

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

LUIZ FERNANDO SILVEIRA PARRELA

**EFEITOS DO USO ISOLADO OU ASSOCIADO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS E ÁCIDO HIALURÔNICO NO CONTROLE DO
PROCESSO INFLAMATÓRIO NA LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA**

CRICIÚMA

2023

LUIZ FERNANDO SILVEIRA PARRELA

**EFEITOS DO USO ISOLADO OU ASSOCIADO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS E ÁCIDO HIALURÔNICO NO CONTROLE DO
PROCESSO INFLAMATÓRIO NA LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA**

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

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P259e Parrela, Luiz Fernando Silveira.

Efeitos do uso isolado ou associado do plasma rico em plaquetas e ácido hialurônico no controle do processo inflamatório na lesão muscular traumática / Luiz Fernando Silveira Parrela. - 2023.

57 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Músculos - Ferimentos e lesões - Tratamento.
2. Plasma rico em plaquetas. 3. Ácido hialurônico.
4. Inflamação. 5. Estresse oxidativo. 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 424

Com início às 8 (oito) horas e 30 (trinta) minutos do dia 19 (dezenove) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 227/Bloco S o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **LUIZ FERNANDO SILVEIRA PARRELA**, sob a orientação do **Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**, intitulada “**EFEITOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ASSOCIADO AO ÁCIDO HIALURÔNICO NA LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Gislaine Tezza Rezin (Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovado. Com 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 10h (dez) horas e 30 (trinta) minutos, 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, 19 (dezenove) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Assistente Administrativo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a UNIFEBE pela idealização do mestrado e pelo incentivo. A minha família pelo amor incondicional e encorajamento contínuo. Também sou grato ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira pela sua orientação paciente e valiosos insights ao longo deste processo. Por fim, expresso minha gratidão aos meus colegas de laboratório do Grupo Proteção e Reparo Tecidual pelo apoio mútuo, em especial a Mateus Cardoso Colares, Ligia Milanez Venturini, João Bittencourt e Camila Costa. Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de todos vocês.

RESUMO

As lesões musculares apresentam grande importância pela sua alta prevalência e pelo seu impacto social e econômico levando ao afastamento do trabalho e dos esportes. A resposta inflamatória e as espécies reativas de oxigênio produzidas no processo de recuperação tecidual, caso não controladas em sua fase inicial, podem produzir um quadro de cronicidade com reparo tecidual inadequado e, conseqüente, comprometimento da força e função muscular. O plasma rico em plaquetas (PRP) obtido do sangue autólogo, é utilizado por conter uma concentração de plasma com grande quantidade de plaquetas que contém em seu interior os fatores de crescimento, fundamentais no processo de cicatrização e revascularização do tecido muscular. O ácido hialurônico (AH) atua como modulador de interações proteína-proteína, atividade enzimática e transporte de moléculas de sinalização e estabelece uma matriz extracelular competente para integração de sinais que direcionarão as células satélites musculares para sair da quiescência. O objetivo deste trabalho é de avaliar a ação do PRP pobre em leucócitos (PRP-PL) e do AH de baixo peso molecular (AH-BPM) e se a associação destes pode controlar o processo inflamatório inicial pós-lesão muscular induzida nos ratos. O desenho experimental foi traçado da seguinte forma: primeiramente, seis ratos foram submetidos à punção cardíaca para retirada de 7 mL de sangue para obtenção do PRP. Após essa etapa, foram utilizados 60 ratos Wistar machos divididos em cinco grupos de doze animais: grupo I- Sham; grupo II- Lesão Muscular (LM); grupo III- LM + PRP; grupo IV- LM + AH; grupo V- LM + PRP + AH. A lesão muscular foi induzida com o modelo animal de trauma por prensa no gastrocnêmio dos animais, produzido sob anestesia. No quinto dia foi realizada eutanásia por decapitação em guilhotina e dissecação do gastrocnêmio. Parâmetros histológicos avaliaram infiltrados inflamatórios e por RT-PCR foi avaliada a expressão gênica de CD11c e CD206, que são receptores expressos em macrófagos M1 e M2, respectivamente. Por ELISA foram avaliados os níveis proteicos de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10). Também foi avaliada por espectrofotômetro a produção de oxidantes, defesa antioxidante e danos oxidativos (NO, DCF, SOD, GSH, Carbonil e Sulfidril). As análises mostraram que houve controle do processo inflamatório inicial sugerindo antecipação da fase regenerativa nos grupos de tratamento com destaque para o grupo tratado com PRP + AH. Neste grupo foi observado maior regulação dos parâmetros de estresse oxidativo e atenuação da resposta inflamatória ao dano tecidual com redução das citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias. Desta forma, conclui-se que a intervenção associada do PRP com AH representa maiores benefícios no tratamento da lesão muscular.

