo e antioxidantes. Abreviações: SOD, superóxido dismutase; GSH, Glutathiona. Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM em que: <sup>#</sup> $p < 0.05$  v.s grupo sham; <sup>\*</sup> $p < 0.05$  v.s grupo LM; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  v.s grupo LM.

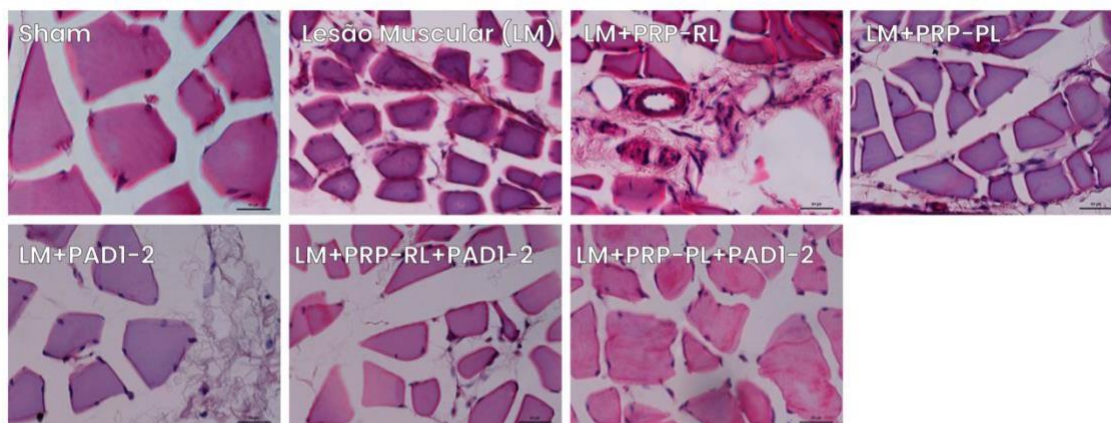
#### 4.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Nas análises histológicas da figura 13, apresenta-se na imagem A morfologia das fibras musculares com uma figura representativa de cada grupo do estudo. Em B, visualiza-se o número de células inflamatórias em que os grupos LM, LM + PRP-RL, LM + PRP-PL, LM + PRP-RL + PAD1-2 e LM + PRP-PL + PAD1-2 obtiveram aumento significativo quando comparado ao grupo Sham ( $p < 0.05$ ). Por

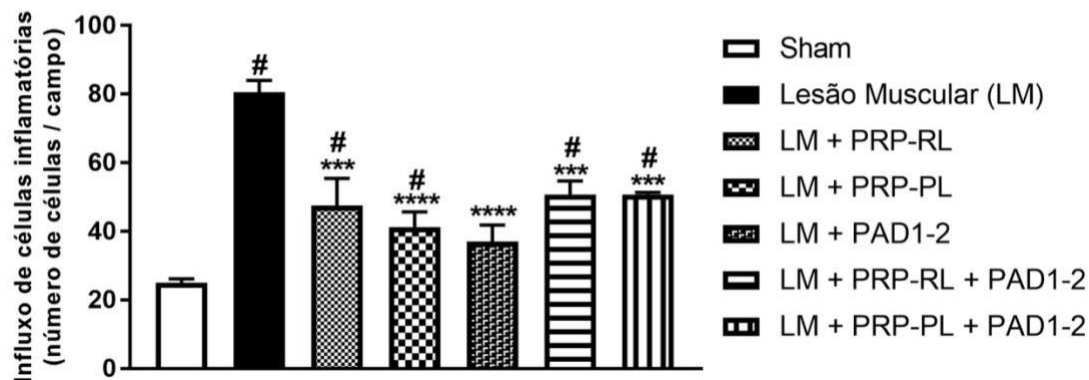


outro lado, os grupos LM + PRP-RL, LM + PRP-RL + PAD1-2 e LM + PRP-PL + PAD1-2 indicaram diminuição significativa em comparação ao grupo LM ( $p < 0.001$ ) e os grupos LM + PRP-PL e LM + PAD1-2 apresentaram diminuição significativa ainda maior quando comparado ao grupo LM ( $p < 0.0001$ ).

A)



B)



**Figura 13** - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-RL, PRP-PL e PAD1-2 sobre a análise histológica em que A), refere-se a imagem representativa do tecido muscular com a utilização de coloração H&E; B), influxo de células inflamatórias. Dados são apresentados como média  $\pm$  EPM em que: # $p < 0.05$  v.s grupo sham; \*\*\* $p < 0.001$  v.s grupo LM; \*\*\*\* $p < 0.0001$  v.s grupo LM.

## 5. DISCUSSÃO

As doenças musculoesqueléticas, em especial as lesões musculares podem ocorrer nas atividades esportivas e da vida diária, sendo frequentes na prática ortopédica e em grande proporção na população jovem. Assim como as lesões que ocorrem pelo estiramento muscular, especialmente na junção miotendínea, as lesões por trauma direto causam um desarranjo na estrutura das fibras musculares, desencadeando um processo de necrose celular com início das fases inflamatória, de reparo ou regeneração e a fase de remodelação tecidual, sendo que essas duas últimas ocorrem simultaneamente (Laurino et al., 2000; Murray et al., 2017).

Com isso, o tratamento da lesão muscular deverá levar em conta as fases da evolução do reparo tecidual, no sentido de interferir positivamente no processo biológico. Assim, o objetivo do tratamento deve ser controlar o edema e a hemorragia, minimizar o dano e diminuir a dor, com ênfase na diminuição da fibrose ou de cicatrizes pouco elásticas, que possam interferir no rendimento e futuras recidivas (Monsanto et al., 2019).

Via de regra o tratamento das lesões musculares é realizado farmacologicamente com uso de medicação analgésica, quando necessário, e por abordagem fisioterápica (Dias, 2020). Nas últimas décadas a ortobiologia tem se mostrado como recurso promissor no reparo com qualidade do tecido muscular e, entre estas técnicas, o PRP que é um concentrado de plasma contendo uma dose supra-fisiológica de plaquetas e fatores de crescimento. Há uma crescente lista de indicações do uso do PRP nas mais variadas especialidades como ortopedia, reumatologia, cirurgia plástica, dermatologia, fertilidade e reprodução, odontologia e cirurgia bucomaxilofacial (Muthu et al., 2022).

Encontra-se na literatura inúmeras técnicas de preparo de PRP, como as primeiras usadas que eram de grande complexidade e pouco práticas desestimulando o uso clínico (Marx, 2001). A busca de técnicas para a obtenção de PRP com custos menores fez surgir alguns métodos mais simples que permitem a preparação do PRP e seus subtipos (pobre e rico em leucócitos) com fácil acesso, custo muito menor e em ambiente ambulatorial, mas que necessitam de aprendizagem da técnica por parte de quem irá fazer o procedimento (Vendramin et al., 2009; Alves et al., 2018).