Palavras-chave: lesão muscular; plasma rico em plaquetas; ácido hialurônico; inflamação; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Muscle injuries are of great importance due to their high prevalence and their social and economic impact, leading to absence from work and sports. The inflammatory response and reactive oxygen species produced in the tissue recovery process, if not controlled in its initial phase, may produce a chronic condition with inadequate tissue repair and, consequently, impairment of muscle strength and function. Platelet-rich plasma (PRP), obtained from autologous blood, is used because it contains a concentration of plasma with a large number of platelets that contain growth factors, essential in the healing process and revascularization of muscle tissue. Hyaluronic acid (AH) acts as a modulator of protein-protein interactions, enzymatic activity and transport of signaling molecules and establishes a competent extracellular matrix for the integration of signals that will direct muscle satellite cells to exit quiescence. The aim of present study was to evaluate the action of leukocyte-poor PRP (PRP-PL) and low molecular weight HÁ (AH-BPM) and whether their combination may control the initial inflammatory process after muscle injury induced in rats. The experimental design was outlined as follows: first, six rats underwent cardiac puncture to remove 7 mL of blood to obtain PRP. After this stage, 60 male Wistar rats were used, divided into five groups of twelve animals: group I- Sham; group II- Muscle Injury (LM); group III- LM + PRP; group IV- LM + AH; group V- LM + PRP + AH. Muscle injury was induced with the animal model of trauma by pressing on the animals gastrocnemius, produced under anesthesia. On the fifth day, euthanasia was performed by guillotine decapitation and gastrocnemius dissection. Histological parameters evaluated inflammatory infiltrates and by RT-PCR the gene expression of CD11c and CD206 was evaluated, which are receptors expressed in M1 and M2 macrophages, respectively. By ELISA, protein levels of pro and anti-inflammatory cytokines (TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL4, IL6 and IL10) were evaluated. The production of oxidants, antioxidant defense and oxidative damage (NO, DCF, SOD, GSH, Carbonyl and Sulfhydryl) was also evaluated by spectrophotometer. The analyzes showed that there was control of the initial inflammatory process, suggesting anticipation of the regenerative phase in the treatment groups, especially the group treated with PRP + HA. In this group, greater regulation of oxidative stress parameters and attenuation of the inflammatory response to tissue damage were observed, with a reduction in pro-inflammatory cytokines and an increase in anti-inflammatory cytokines. Therefore, it is concluded that the intervention associated with PRP and AH represents greater benefits in the treatment of muscle injury.

Keywords: muscle injury; platelet-rich plasma; hyaluronic acid; inflammation; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ativação dos macrófagos pela via clássica e alternativa	17
Figura 2 - Geração, remoção e papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) na lesão celular	20
Figura 3 - Sinalização dos receptores de ácido hialurônico e seu envolvimento nas funções celulares e teciduais.....	25
Figura 4 - Mecanismo de trauma muscular.....	29
Figura 5 - Extração do sangue por punção cardíaca	30
Figura 6 - Desenho experimental da pesquisa	32
Figura 7 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre a análise histológica de influxo de células inflamatórias	36
Figura 8 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre a expressão gênica relativa de CD11c e CD206	37
Figura 9 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de citocinas pró inflamatórias	38
Figura 10 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento.....	39
Figura 11 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de oxidantes.....	40
Figura 12 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de dano oxidativo e antioxidantes.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de crescimento e citocinas presentes no PRP e suas respectivas funções no reparo tecidual	22
Tabela 2 - Descrição dos Grupos	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
AKT	Proteína Quinase B, do inglês Protein kinase B
CAT	Catalase
CS	Células satélites
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FAP	Fator fibroadipogênico
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GPx	Glutathione Peroxidase
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IFN γ	Interferon Gama
IGF1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IKK	Complexo I κ B Quinase
IKb	Indutor do Fator Kappa B
IL	Interleucina
M1	Macrófagos tipo 1
M2	Macrófagos tipo 2
MCF1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MEC	Matriz extra-celular
MEF2	Potenciador Específico de Miócito
MMP	Metaloproteinase de matriz
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
Nos	Óxido Nítrico Sintase

NFkB	Fator Nuclear Kappa B, do inglês Factor Nuclear Kappa B
O ₂	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PRx	Peroxirredoxinas
SOD	Superóxido Dismutase
TLR	Receptor tool like
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TGF α	Fator de Transformação de Crescimento α
TGF β	Fator de Transformação de Crescimento β
VEGF	Fator de Crescimento Vascular endotelial
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
GSH	Glutationa
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 LESÃO MUSCULAR	14
1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA LESÃO MUSCULAR	15
1.3 LESÃO MUSCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO	19
1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	21
1.5 ÁCIDO HIALURÔNICO NA LESÃO MUSCULAR	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MÉTODOS	28
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	28
3.2 ANIMAIS	28
3.3 MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA.....	29
3.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	30
3.5 ÁCIDO HIALURÔNICO DE BAIXO PESO MOLECULAR	31
3.6 DESENHO EXPERIMENTAL	31
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	32
3.8 TESTES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS	32
3.8.1 Expressão gênica (RT-qPCR)	32
3.8.2 Marcadores Inflamatórios (ELISA)	33
3.8.3 Parâmetros de estresse oxidativo	34
3.8.3.1 Oxidantes.....	34
3.8.3.2 Marcadores de Danos Oxidativos	34
3.8.3.3 Atividades das Enzimas Antioxidantes.....	35
3.8.4 Determinações do Conteúdo Proteico	35
3.9 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS	35
4. RESULTADOS	36
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	36
4.2 EXPRESSÃO GÊNICA (RT-QPCR)	36
4.3 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	37
4.4 CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS E FATOR DE CRESCIMENTO	38
4.5 OXIDANTES	39
4.6 DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES	40

5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 LESÃO MUSCULAR

As lesões musculares estão entre as mais comuns, representando aproximadamente 10 a 55% de todas as lesões esportivas, podendo ser causadas por contusões, estiramentos, lacerações e outros mecanismos (Jarvinen et al., 2007). Essas lesões correspondem a aproximadamente 40% de todas as lesões no futebol e 25% daquelas que levam ao afastamento do esporte, sendo 15 a 20% recorrentes (Ekstrand et al., 2011). No levantamento de peso, as lesões musculares representam até 59% das injúrias (Aasa et al., 2017). Qualquer esporte que exija grandes esforços, especialmente na força de contração excêntrica, pode predispor os atletas recreativos, amadores e profissionais a desenvolver lesões em decorrência de uma grande exigência física, que pode ou não estar associada a fatores de risco como excesso de jogos e treinos, alta demanda emocional e a presença de lesões prévias (Hyldahl et al., 2014).

Atualmente, são descritos diversos sistemas de classificação para as lesões musculares, classicamente são descritos 3 diferentes níveis: leves (grau I), moderadas (grau II) e graves (grau III) a partir de avaliação por imagem (Takebayashi et al., 1995; Peetrons 2002) ou dos aspectos clínicos revelados (Hernandez, 1996). A classificação denominada Consenso de Munique considera também aspectos etiológicos e classifica a lesão muscular em funcional (não estrutural) ou estrutural (Mueller-Wohlfahrt et al., 2013).

O diagnóstico da lesão muscular inicia-se com uma história clínica detalhada do trauma, seguida por um exame físico com a inspeção e palpação dos músculos envolvidos, assim como os testes de função com e sem resistência externa (Fernandes et al., 2009). O diagnóstico é fácil quando uma típica história de contusão muscular é acompanhada por um evidente edema ou uma equimose distal à lesão. Exames de imagem como ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética provêm informações úteis para se verificar e determinar a lesão com maior precisão (SantAnna et al., 2022).

Apesar dos enormes avanços da medicina nas últimas décadas, o tratamento das lesões musculares pouco mudou e ainda consiste na utilização do protocolo PRICE (proteção, repouso, gelo, compressão e elevação do membro

afetado), medicamentos e fisioterapia para analgesia, alongamento muscular e fortalecimento (Manning e Levy, 2006). No caso de lesões musculares leves, essas modalidades de tratamento são satisfatórias. No entanto, lesões musculares moderadas e graves geralmente levam ao afastamento prolongado dos esportes e tendem a formar grandes áreas de tecido fibrótico no local da lesão que podem levar à perda de força e função, além de aumentar as chances de uma nova lesão (Huard et al., 2016).

Outro fator relevante é que nenhum desses tratamentos aborda os principais problemas de lesão muscular que são a perda de células e a formação de tecido cicatricial. Além disso, os tratamentos de rotina não melhoram o número, proliferação e diferenciação das células satélites (Andrade et al., 2015). Portanto, é importante concentrar esforços para desenvolver novos tratamentos que promovam uma recuperação mais rápida e completa após lesões musculares com melhora da função e menor reincidência.

Nos últimos anos, tratamentos que utilizam componentes celulares do próprio corpo humano, denominados ortobiológicos vêm sendo estudados com resultados iniciais promissores nas patologias musculoesqueléticas. Dentre esses destacam-se o PRP e o AH como alternativa para tratamento de lesões musculares (Sampson, 2014; Nakka et al., 2021; George et al., 2019).

1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA LESÃO MUSCULAR

A lesão muscular aguda é decorrente de um trauma que pode causar contusão, estiramento ou ruptura da fibra muscular, enquanto as lesões crônicas são resultado de microtraumas de repetição associados a sobrecarga do tecido miotendíneo. O processo de reparo e regeneração tecidual é compartilhado entre os diferentes tipos de tecidos moles, apesar de apresentar diferenças cronológicas na duração de cada fase e na interação entre mediadores inflamatórios (Middleton et al., 2012). As fases do processo de reparação tecidual podem ser divididas em três, sendo a primeira a fase inflamatória, que duraria de três a sete dias. Em seguida, a fase de regeneração, com duração da segunda semana até a quarta e sexta semana após o dano tecidual e na sequência a fase de remodelação que pode durar de três a seis meses após a lesão (Tidball et al., 2010).