A dose ideal do PRP ainda é discutida na literatura, alguns trabalhos retratam a necessidade de um volume plaquetário no mínimo 3 a 5 vezes a

concentração sérica de plaquetas (Talie et al., 2015; Andriolo et al., 2018; Palakuri et al., 2020; Arumugam et al., 2021). Enquanto isso, outros autores afirmam que a melhor resposta das experimentações *in vitro* tem sido obtida com contagem de plaquetas mais próximas dos níveis séricos, ou seja, aproximadamente 2,5 vezes a concentração sanguínea, pois altas concentrações de plaquetas no PRP podem induzir efeitos negativos, como um exacerbado processo inflamatório e fibrose tecidual (Graziani et al., 2006; Muthu et al., 2022).

Subsequentemente, outro método promissor no tratamento de lesões musculares advém dos avanços da bioinformática, capaz de sintetizar peptídeos específicos como PAD1-2 baseado na molécula de IL-1RA, desenvolvido com o propósito de realizar a inibição, sem bloquear, de cascatas relacionadas à IL-1 $\beta$ , considerada uma citocina chave da inflamação local e sistêmica.

O progresso dos estudos possibilitou o entendimento do papel patológico da IL-1 $\beta$  na inflamação em diferentes doenças. Além disso, estudos que abordaram o bloqueio da atividade da IL-1 $\beta$  possibilitaram a observação do papel da inflamação em doenças que antes não eram consideradas inflamatórias, como diabetes tipo II e insuficiência cardíaca (Dinarello et al., 2013; Abbate et al., 2020; Martin et al., 2021; Supino et al., 2022).

Apesar de todos os benefícios encontrados, esses tratamentos ainda carecem de maiores análises e o uso do PRP-RL ou PRP-PL ainda gera algumas controvérsias pelas indicações clínicas específicas e em quais condições eles atuam, especialmente em relação à sua efetividade. Devido a isso, este estudo se propôs a investigar e ratificar, ou não, quais as respostas do PRP-RL e PRP-PL isoladamente e em associação com o PAD1-2, que é uma proteína inibidora de IL-1 $\beta$ , atóxica e de baixo custo (Zaccaron, 2021; De Pieri, 2022). Além disso, verificar se o uso destas substâncias pode minimizar ou não o processo inflamatório inicial que poderia favorecer um melhor processo de reparo tecidual. Desta forma, foi realizada a análise de diversos parâmetros, dentre eles, avaliou-se a expressão gênica do NF-kB e da IL-1 $\beta$  que demonstra o processo pelo qual a informação contida nos genes (a sequência do DNA) gera produtos gênicos que são as moléculas de RNA e as proteínas (Tarnowski et al., 2021).

Nesta análise, todos os grupos com tratamento isolado e combinado mostraram efetividade na redução significativa da expressão gênica de NF-kB e IL-

1 $\beta$ , estando estes achados de acordo com o perfil anti-inflamatório descrito na literatura (Barnes, 1997; Moussa et al., 2017; Oliveira, 2017). Destaca-se também que o grupo PRP-PL possuiu efetividade ainda maior para atenuar a expressão gênica de IL-1 $\beta$  que pode estar alinhada tanto com o seu papel precursor de estímulos anti-inflamatório, quanto com a menor quantidade de leucócitos na sua composição, confirmado inclusive, pelo menor influxo de células inflamatórias.

Avaliou-se também importantes citocinas associadas a estados pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e estados anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) (Busslinger et al., 2014). Entre os mecanismos de expressão que possam elucidar os resultados encontrados nas citocinas pró-inflamatórias, destaca-se aquele onde, após o trauma, os leucócitos migram para o sítio da lesão e subsequentemente secretam citocinas inflamatórias, que além de ativar os macrófagos M1, aumentam a permeabilidade local e aceleram a resposta inflamatória pelas células fagocitárias atuantes no tecido lesado (Jarvinen et al., 2005).

Assim, a lesão muscular decorrente do trauma é capaz de produzir estas respostas que foram avaliadas pela dosagem das citocinas pró-inflamatórias, onde verificou-se um aumento significativo de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no grupo LM e em todas as formas de tratamento ocorreu uma menor expressão das mesmas, com destaque para a atuação da combinação PRP-PL + PAD1-2. Tal fato pode neste trabalho se justificar por uma menor oferta de leucócitos do PRP-PL associado com a presença do PAD1-2, que por sua vez, conforme observado na literatura, amplifica a ação da diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Borrione et al., 2014; Oh et al., 2015; Pochini et al., 2016; Moussa et al., 2017; Tsai et al., 2018). Da mesma maneira como já ocorreu na expressão gênica do NF- $\kappa$ B e IL-1 $\beta$ , houve uma expressiva diminuição do quadro inflamatório inicial favorecendo a reparação da lesão (Tidball e Villalta, 2010).

Subsequentemente, com o término da fagocitose e da liberação de citocinas pró-inflamatórias, inicia transição para a fase de reparo, com regeneração das fibras musculares e produção de tecido cicatricial conectivo. Nesta etapa ocorre a liberação de citocinas anti-inflamatórias que irão ativar as células satélites quiescentes permitindo estimular a proliferação e a expressão dos fatores de transcrição muscular como o MyoD e Myf5 que estão em estado inativo. Os macrófagos M2a ativados pela IL-4 e os M2c pela IL-10, que reduz a ação dos macrófagos M1,

estão presentes na fase regenerativa promovendo remodelação tecidual com síntese de matriz extracelular e liberação de fatores de crescimento (Busslinger et al., 2014; Tidball, 2017).

Desta forma, entende-se que os tratamentos com PRP, conforme aumento significativo nos níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, indicam uma condição que induz ao conseqüente aumento dos níveis de proteínas, vários fatores reguladores miogênicos e que teoricamente podem acelerar o processo de reparo tecidual (Dimauro et al., 2014).

Nos grupos tratados com PAD1-2, PRP-RL + PAD1-2 e PRP-PL + PAD1-2 houve um aumento da concentração de IL-4 comparado com o grupo LM, isto é, naqueles onde houve utilização da PAD1-2 isolada ou associada, o inibidor atuou como protagonista para a liberação das citocinas anti-inflamatórias, ratificando sua ação na inibição do processo inflamatório e tendo como coadjuvante o PRP que ao controlar ação dos macrófagos M2, reduzindo resposta inflamatória, aparentemente amplificou o efeito da PAD1-2. Este achado está de acordo com trabalhos que referem que o PRP-PL aumentou o receptor CD206 em macrófagos humanos, regula a função dos macrófagos M2, induz à redução da inflamação e danos, além de que as preparações do PRP contendo baixa quantidade de leucócitos podem controlar a polarização dos macrófagos, realizando uma estimulação mais efetiva na mudança de macrófagos M1 para M2 (Hammond et al., 2009; Nasirzade et al., 2019; Palakuri et al., 2020).

Em relação a expressão de IL-10, os macrófagos M2c são as principais células secretoras desta citocina, entretanto a característica fenotípica de macrófagos M1 para M2 durante o processo inflamatório encontra-se normalmente entre o 8º e 10º dia (Kuninaka et al., 2022). Desta forma acredita-se que no 5º dia, quando foi realizada a coleta, estes macrófagos ainda estivessem em alternância, o que justificaria não encontrarmos dados significativos neste momento. Todavia, é importante destacar que mesmo assim, os dados apresentam uma tendência ao aumento desta citocina nos grupos LM + PRP-PL e LM + PRP-PL + PAD1-2, entrando em acordo com a literatura que caracteriza os efeitos anti-inflamatórios do PRP (Ehrenfest et al., 2012; Martins et al., 2016; Tsai et al., 2018; Chellini et al., 2019; Everts et al., 2020).

O presente estudo também avaliou o TGF- $\beta$ , ao qual faz parte de uma família multifuncional de citocinas que desempenha papel importante no crescimento e desenvolvimento, como anti-inflamatórias, no estímulo à reparação tecidual e

imunidade do hospedeiro. Os efeitos autócrinos e parácrinos dos TGF- $\beta$  podem ser modificados pela matriz extracelular, células vizinhas e outras citocinas. Inibe a produção de IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  além de induzir IL-1RA também impedindo que os macrófagos sintetizem NO (Clark et al., 1998).

Desta forma, o TGF- $\beta$  demonstrou modular os efeitos das citocinas inflamatórias, incluindo a capacidade de diminuir a transcrição do receptor de IL-1 $\beta$ , possivelmente por promover a síntese do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), corroborando com a literatura que relata maiores efeitos anabólicos e anti-inflamatórios da TGF- $\beta$  ao inibir a inflamação mediada por IL-1 $\beta$  (Zigler et al., 2019). Porém alguns autores destacam que esta capacidade pode ser sobrecarregada por um excesso de leucócitos (McLennan et al., 2002; Kelc et al., 2015; Wong et al., 2015; Contreras et al., 2017). Salienta-se também que alguns trabalhos citam diferenças significativas na concentração de TGF- $\beta$  no preparo do PRP-RL e PRP-PL, relatando concentração significativamente maior de TGF- $\beta$  no PRP-RL (Sundmann, 2011; Dimauro et al., 2014).

Isto posto, os resultados do estudo mostraram um aumento na expressão do TGF- $\beta$  nos grupos LM + PAD1-2 e LM + PRP-RL + PAD1-2, enquanto os demais grupos tratados mostraram-se semelhantes aos níveis do grupo Sham. Durante o processo de reparo tecidual, a literatura descreve o pico desta citocina por volta do 6º dia, com decréscimo subsequente (Kuninaka et al., 2022), portanto ao injetar isoladamente o PRP-RL e PRP-PL, com plaquetas que estimulam a liberação de fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ , supõe-se que o pico da curva de ação desta citocina tenha sido antecipado e estaria relacionado à fase de decréscimo. Em contrapartida, o aumento no grupo tratado apenas com o PAD1-2, pode ser resposta ao curso natural de pico do TGF- $\beta$  conforme relatado em estudos anteriores (Sundmann et al., 2011; Dimauro et al., 2014 Kuninaka et al., 2022).

Quanto aos grupos com tratamento combinado, no resultado apresentado pelo grupo LM + PRP-RL + PAD1-2 deduz-se que o PRP-RL também tenha causado efeito de antecipar o pico de ação desse fator de crescimento, porém mediante a ação anti-inflamatória do PAD1-2 (De Pieri, 2022), pode ter favorecido a permanência de níveis aumentados detectados ainda no 5º dia. Por outro lado, no grupo LM + PRP-PL + PAD1-2 acredita-se o mesmo cenário do grupo combinado relatado anteriormente, porém com o advento de que, pelo PRP-PL conter menor quantidade de fatores de crescimento (Denapoli et al., 2016; Miroshnychenko et al., 2017), o pico

de ação desta citocina tenha sido antecipado, mas não prolongado o suficiente para alcançar o quinto dia.

Ademais, é bem difundido na literatura que a lesão muscular com alto grau de inflamação também pode resultar no acúmulo de ERO e ERN. Evidências demonstram que a lesão muscular aumenta a geração de ERO por vários mecanismos sendo os principais o aumento na produção de superóxido mitocondrial, a ativação do complexo NADPH oxidase pela intensa fagocitose e a ativação da xantina oxidase por isquemia/reperfusão (Konig et al., 2001; Puntel et al., 2010; Kanta et al., 2011). Na ocorrência de processo inflamatório exacerbado com produção de ERO constante e elevada, os sistemas antioxidantes podem se tornar insuficientes e esta situação de desequilíbrio acarreta estresse oxidativo, o que provoca danos em biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Halliwell et al., 2007, Pizzino et al., 2017).

Em razão do exposto, neste trabalho analisou-se a produção de oxidantes, atividade do sistema antioxidante e dano oxidativo. Quanto aos oxidantes, foi avaliado os níveis de ERO e ERN como NO e DCF. Todavia, salienta-se que como NO é uma molécula gasosa, avaliou-se seu subproduto, o nitrito, que é quantificável pelas técnicas colorimétricas (Chae et al., 2004).

NO está comumente aumentada nas inflamações, pois no sistema imune quando os macrófagos são estimulados produzem grandes quantidades de NO por meio da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para combater microrganismos e realizar o desbridamento tecidual. Porém o aumento exagerado do NO pode causar diversos danos às estruturas celulares levando à apoptose ou necrose celular com consequente aumento e prolongamento do processo inflamatório, retardando o processo de reparação (Biswas, 2016).

Assim, como esperado mediante todo o processo inflamatório decorrente do modelo de lesão muscular, na análise do nitrito houve um aumento significativo no grupo LM, enquanto todos os grupos tratados apresentaram diminuição significativa, principalmente nos grupos lesão muscular tratados com PRP-PL, PAD1-2, PRP-RL + PAD1-2 e PRP-PL + PAD1-2, atuando de forma mais eficaz no controle do processo inflamatório e consequente dano oxidativo. Desta forma pode-se afirmar que o uso do PAD1-2 e do PRP-PL associado ou isolado se mostraram eficazes no controle da ERN.

Já na análise de DCF, os grupos LM + PAD1-2 e LM + PRP-RL + PAD1-2 foram aqueles que obtiveram o melhor controle da ERO, provavelmente relacionado

ao bloqueio mais específico da IL-1 $\beta$  tanto pela própria ação do PAD1-2 (De Pieri, 2022), quanto do maior número de TGF- $\beta$  no PRP-RL, associado à estimulação de IL-1RA (Sundmann et al., 2011; Dimauro et al., 2014).

Ademais, o desequilíbrio do sistema redox representa um risco, pois pode induzir a modificação de proteínas que se tornam frágeis e mais susceptíveis à degradação proteica (Martins et al., 2016). Os marcadores de dano oxidativo carbonil e sulfidrilas foram os parâmetros avaliados a fim de determinar o grau do dano celular ocorrido na lesão provocada e nos grupos de tratamento. O teor da proteína carbonil apresentou níveis basais praticamente em todos os grupos tratados, exceto no grupo LM + PRP-RL. Tal situação pode ser justificada pelo maior número de leucócitos decorrente da própria natureza do preparo de PRP-RL (Palakuri et al., 2020), ocasionando assim maior aporte de células inflamatórias no local da lesão que pode ter permitido maior expressão do marcador de dano oxidativo carbonil, predispondo a uma demora para o início da fase regenerativa, ao contrário do que ocorreu nos demais grupos tratados.