Após a injúria do tecido muscular ocorre desestruturação do sarcômero, dando início a cascata da coagulação e hemostasia. Com a formação do hematoma ocorre migração de mediadores inflamatórios e fatores hemostáticos para o local da lesão, dando início ao sistema de agregação plaquetária e formação de coágulos, que desenvolverão uma matriz extracelular (MEC) provisória, na qual ocorrerá adesão plaquetária (Arvind et al., 2021). Estas serão ativadas liberando fatores bioativos dos grânulos alfa, representados por citocinas, fatores de crescimento e mediadores pró inflamatórios (Tidball et al., 2010).

Segue-se um estágio inflamatório nas primeiras 24 a 48 horas, principalmente decorrente da presença de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que são reconhecidos pela primeira vez por receptores toll like (TLR) de plaquetas, células endoteliais e macrófagos residentes (Tidball et al., 2010). Estas células localizadas no coágulo de fibrina secretarão fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e proteína quimioatrativa de monócitos (MCP1) que junto com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), atraem monócitos e mais macrófagos residentes de epimísio e perimísio para a área lesada (Chazaud, 2009).

Simultaneamente, no local lesionado, a presença de fator de crescimento do hepatócito (HGF) proveniente de macrófagos inflamatórios (M1), plaquetas e células endoteliais ativadas, promovem a reentrada de células satélites (CS) quiescentes no ciclo celular, além de que o fator de crescimento do fibroblasto (FGF), o fator de crescimento tecidual beta (TGF- β), o fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o VEGF, estimularão sua proliferação e migração para a área de reparo (Tatsumi, 1998; Borselli et al., 2010). Ademais, o TGF- β , apresenta efeito pleiotrófico e induz a ativação e proliferação de progenitores fibroadipogênicos (FAP), que irão sofrer diferenciação para fibroblastos e inibir a diferenciação dos mioblastos (Serrano et al., 2010).

Entre 48 a 72 h ocorre mudança de fenótipo do macrófago de M1 para M2, direcionando para resolução da inflamação (figura 1). Os macrófagos M2 liberam principalmente TGF- β e interleucina 10 (IL-10) (Chazaud, 2009). A matriz de fibrina gerada como uma MEC transitória junto com outras biomoléculas pode reter vários fatores de crescimento como FGF, HGF, TGF- β e VEGF lançados anteriormente por plaquetas, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos recém ativados que serão liberados gradualmente para controlar o reparo tecidual (Conboy, 2011). Nesta fase ocorre o término da fagocitose e da liberação de citocinas pró-inflamatórias

caracterizando o início da fase de reparo, com regeneração das fibras musculares e produção de tecido cicatricial conectivo. Nesta etapa ocorre liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) e fatores de crescimento (TGF- α , Miogenina, MEF2) os quais irão estimular a proliferação e diferenciação celular pelas células satélites, a deposição de colágeno e a angiogênese (Tidball et al., 2010).

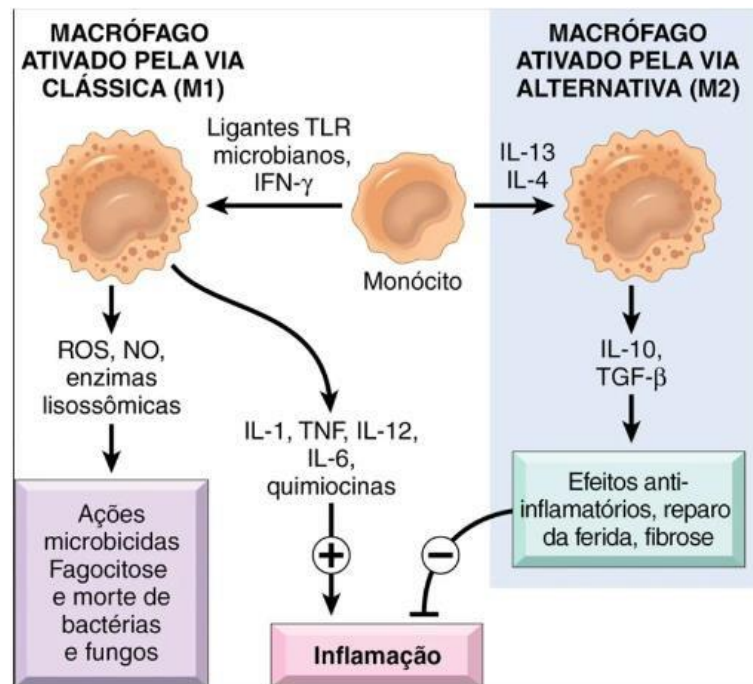


Figura 1 - Ativação dos macrófagos pela via clássica e alternativa.
Fonte: Robbins (2018).

O IGF-1 lançado por mioblastos, células endoteliais e macrófagos M2, irá estimular a proliferação e diferenciação de mioblastos e a sobrevivência celular, além de modular a inflamação através da supressão do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF κ B), reduzindo assim a fibrose e a mionecrose (Pelosi, 2007). Esses eventos são essenciais para resolução da inflamação e formação de um microambiente favorável ao reparo tecidual adequado (Sánchez e Andía, 2005).

Outro evento na resposta das células estromais à lesão muscular é a ativação, migração e proliferação de fibroblastos que, na presença de TGF- β e PDGF, assumem um fenótipo de miofibroblastos e, em cooperação com miofibras, são responsáveis pela homeostase tecidual, síntese e secreção de componentes da MEC como colágenos, lamininas, tenascina C, metaloproteinases de matriz (MMPs), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e TGF- β entre outros (Serrano, 2011; Grounds, 2008). Esses fibroblastos ativados, sob a estimulação do TGF- β , são

altamente secretores e infiltram o coágulo de fibrina. A MEC recém-formada juntamente com a matriz de fibrina provisória desempenha papel de adesão celular e serve como reservatório de fatores de crescimento como VEGF, PDGF, TGF- β que serão liberados gradativamente, modulando assim macrófagos, miofibroblastos e sobrevivência dos miotubos (Cornelison, 2008).

Essas citocinas auxiliam o reparo com aumento do número de células satélites bem como deposição de colágeno para modelagem do tecido e síntese de matriz extracelular (Tidball et al., 2010). Ao final inicia-se a fase de maturação ou remodelamento, que possui como característica mais relevante a deposição de colágeno de maneira organizada, devido a este contexto é considerada a fase mais importante clinicamente. Após inicia a fase de angiogênese com formação de novos vasos para fazer o reparo completo da lesão (Tidball et al., 2010).

Tanto o estímulo mecânico gradual e controlado que induz a síntese de IGF-1 pelas células musculares quanto a síntese de fatores de crescimento, como HGF e TGF- β pelos fibroblastos durante o final da fase de remodelação, parecem ser essenciais, uma vez que ambos os sinais podem ter um efeito sinérgico sobre a atividade dos fibroblastos que estão remodelando a MEC e tecido reparado (Prisk e Huard, 2003). A carga mecânica moderada modula a fusão e alinhamento subsequente de mioblastos em miofibras e pode minimizar ou mesmo evitar a formação do tecido cicatricial em excesso, inibindo o NF κ B do músculo e atividade fibroblástica exacerbada (Brooks, 2008).

É importante detectar a inflamação no estágio precoce e intervir nesse momento, pois a resposta inflamatória tardia, excessiva e prolongada pode atrasar a regeneração, danificar as fibras musculares e até mesmo ocasionar fibrose muscular ao ponto de conduzir para uma lesão crônica (Liu et al., 2015; Gardner et al., 2020).

1.3 LESÃO MUSCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO

Concomitantemente eventos de estresse oxidativo também são associados ao desenvolvimento da lesão muscular (Page e Powell, 1998; Perdiguero et al., 2011). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua eliminação por mecanismos protetores, denominados antioxidantes. Este desequilíbrio leva a danos celulares e biomoleculares, com impacto potencial em todo o organismo (Durackova, 2009).

As ERO são produtos de um metabolismo celular normal e desempenham papéis vitais na estimulação de vias de sinalização celular em resposta a mudanças nas condições ambientais intra e extracelulares (Jabs, 1999). As ERO ajudam os fagócitos a matarem microorganismos e modular eventos de sinalização pela regulação redox (redução e oxidação) e, assim, afetam a fosforilação e desfosforilação de enzimas e fatores de transcrição (Halliwell, 2006).

Durante as reações metabólicas endógenas, as células aeróbicas produzem ERO, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet) e peróxidos orgânicos como produtos normais da redução biológica do oxigênio molecular. Os principais mecanismos de produção de ERO na lesão muscular são: a ativação do complexo fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido (NADPH oxidase), a ativação da xantina oxidase (XO) e a disfunção mitocondrial (Di Meo et al., 2019).

A maioria das ERO é gerada nas mitocôndrias celulares pela cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Poyton et al., 2009). Devido ao escape de elétrons na CTE entre o complexo I e ubisemiquinona e entre ubisemiquinona e o complexo III estes elétrons ligam-se ao oxigênio molecular formando a maior parte dos O_2^- produzidos (Powers et al., 2011; Drose e Brandt, 2012). Além disso, sob condições hipóxicas, a cadeia respiratória mitocondrial também produz óxido nítrico (NO), que pode gerar outras espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Poyton et al., 2009). As ERN podem ainda gerar outras espécies reativas, por exemplo, aldeídos-malondialdeído reativos (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE), induzindo peroxidação lipídica excessiva (Hussain et al., 2003).