Dando sequência, a maioria das proteínas plasmáticas possuem resíduos de cisteína (com grupamentos sulfidrilas livres), que podem ser oxidados pela ação das espécies reativas desempenhando, portanto, um papel de proteção no plasma. Dessa forma, a quantificação da concentração plasmática dos grupamentos sulfidrilas fornece uma ideia do nível de agressão oxidativa às proteínas plasmáticas medindo o conteúdo de proteínas oxidadas ou inativação das proteínas (Child et al., 1999). Nesta análise, o grupo tratado com PRP-PL + PAD1-2 obteve um aumento significativo em relação ao grupo LM demonstrando uma oxidação atenuada das proteínas, muito próximo dos níveis do grupo sem lesão muscular. Este cenário pode ser atribuído ao menor aporte de leucócitos e na ação da PAD1-2 no controle inflamatório com menor agressão proteica no foco da lesão (Sundmann et al., 2011; Dimauro et al., 2014; De Pieri, 2022).

Quanto às proteções ou sistemas antioxidantes do organismo contra as ERO e ERN, estes ocorrem pela proteção enzimática como a superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPX), que estão entre as principais ações antioxidantes e representam as macromoléculas que podem atuar minimizando o dano oxidativo (Scandalius, 2005).

Neste estudo, em especial a SOD, demonstrou aproximação aos níveis de atividade basal em todos os grupos de tratamento, com a possibilidade de que as



intervenções realizadas, mediante suas características anti-inflamatórias até então apresentadas, possam atuar na ativação do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), considerado um dos mais importantes reguladores da resposta antioxidante do organismo, sendo um mecanismo de importância crítica para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular (Tohidnezhad et al., 2014; Borrione et al., 2015; Hahn, et al., 2017).

Na análise histológica no grupo LM houve aumento nas células inflamatórias, que é compatível com a literatura, representando uma grande significância na intensidade de migração do influxo destas células. Por outro lado, todos os grupos tratados apresentaram redução significativa do influxo de células inflamatórias, especialmente aqueles com tratamento isolado de PRP-PL ou PAD1-2 que mostraram um controle ainda maior. Desta maneira, este achado ratifica novamente a ação inibitória deste peptídeo antagonista além do PRP-PL que apresentou novamente um efeito positivo no controle do processo inflamatório.

Em todos os parâmetros avaliados no estudo, os achados se mostraram pertinentes com a literatura que descreve a atuação celular na fisiologia da reparação tecidual. No tratamento de uma lesão, como ocorre após um trauma muscular, têm-se por objetivo regular a alternância dos fenótipos M1 e M2, além da regulação das demais células inflamatórias. Por consequência, objetiva-se controlar o processo inflamatório prolongado. Com isso, os grupos de tratamento PRP-PL isolado ou o PRP-PL + PAD1-2 se destacaram entre as demais modalidades terapêuticas na redução de parâmetros como na expressão gênica de IL-1 $\beta$ , de todas as citocinas pró-inflamatórias, de IL-4, em ambos os marcadores oxidantes (DCF e Nitrito), no dano relacionado à sulfidril e na diminuição no influxo das células inflamatórias.

Tal fato possivelmente ocorreu devido a um maior equilíbrio do PRP-PL entre a quantidade de leucócitos e plaquetas. Deduz-se que o menor número de leucócitos do composto não foi suficiente para ocasionar um desbalanço de estímulo pró-inflamatório no local da lesão. Em contrapartida, o concentrado de plaquetas estimulou um perfil anti-inflamatório, especialmente por meio de fatores de crescimento que auxiliam na modulação do processo inflamatório e reparação tecidual. Além disso, em conjunto com o PAD1-2, realizou-se um importante mecanismo de atenuação da IL-1 $\beta$ , sem extingui-la, amenizando os processos de sinalização subjacentes desta citocina, ou seja, nesta terapia combinada houve um efeito amplificado em que se obteve melhores resultados de modulação do processo

inflamatório e reparo tecidual, mostrando-se um tratamento promissor para a lesão muscular.

## 6. CONCLUSÃO

Levando em consideração os aspectos indicados neste estudo, pode-se apontar que o uso tanto do PRP-PL quanto principalmente do PRP-PL + PAD1-2, conseguiu melhores resultados no 5º dia do trauma contusional. O uso de ambos levou a resultados positivos em praticamente todos os parâmetros avaliados, ou seja, menor expressão gênica do NF- $\kappa$ B e IL-1 $\beta$ , menor influxo de células inflamatórias, diminuição das citocinas pró-inflamatórias, aumento das citocinas anti-inflamatórias e controle do estresse oxidativo. Estes achados indicam a possibilidade de uma fase inflamatória mais atenuada e um processo de transição para a fase regenerativa no reparo da lesão muscular mais efetiva. Com isso, é possível afirmar que estes compostos com relativo baixo custo, são tratamentos promissores nas lesões musculares *in vivo*.

Salienta-se ainda que não foi encontrado na literatura estudos que tratem da eficácia do PRP-PL associado a um peptídeo inibidor da IL-1 $\beta$  nas lesões musculares agudas, fazendo deste um estudo pioneiro na área.

Por fim, estudos adicionais com outros modelos de lesão muscular são necessários para aumentar a evidência no uso dessas terapias no tecido muscular estriado. Além disso, sugere-se também avaliar outros mecanismos que participam do reparo tecidual como a polarização de macrófagos por imunohistoquímica, quantificar células satélites responsáveis pela proliferação e diferenciação, metabolismo do colágeno e aspectos funcionais como dor e marcha.

## REFERÊNCIAS

A Hamid MS, Mohamed Ali MR, Yusof A, George J, Lee LP; Platelet-rich plasma injections for the treatment of hamstring injuries: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med.* 2014 Oct;42(10):2410-8. doi: 10.1177/0363546514541540. Epub 2014 Jul 29. Erratum in: *Am J Sports Med.* 2015 May;43(5):NP13. PMID: 25073598.

Abat F, Valles S-L, Gelber P-E, Polidori F, Jorda A, Garcias-Herreros S, Monllau J-C, Sanchez-Ibañez. An experimental study of muscular injury repair in a mouse model of notexin-induced lesion with EPI technique. *BMC Sports Science, Medicine, and Rehabilitation.* 2015; 7 (7): 1-7.

Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van-Tasseli BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2020;126:1260-1280.

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology.* 1984; 105:121-126.