A peroxidação lipídica induzida por radicais livres OH^\bullet e a hidroxilação do DNA também são as principais vias para o dano oxidativo (figura 2). O radical OH^\bullet é a espécie mais reativa conhecida pela química, pois pode atacar e danificar quase todas as moléculas encontradas nas células vivas (Halliwell 2006). O radical OH^\bullet pode reagir com a estrutura do anel da guanina no DNA formando o radical 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) que pode propagar uma reação em cadeia através do DNA e causar alteração química das bases e quebra do DNA. O reparo imperfeito de tais danos ao DNA pode levar a mutações, interrupção do crescimento celular ou apoptose (Evans et al., 2006). O radical OH^\bullet também pode iniciar a reação em cadeia reagindo com os lipídios da membrana levando à peroxidação lipídica. Os efeitos gerais da peroxidação lipídica são diminuir a fluidez da membrana, aumentar o

vazamento da membrana e danificar as proteínas da membrana, inativando receptores, enzimas e canais iônicos (Halliwell, 2006).

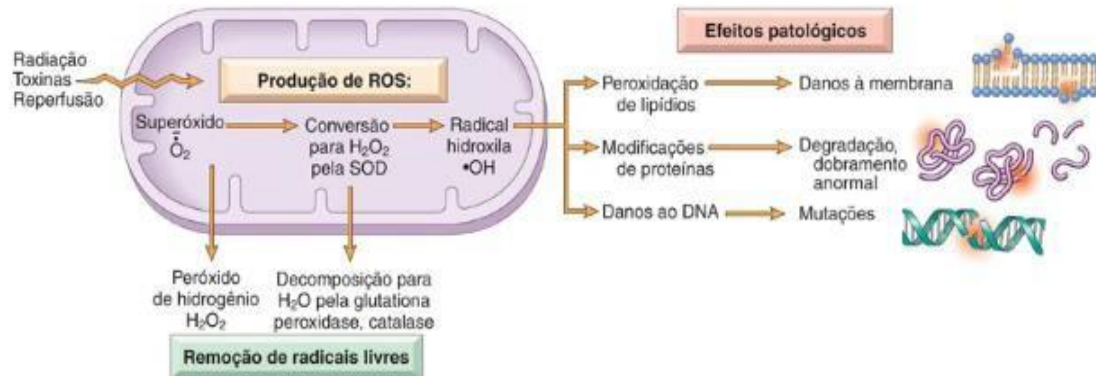


Figura 2 - Geração, remoção e papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) na lesão celular. Fonte: Robbins (2018).

Quando as proteínas são oxidadas é produzido o grupamento carbonila (aldeídos e cetonas) nas cadeias laterais 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 (Paraboni et al., 2022).

Para controlar o equilíbrio entre a produção e a remoção de ERO, existe uma variedade de enzimas de reparo do DNA, embora os antioxidantes sejam mais específicos e eficientes na proteção das células contra os radicais. Este sistema antioxidante inclui antioxidantes endógenos e exógenos, além de enzimáticos e não enzimáticos (Simioni et al., 2018). A glutatona (GSH), é um tripéptido e o principal antioxidante endógeno produzido pelas células, que ajuda a proteger as células de ERO, como radicais livres e peróxidos (Pompella et al., 2003).

As SODs foram as primeiras enzimas antioxidantes caracterizadas. Três tipos diferentes de SOD são expressos em células humanas, SOD cobre-zinco (Cu-ZnSOD), SOD manganês (Mn-SOD) e SOD extracelular (EC-SOD), todos os quais são capazes de dismutar dois ânions O_2^- em H_2O_2 e oxigênio molecular. A catalase (CAT) é então responsável pela dissociação do H_2O_2 em água e oxigênio. Glutaciona peroxidase (GPx) são outro grupo de enzimas capazes de reduzir hidroperóxidos, incluindo hidroperóxidos lipídicos, utilizando GSH como substrato. As peroxirredoxinas (Prx) foram descritas pela primeira vez há 20 anos e, assim como na

CAT e na GPx, a principal função das Prx é reduzir os hidroperóxidos de alquila e H_2O_2 ao álcool ou água correspondente (Reuter et al., 2010).

Ademais, as cascatas inflamatórias podem ser estimuladas pelo aumento nos níveis de ERO como O_2^- e OH^\bullet no decorrer e após a lesão muscular. Durante a resposta inflamatória outras espécies reativas vão se formando como, por exemplo, o H_2O_2 e oxigênio singlete (1O_2) (Matsuo e Kaneko, 2001). O aumento da produção das ERO, tem como consequência degeneração tecidual, respostas imunes, perda da função e por consequência um desequilíbrio na condição biológica tecidual, ocasionando o estresse oxidativo e um aumento constante das ERO (Silveira et al., 2013).

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 O_2^- pela reação da enzima fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida oxidase (NADPH-oxidase). As citocinas como interleucina 1 beta ($IL-1\beta$) e $TNF-\alpha$ podem aumentar a produção de oxidantes por uma estimulação direta de neutrófilos que produzem O_2^- , aumentando a atividade da xantina oxidase (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). Se o estresse oxidativo aparecer como anormalidade primária em um órgão, a inflamação eventualmente se desenvolverá e acentuará ainda mais o estresse oxidativo. Por outro lado, se a inflamação for o evento primário, o estresse oxidativo se desenvolverá como consequência, o que aumentará ainda mais a inflamação (Biswas, 2016).

1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) pode ser definido como um derivado do sangue com maior concentração de plaquetas do que o sangue (Filardo et al., 2015). O PRP é preparado a partir de um volume inicial de sangue que é processado e centrifugado para separar os diversos componentes sanguíneos (Malanga et al., 2016). Esse tipo de tratamento vem sendo investigado devido aos resultados iniciais promissores, baixo custo e forma de aplicação minimamente invasiva (Everts, 2020).

A terapia com PRP é baseada na premissa de que beneficia a cicatrização do tecido musculoesquelético devido à alta concentração de citocinas e fatores de

crescimento que normalmente estão envolvidos nas fases inicial e posterior do processo inflamatório ao recrutar e estimular a proliferação celular, além de produzir proteínas da matriz celular. (Anitua et al., 2006; Williams et al., 2015). Esses fatores estão listados na tabela 1.

Citocina	Símbolo	Funções
Fator de Crescimento Epidêmico	EGF	Mitogênicos aos ceratinócitos e fibroblastos; estimula a migração de ceratinócitos e formação do tecido de granulação
Fator transformador de crescimento α .	TGF- α	Similar ao EGF; estimula a replicação de hepatócitos e certas células epiteliais
Fator de crescimento do hepatócito/fator dispersa te	HGF	Intensifica a proliferação de células endoteliais e epiteliais e de hepatócitos; aumenta a motilidade celular.
Fator de crescimento celular endotelial vascular (isoformas A, B, C, D)	VEGF	Aumenta a permeabilidade vascular; mitogênico às células endoteliais.
Fator de crescimento derivado das plaquetas (isoformas A, B, C, D)	PDGF	Quimiotático aos PMNs, macrófagos, fibroblastos e células musculares lisas; ativa os PMNs, macrófagos e fibroblastos; mitogênico aos fibroblastos, às células endoteliais e células musculares lisas; estimula a produção de MMPs, fibronectina e AH; estimula a angiogênese e contração da ferida; remodelação; inibe a agregação plaquetária; regula a expressão da integrina.
Fator de crescimento derivado do fibroblasto - 1 (ácido) - 2 (básico) e família	FGF	Quimiotático aos fibroblastos; mitogênico aos fibroblastos e ceratinócitos; estimula a migração do ceratinócito, angiogênese, contração da ferida <i>fam</i> e deposição da matriz.
Fator de crescimento transformador β (isoformas 1, 2, 3); outros membros da família são BMP e activina	TGF- β	Quimiotáticos aos PMNs, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células musculares lisas; estimula a síntese do TIMP, migração do ceratinócito, angiogênese e fibroplasia; inibe a produção das MMPs e proliferação do ceratinócito; regula a expressão da integrina e outras citocinas; induz à produção do TGF- β
Fator de crescimento do ceratinócito (também denominado FGF-7).	KGF	Estimula a migração, proliferação e diferenciação do ceratinócito.
Fator de crescimento semelhante à insulina-1.	IGF-1	Estimula a síntese dos proteoglicanos sulfatados, colágeno, migração do ceratinócito e proliferação de fibroblastos; efeitos endócrinos similares ao hormônio do crescimento.
Fator de necrose tumoral.	TNF	Ativa os macrófagos; regula outras citocinas; funções múltiplas.
Interleucinas	IL-1 etc.	Muitas funções. Alguns exemplos: quimiotático aos PMNs (IL-1) e fibroblastos (IL-4), estimulação da síntese de MMP-1 (IL-4), angiogênese (IL-8), síntese de TIMP (IL-6); regulação de outras citocinas.
Interferons	IFN- α etc.	Ativa os macrófagos; inibe a proliferação de fibroblasto e síntese de MMPs; regula outras citocinas.

Tabela 1- Fatores de crescimento e citocinas presentes no PRP e suas respectivas funções no reparo tecidual. Fonte: Do Autor (adaptado de Vieira, 2011).