Alves, R., and Grimalt, R.: A review of platelet-rich plasma: history, biology, mechanism of action, and classification. *Skin Appendage Disord* 4, 18, 2018

Andia, I., Maffulli, N. (2018). New biotechnologies for musculoskeletal injuries. *The Surgeon.* doi: 10.1016/j.surge.2018.08.004

Andriolo L, Altamura SA, Reale D, Candrian C, Zaffagnini S, Filardo G. Nonsurgical Treatments of Patellar Tendinopathy: Multiple Injections of Platelet-Rich Plasma Are a Suitable Option: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Sports Med.* 2019 Mar;47(4):1001-1018. doi: 10.1177/0363546518759674. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29601207.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul-Aug;14(4):529-35. PMID: 10453668.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3):141-5.

Arvind V, Huang AH. Reparative and Maladaptive Inflammation in Tendon Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Jul 19; 9:719047. doi: 10.3389/fbioe.2021.719047. PMID: 34350166; PMCID: PMC8327090.

Arumugam S, Prakash A, Janani G, Vignesh M, Anjanavannan MM, Perumal S, Alwar T. Platelet-Rich Plasma (PRP) Injection in Sports Injuries. *Indian J Orthop.* 2021 Jan 21;55(2):484-491. doi: 10.1007/s43465-020-00349-3. PMID: 33927829; PMCID: PMC8046674.

Babior, B. M. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, p. 141-155, 1997.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for sod. Meth Biochem Anal. 1987; 32:279-312.

Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. J Signal Transduct. 2012;2012:982794. doi: 10.1155/2012/982794. Epub 2011 Dec 5. PMID: 22175016; PMCID: PMC3235811.

Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. Int J Biochem Cell Biol. 1997 Jun;29(6):867-70. doi: 10.1016/s1357-2725(96)00159-8. PMID: 9304801.

Barreiros, André L. B. S.; David, Jorge M.; David, Juceni P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, 29(1), 113–123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021

Bertoletti B, Raiser AG, Schalemberg MD, Krause A, Do Amaral AS, Da Silva CB, Pohl VH, Soares AV, Schossler JE. Protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) em gatos - Estudo piloto. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; 2014; 12(41); 1- 637.

Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? Oxid Med Cell Longev. 2016; 2016:5698931. doi: 10.1155/2016/5698931. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26881031; PMCID: PMC4736408.

Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. Blood Rev 2009; 23:177–189.

Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. Semin Immunol. 2013 Dec 15;25(6):394-407. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.023. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24246227.

Borrione P., Grasso L., Chierito E., Geuna S., Racca S., Abbadessa G., Ronchi G., Faiola F., Di Gianfrancesco A., Pigozzi F. Experimental model for the study of the effects of platelet-rich plasma on the early phases of muscle healing. *Blood Transfus.* 2014;12: s221–s228

Borrione P, Grasso L, Racca S, Abbadessa G, Carriero V, Fagnani F, Quaranta F, Pigozzi F. Systemic effects of locally injected platelet rich plasma in a rat model: an analysis on muscle and bloodstream. J Biol Regul Homeost Agents 2015; 29:251

Braun H.J., Kim H.J., Chu C.R., Dragoo J.L.:The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy. Am J Sports Med 2014; 42:1204–1210.

Busslinger M, Tarakhovsky A. Epigenetic control of immunity. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Jun 2;6(6): a019307.

Butterfield, D.A.: Encyclopedia of Neuroscience || Mitochondrial Dysfunction in Nervous System Injury. 2009, 887–894. doi:10.1016/b978-008045046-9.00506-4

Cavallo C, Fillardo G, Mariani E. Comparison of Platelet-Rich Plasma formulations for cartilage healing. J Bone Joint Surg Am 96: 423-429, 2014.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by cross-linked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004; 25:843–850.

Chellini F, Tani A, Zecchi-Orlandini S, Sassoli C. Influence of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on Endogenous Mechanisms of Skeletal Muscle Repair/Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 5;20(3):683. doi: 10.3390/ijms20030683. PMID: 30764506; PMCID: PMC6387315.

Child R, Brown S, Day S, Donnelly A, Roper H, Saxton J. Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin Sci (Lond)*. 1999 Jan;96(1):105-15. PMID: 9857113.

Cianforlini M, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Chiurazzi E, Piani M, Orlando F, Provinciali M, Gigante A. EFFECT OF PLATELET RICH PLASMA CONCENTRATION ON SKELETAL MUSCLE REGENERATION: AN EXPERIMENTAL STUDY. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 Oct-Dec;29(4 Suppl):47-55. PMID: 26652490.

Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Mar;30(3):293-8. doi: 10.1016/s1357-2725(97)00128-3. PMID: 9611771

Collins T, Alexander D, Barkatali B. Platelet-rich plasma: a narrative review. *EFORT Open Rev*. 2021 Apr 1;6(4):225-235. doi: 10.1302/2058-5241.6.200017. PMID: 34040800; PMCID: PMC8142058.

Contreras-Muñoz P, Torrella JR, Serres X, Rizo-Roca D, De la Varga M, Viscor G, Martínez-Ibáñez V, Peiró JL, Järvinen TAH, Rodas G, Marotta M. Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats But Are Not Synergistic When Combined. *Am J Sports Med*. 2017 Jul;45(9):2131-2141. doi: 10.1177/0363546517702864. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28453295.

Das, A.; Sinha, M.; Datta, S.; Abas, M.; Cha E, S.; Sen, C.K.; Roy, S. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *Am. J. Pathol*. 2015, 185, 2596–2606.

Denapoli PM, Stilhano RS, Ingham SJ, Han SW, Abdalla RJ. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing. *Am J Sport Med* 2016; 44: 1962-1971

De Pieri, E. Predição *in silico* e validação *in vitro* de peptídeos antagonistas do receptor IL1-β. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2022.

Dias, J.C. 2020. Caracterização e prevenção das lesões de uma equipe de futebol profissional. *Revista Brasileira Multidisciplinar – ReBraM*. 21, 3 (jun. 2020). DOI:<https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2018.v21i3.625>.

Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi S, Fantini C, Mercatelli N, Racca S, Geuna S, Gianfrancesco A, Caporossi D, Pigozzi F, Borrione P. Platelet-rich plasma and skeletal muscle healing: a molecular analysis of the phases of the regeneration process in an

experimental animal model. *PloS One*; 2014;9(7): e102993.

Dinarello CA, Van-Der-Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*. 2013;25: 469–484.

Dohan D.M.E, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009 Mar;27(3):158-67. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009. Epub 2009 Jan 31. PMID: 19187989.

Dragoo J.L., Braun H.J., Durham J.L.: Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med* 2012; 40:1274–1281.

Drose, S; Brandt, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*.2012. 748 145-69

Ehrenfest, D.M.D.; Bielecki, T.; Mishra, A.; Borzini, P.; Inchingolo, F.; Sammartino, G.; Rasmusson, L.; Everts, P.A. In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2012, 13, 1131–1137

Eiserich, J. P.; Cross, C. E.; Jones, A. D.; Halliwell, B.; Vliet, A. V; *J. Biol. Chem*.1996 271, 19199.

Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 21;21(20):7794. doi: 10.3390/ijms21207794. PMID: 33096812; PMCID: PMC7589810.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890 –898, 1998.

Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol* 166: 6847–6854, 2001.

Ferrante, C.J.; Leibovich, S.J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv. Wound Care* 2012, 1, 10–16.

Flohé L, Gunzler W. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*.1984; 105: 114-21.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back To The Future. *Immunity*. 2013; 39:1003-1018

Gautam VK, Verma S, Batra S, Bhatnagar N, Arora S. Platelet-Rich Plasma versus

Corticosteroid Injection for Recalcitrant Lateral Epicondylitis: Clinical and Ultrasonographic Evaluation. *J Orthop Surg.* 2015;23(1):1–5.

Grambart ST. Sports medicine and platelet-rich plasma: nonsurgical therapy. *Clin Podiatr Med Surg.* 2015 Jan;32(1):99-107. doi: 10.1016/j.cpm.2014.09.006. PMID: 25440421.

Grassi A, Napoli F, Romandini I, Samuelsson K, Zaffagnini S, Candrian C, Filardo G. Is Platelet-Rich Plasma (PRP) Effective in the Treatment of Acute Muscle Injuries? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* 2018 Apr;48(4):971-989. doi: 10.1007/s40279-018-0860-1. PMID: 29363053.

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Apr;17(2):212-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01203.x. PMID: 16584418

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(2):619-624.

Glezer, Isaias et al. O fator de transcrição NF-kappaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Brazilian Journal of Psychiatry* [online]. 2000, v. 22, n. 1 [Acessado 19 Novembro 2022], pp. 26-30. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000100008>>. Epub 17 Out 2000. ISSN 1809-452X.

Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997; 18:2714-2723

Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet.* 2000 Apr 1;355(9210):1179-80. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02075-4. PMID: 10791396.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine.* 4<sup>a</sup> ed. New York. 2007; University Press.

Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 2009 Jun;37(6):1135-42. doi: 10.1177/0363546508330974. Epub 2009 Mar 12. PMID: 19282509; PMCID: PMC3523111.

Hahn GF, Oliveira JRd, Bock PM. O papel do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. *Clinical and Biomedical Research.* 2017;37(3)

Hersant B, Sid-Ahmed M, Braud L, Jourdan M, Baba-Amer Y, Meningaud JP, Rodriguez AM. Platelet-Rich Plasma Improves the Wound Healing Potential of Mesenchymal Stem Cells through Paracrine and Metabolism Alterations. *Stem Cells Int.* 2019 Oct 31; 2019:1234263. doi: 10.1155/2019/1234263. PMID: 31781232; PMCID: PMC6875194.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced



glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74(1):214-26.

Hyldahl, Robert D.; Hubal, Monica J. (2014). Lengthening our perspective: Morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. *Muscle & Nerve*, 49(2), 155—170. doi:10.1002/mus.24077

Hudgens, J.L., Sugg, K.B., Grekin, J.A., Gumucio, J.P., Bedi, A., and Mendias, C.L. Platelet-rich plasma activates proinflammatory signaling pathways and induces oxidative stress in tendon fibroblasts. *Am J Sports Med* 44, 1931, 2016.

Jarvinen T.A.H, Jarvinen T.L.N., Kaariainen M.: Biology of muscle trauma. *Am J Sports Med* 2005; 33:745-766.

Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev.* 2011; 63:218-42.

Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin- 1 in general pathology. *Inflamm Regen.* 2019; 39:12-28.

Kelc R, Trapecar M, Gradisnik L, Rupnik MS, Vogrin M. Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF- $\beta$  inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro. *PLoS One.* 2015 Feb 13;10(2): e0117302. doi: 10.1371/journal.pone.0117302. PMID: 25679956; PMCID: PMC4332503

Kuninaka Y, Ishida Y, Ishigami A, Nosaka M, Matsuki J, Yasuda H, Kofuna A, Kimura A, Furukawa F, Kondo T. Macrophage polarity and wound age determination. *Sci Rep.* 2022 Nov 25;12(1):20327. doi: 10.1038/s41598-022-24577-9. PMID: 36434083.

Lana JF, Huber SC, Purita J, Tambeli CH, Santos GS, Paulus C, Annichino-Bizzacchi JM. Leukocyte-rich PRP versus leukocyte-poor PRP - The role of monocyte/macrophage function in the healing cascade. *J Clin Orthop Trauma.* 2019 Oct;10(Suppl 1): S7-S12. doi: 10.1016/j.jcot.2019.05.008. Epub 2019 May 13. PMID: 31700202; PMCID: PMC6823808.

Laurino C.F.S, Lopes A.D., Mano K.S., Cohen M., Abdalla R.J.: Lesões musculoesqueléticas no atletismo. *Rev Bras Ortop* 2000;35: 364-8.

Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology.* 1990; 186:464-478.

Li H, Hicks JJ, Wang L, Oyster N, Philippon MJ, Hurwitz S, Hogan MV, Huard J. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor  $\beta$ 1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials.* 2016 May; 87:147-156. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.017. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26923362.

Liu, S.; Zhou, J.; Zhang, X.; Liu, Y.; Chen, J.; Hu, B.; Song, J.; Zhang, Y. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 982. <https://doi.org/10.3390/ijms17060982>

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951; 193:265-275.

Lynch SE, Astilla GR, Williams RC, et al: The effects of short-term application of a combination of platelet- derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 62:458-467, 1991.

Kanta, J. (2011). "The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing." *Acta Medica (Hradec Kralove)* 54(3): 97-101.

König, D., K. H. Wagner, I. Elmadfa and A. Berg (2001). "Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress." *Exerc Immunol Rev* 7: 108-133.

Machado-de-Ávila RA, Velloso M, Oliveira D, Stransky S, Flor-Sá A, Schneider FS, Neshich G, Chávez-Olórtegui C. Induction of Neutralizing Antibodies against Mutalysin-II from *Lachesis muta* Snake Venom Elicited by a Conformational B Cell Epitope Predicted by Blue Star Sting Data Base. *Immunome Research*. 2014; 11:1-6.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization *Trends Immunol*,2004;25(12):677-689.

Margato GF, Andrade EF, Lara PHS, Pagura JR, Cohen M, Arliani GG. Estudo prospectivo das lesões musculares em três temporadas consecutivas do Campeonato Brasileiro de Futebol. *Rev Bras Ortop*. 2020;55(6):687-94.

Martin P, Goldstein JD, Mermoud L, Diaz-Barreiro A, Palmer G. IL-1 Family Antagonists in Mouse and Human Skin Inflammation. *Front Immunol*. 2021; 12:652846.

Martins RP, Hartmann DD, de Moraes JP, Soares FA, Puntel GO. Platelet-rich plasma reduces the oxidative damage determined by a skeletal muscle contusion in rats. *Platelets*. 2016 Dec;27(8):784-790. doi: 10.1080/09537104.2016.1184752. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27255146.

Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001; 10(4):225-8.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(6):638-46.

Matsuo M, Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. *Free Radicals in Exercise and Aging* Champaign. Human Kinetics. 2001; 78: 1-33

McLennan IS, Koishi K. The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol*. 2002;46(4):559-67. PMID: 12141444.

Meheux C.J., McCulloch P.C., Lintner D.M., Varner K.E., Harris J.D: Efficacy of intra-articular platelet-rich plasma injections in knee osteoarthritis: a systematic review. *Arthroscopy* 2016; 32:495–505.

Merrifield RB. Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*1969; 32:221-296.

Middleton KK, Barro V, Muller B, Terada S, Fu FH. Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *Iowa Orthop J.* 2012; 32:150-163.

Miroshnychenko O, Chang WT, Dragoo JL. The Use of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma to Enhance Differentiation of Skeletal Myoblasts: Implications for the Use of Autologous Blood Products for Muscle Regeneration. *Am J Sports Med* 2017; 45: 945-953

Monsanto J, Tomás N, Andrade, Barbosa J, Ângelo C. Muscular Injury Approach: Healing Phases, Conservative Treatment and Therapeutic Options. *Revista da SPMFR I Vol 31 I N° 3 I Ano 27* (2019)

Moussa, M., Lajeunesse, D., Hilal, G., et al.: Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res* 352, 146, 2017

Mueller-Wohlfahrt H, Haensel L, Mithoefer K, et al. Terminology and classification of muscle injuries in sport: The Munich consensus statement. *British Journal of Sports Medicine* 2013; 47:342-350.

Murray IR, Geeslin AG, Goudie EB, Petrigliano FA, LaPrade RF. Minimum information for studies evaluating biologics in orthopaedics (MIBO): platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2017;99(10):809-819.

Muthu S, Krishnan A, Ramanathan KR. Standardization and validation of a conventional high yield platelet-rich plasma preparation protocol. *Ann Med Surg (Lond).* 2022 Sep 13; 82:104593. doi: 10.1016/j.amsu.2022.104593. PMID: 36268335; PMCID: PMC9577528.

Naik, S., Larsen, S., Gomez, N. *et al.* Inflammatory memory sensitizes skin epithelial stem cells to tissue damage. *Nature* 550, 475–480 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature24271>

Nasirzade J, Kargarpour Z, Hasannia S, Strauss FJ, Gruber R. Platelet-rich fibrin elicits an anti-inflammatory response in macrophages in vitro. *J Periodontol.* 2020 Feb;91(2):244-252. doi: 10.1002/JPER.19-0216. Epub 2019 Sep 14. PMID: 31376159; PMCID: PMC7065136.

Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaya MS. [Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice]. *Mol Biol (Mosk).* 2019 Sep-Oct;53(5):741-754. Russian. doi: 10.1134/S0026898419050136. PMID: 31661475.

Nilsson, S.K. and Quesenberry, P.J. (1998). Stem Cell Systems: Basic Principles and Methodologies. In Stem Cell Biology and Gene Therapy (eds P.J. Quesenberry, G.S. Stein, B.G. Forget and S.M. Weissman).

Oh, J.H., Kim, W., Park, K.U., and Roh, Y.H. Comparison of the cellular composition and cytokine-release kinetics of various platelet-rich plasma preparations. *Am J Sports Med* 43, 3062, 2015

Oliveira, D.C. Proinflammatory cytokines gene expression. Control mediated by IL-10. Participation of IL-10 on inflammatory response exerted by glutamine and dietary restriction. 2017, 125f. (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

Page S, Powell M. Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1381: 191-202

Palakuri S, Muthu S: Does leucocyte concentration have a role in the outcome of PRP therapy for lateral epicondylitis – A randomized controlled trial. *IP Int J Orthop Rheumatol* 2020;6(2):84-87

Paraboni MLR, Kalinoski J, Braciak BG, Wilk AE, Santos LS, Schmitt EG, et al. Protein carbonyl products, malondialdehyde, glutathione and vitamins C/E of breast cancer patients subjected to chemotherapy. *Braz J Oncol.* 2022;18: e-20220302

Parrish, W.R. Physiology of Blood Components in Wound Healing: An Appreciation of Cellular Co-Operativity in Platelet Rich Plasma Action. *J. Exerc. Sports Orthop.* 2017, 4, 1–14.

Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Med (Wars).* 2016 Aug 12;11(1):242-247. doi: 10.1515/med-2016-0048. PMID: 28352802; PMCID: PMC5329835.

Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* 2001; 36:1083-1091. Perrault DP, Bramos A, Xu X, Shi S, Wong AK. A administração local de antagonista do receptor de interleucina-1 melhora a cicatrização de feridas diabéticas. *Ann Plast Surg.* 2018;80;17-21.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS biology.* 2020;18(7):e3000410.

Pinho RA, Haupenthal DP, Fauser PE, Thirupathi A, Silveira PCL. Gold Nanoparticle-Based Therapy for Muscle Inflammation and Oxidative Stress. *J Inflamm Res.* 2022;15:3219-3234 <https://doi.org/10.2147/JIR.S327292>

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28819546; PMCID: PMC5551541.

Plachokova, A.S. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* 2008; 19, 539–545

Pochini A.C., Antonioli E., Bucci D.Z., Sardinha L.R., Andreoli C.V., Ferretti M., Ejnisman B., Goldberg A.C., Cohen M. Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns. *Einstein.* 2016;14:391–397. doi: 10.1590/S1679-45082016AO3548

Pontual, M. A. B.; Magini, R. S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento; das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2004.

Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 2011 Apr;1(2):941-69. doi: 10.1002/cphy.c100054. PMID: 23737208; PMCID: PMC3893116.

Puntel GO, Carvalho NR, Amaral GP, Lobato LD, Silveira SO, Daubermann MF, Barbosa NV, Rocha JB, Soares FA. Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free Radic Res.* 2011 Feb;45(2):125-38. doi: 10.3109/10715762.2010.517252. Epub 2010 Oct 13. PMID: 20942569.

Quarteiro, M. L., Tognini, J. R. F., de Oliveira, E. L. F., & Silveira, I. (2015). O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 50(5), 586–595.

Rea, I.M.; Gibson, D.S.; McGilligan, V.; McNerlan, S.E.; Alexander, H.D.; Ross, O.A. Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines. *Front. Immunol.* 2018, 9, 586.

Rezende P., Vieira W.; Souza, P.V.S ; Oliveira, ASB . Normal muscle structure, growth, development, and regeneration. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, v. 8, p. 176-181, 2015

Rice-Evans, C.; Miller, Nicholas; P., George. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas DSC, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, González J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(7): 704-13.

Robbins patologia básica. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Robbins, S. L.; Cotran R.S.; Kumar, V.

Röszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediat. Inflamm.* 2015, 2015, 816460.

Rubinstein, N. A., oKelly, A. M. (2004). The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In A. Engel & C.Franzini-Armstrong (Eds.), *Myology: Basic and*

clinical (3rd ed., pp. 87–101). McGraw-Hill.

Sabarish R, Lavu V, Rao SR. A comparison of platelet count and enrichment percentages in the platelet rich plasma (PRP) obtained following preparation by three different methods. *J Clin Diagn Res* 2015;9: ZC10–ZC12.

SantAnna JPC, Pedrinelli A, Hernandez AJ, Fernandes TL. Muscle Injury: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*. 2022 Jan 20;57(1):1-13. doi: 10.1055/s-0041-1731417. PMID: 35198103; PMCID: PMC8856841.

Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Jul;38(7):995-1014. doi: 10.1590/s0100-879x2005000700003. Epub 2005 Jul 4. PMID: 16007271.

Seow D, Shimosono Y, Tengku TNB, Yasui Y, Massey A, Kennedy JG. Platelet-Rich Plasma Injection for the Treatment of Hamstring Injuries: A Systematic Review and Meta-analysis With Best-Worst Case Analysis. *Am. J. Sports Med.* 2020. 036354652091672. doi:10.1177/0363546520916729

Silveira PC, DA Silva LA, Tromm PT, Scheffer DDA, De Souza CT, Pinho RA. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide phonophoresis on oxidative stress parameters after injury induced by eccentric exercise. *Ultrasonics*. 2012; 52(5):650-4.

Silvers-Granelli HJ, Cohen M, Espregueira-Mendes J, Mandelbaum B. Hamstring muscle injury in the athlete: state of the art. *J ISAKOS*. 2021 May;6(3):170-181. doi: 10.1136/jisakos-2017-000145. Epub 2020 Nov 12.

Solakoglu Ö, Heydecke G, Amiri N, Anitua E. The use of plasma rich in growth factors (PRGF) in guided tissue regeneration and guided bone regeneration. A review of histological, immunohistochemical, histomorphometrical, radiological and clinical results in humans. *Ann Anat.* 2020 Sep; 231:151528. doi: 10.1016/j.aanat.2020.151528. Epub 2020 May 4. PMID: 32376297.

Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2011 Oct;39(10):2135-40. doi: 10.1177/0363546511417792. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21846925.

Supino D, Minute L, Mariancini A, Riva F, Magrini E, Garlanda C. Negative Regulation of the IL-1 System by IL-1R2 and IL-1R8: Relevance in Pathophysiology and Disease. *Front Immunol.* 2022; 13:84-96.

Talaie T, Pratt SJP, Vanegas C, Xu S, Henn RF 3rd, Yarowsky P, Lovering RM. Site-specific targeting of platelet-rich plasma via superparamagnetic nanoparticles. *Orthop J Sports Med.* 2015 Jan 22;3(1):2325967114566185. doi: 10.1177/2325967114566185. PMID: 25664326; PMCID: PMC4316754.

Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, Liu X,

Zweier JL. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300:388-96.

Tarnowski M, Kopytko P, Piotrowska K. Epigenetic Regulation of Inflammatory Responses in the Context of Physical Activity. *Genes (Basel)*. 2021 Aug 25;12(9):1313. doi: 10.3390/genes12091313. PMID: 34573295; PMCID: PMC8465911.

Tarnowski M, Tomasiak P, Tkacz M, Zgutka K, Piotrowska K. Epigenetic Alterations in Sports-Related Injuries. *Genes (Basel)*. 2022 Aug 17;13(8):1471. doi: 10.3390/genes13081471. PMID: 36011382; PMCID: PMC9408207.

Thor, A. et al. (2007) Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 36, 1164–1171

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005; 288 (2) pp. R345-R353.

Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(5):1173-87.

Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Mar;17(3):165-178. doi: 10.1038/nri.2016.150. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28163303; PMCID: PMC5452982.

Tohidnezhad M, Wruck CJ, Slowik A, Kweider N, Beckmann R, Bayer A, Houben A, Brandenburg L O, Varoga D, Sönmez TT, Stoffel M, Jahr H, Lippross S, Pufe T. Role of platelet-released growth factors in detoxification of reactive oxygen species in osteoblasts. *Bone* 2014; 65:69

Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med*. 2003 Aug;37(4):284-6. doi: 10.1136/bjism.37.4.284. PMID: 12893707; PMCID: PMC1724680.

Tsai WC, Yu TY, Chang GJ, Lin LP, Lin MS, Pang JS. Platelet-Rich Plasma Releasate Promotes Regeneration and Decreases Inflammation and Apoptosis of Injured Skeletal Muscle. *Am J Sports Med*. 2018 Jul;46(8):1980-1986. doi: 10.1177/0363546518771076. Epub 2018 May 17. PMID: 29772187.

Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cir Plást*. 2009;24(2):212–8.

Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18: 482–496, 2009.

Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med*

Assoc. 2018 Feb;81(2):94-101. doi: 10.1016/j.jcma.2017.11.002. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29169897.

Wasterlain, A. S.; Braun, H. J.; Harris, A. H. S.; Kim, H.-J.; Dragoo, J. L. (2013). *The Systemic Effects of Platelet-Rich Plasma Injection. The American Journal of Sports Medicine*, 41(1), 186–193. doi:10.1177/0363546512466383

Woodell-May JE, Sommerfeld SD. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2020 Feb;38(2):253-257. doi: 10.1002/jor.24457. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31469192.

Wong S, Ning A, Lee C, Feeley BT. Return to sport after muscle injury. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2015; 8:168-15. doi:10.1007/s12178-015-9262-2

Wynn, T.A.; Vannella, K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 2016, 44,450–462.

Yazigi Junior, J. A., dos Santos, J. B. G., Xavier, B. R., Fernandes, M., Valente, S. G., & Leite, V. M. (2015). Quantification of platelets obtained by different centrifugation protocols in SHR rats. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, 50(6), 729–738.

Yu Ty, Pang JS, Lin LP, Cheng JW, Liu SJ, Tsai WC. Platelet-Rich Plasma Releasate Promotes Early Healing in Tendon After Acute Injury. *Orthop J Sports Med*. 2021 Apr 20;9(4):2325967121990377.

Zaccaron, Rubya Pereira. Efeito de um peptídeo inibidor de il-1 $\beta$  associado à fotobiomodulação no reparo tecidual de feridas diabéticas. 2021. 56 F. Dissertação (Mestrado) - Curso De Ciências Da Saúde, Unesc, Criciúma, 2021.

Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, Bourne PE, Bui HH, Buus S, Frankild S, Greenbaum J, Lund O, Lundegaard C, Nielsen M, Ponomarenko J, Sette A, Zhu Z, Peters B. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Res*. 2008;1(36):513-518.

Ziegler CG, Van Sloun R, Gonzalez S, Whitney KE, De Phillippo NN, Kennedy MI, Dornan GJ, Evans TA, Huard J, La Prade RF. Characterization of Growth Factors, Cytokines, and Chemokines in Bone Marrow Concentrate and Platelet-Rich Plasma: A Prospective Analysis. *Am J Sports Med*. 2019 Jul;47(9):2174-2187. doi: 10.1177/0363546519832003. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31034242.

Ziemkiewicz N, Hilliard G, Pullen NA, Garg K. The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in Skeletal Muscle Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 23;22(6):3265.