Para que o PRP tenha potencial de influenciar biologicamente as células de um leito receptor de forma eficaz, deve apresentar uma concentração plaquetária duas a cinco vezes superior à do sangue total (Alves e Grimalt, 2018), sendo que concentrações muito elevadas podem apresentar efeito inibitório no processo de regeneração tecidual (Anitua et al., 2009). A vantagem teórica do uso de PRP seria conter esses fatores de crescimento em concentrações superiores em relação as fisiológicas, mas é correto afirmar que essas concentrações variam dependendo do método de preparação de PRP, quantidade de sangue total utilizada, tipo de ativação plaquetária e o volume total final de PRP injetado (Fitzpatrick et al., 2017). Além disso, a concentração de plaquetas e citocinas associadas varia entre os pacientes e até mesmo em um mesmo indivíduo em diferentes momentos (Creaney e Hamilton, 2008; Mazzocca et al., 2012).

Conforme literatura, o PRP é eficaz em estimular a proliferação e migração de células mesenquimais em resposta à liberação de alguns fatores de crescimento específicos pelas plaquetas (Andia e Abate, 2015). Outra possível ação do PRP é a estimulação da proliferação de fibroblastos no músculo. No entanto, a deposição excessiva de colágeno tipo 1 pelos fibroblastos pode levar à formação de grandes áreas de fibrose, que pode levar à recorrência da lesão, bem como à diminuição da função. O controle desse processo é feito pelo TGF- β que pode estar presente em grande concentração nos grânulos alfa das plaquetas (Vidal et al., 2008).

Existem muitos protocolos de preparação de PRP (sistemas abertos e fechados, número de diferentes processos de centrifugação), pelo que os produtos obtidos diferem em termos de composição celular e molecular. Além do número de vezes, fatores como o tempo e força aplicada nas centrifugações, tempo de centrifugação também influenciam na qualidade do PRP (Cohen et al., 2019). No entanto, 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, pois a eficácia terapêutica do PRP pode ser reduzida se houver fragmentação das plaquetas e liberação dos fatores de crescimento precocemente (Collins et al., 2021).

Achados clínicos distintos são atribuídos tanto à variabilidade nas formulações do PRP quanto à variabilidade nos protocolos de aplicação. Diferentes concentrações de leucócitos no PRP, por exemplo, podem determinar diferentes propriedades imunomoduladoras mediadas pela interação sinérgica com plaquetas e a produção de metaloproteinase de matriz 13 (MMP-13), TNF α - e IL-1 β . Com base nesse achado podemos classificar o PRP em PRP puro e PRP com leucócitos, sendo que, este último pode ser pobre em leucócitos (PRP-PL) ou rico em leucócitos (PRP-RL) (Dohan et al., 2009). No entanto, existem outras classificações amplamente utilizadas, como a PAW, que se baseia no número absoluto de plaquetas (P), ativação plaquetária (A) e na presença ou ausência de leucócitos (W) (DeLong et al., 2012).

Atualmente o PRP é utilizado no tratamento definitivo ou coadjuvante de muitas afecções musculoesqueléticas e tendíneas. No entanto, os resultados e desfechos no tratamento das lesões musculares ainda são controversos. Inúmeras dúvidas existem quanto ao melhor preparo, concentração ideal de plaquetas e fatores de crescimento específicos e um melhor momento para iniciar o tratamento com PRP

após uma lesão. Essas questões motivam mais estudos e pesquisas em relação ao PRP como modalidade terapêutica nas afecções musculoesqueléticas.

1.5 ÁCIDO HIALURÔNICO NA LESÃO MUSCULAR

Ácido Hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano linear composto de ácido D-glucurônico (GlcUA) e N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligados alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. Essa porção dissacarídica é repetida milhares de vezes gerando um polímero linear com uma massa molecular variando de 5×10^5 a $4-5 \times 10^6$ Da ou até mais (Weissmann e Meyer, 1954). O AH é um glicosaminoglicano atípico e relativamente simples, polissacarídeo não sulfatado e não ramificado, não ligado a nenhuma proteína do núcleo proteoglicano. Devido às suas propriedades hidrófilas, o AH é muito hidratado, fazendo com que a MEC seja um ambiente ideal no qual as células podem se mover e proliferar, já que atua como modulador de interações proteína-proteína, atividade enzimática e transporte de moléculas de sinalização (Vigetti et al., 2014).

A MEC é uma rede complexa de macromoléculas que envolve as células não apenas para suporte mecânico e arquitetura do tecido, mas também para controlar as trocas de nutrientes e metabolitos, interações célula-célula e célula-matriz e sinalizar a difusão molecular. O AH é uma importante molécula de preenchimento de espaço, uma vez que é evidente no humor vítreo, na derme e ao nível das articulações. Além de suas propriedades de seleção molecular relacionadas às características químicas e biomecânicas, este polímero interage com proteínas específicas chamadas hialaderinas, como TSG6, e receptores de membrana como CD44, RHAMM, HARE e TLR 4/2, modula o desenvolvimento, a morfogênese, a tumorigênese, a migração, a apoptose, a sobrevivência celular e a inflamação (figura 3) (Day e Prestwich, 2002; Vigetti et al., 2014)

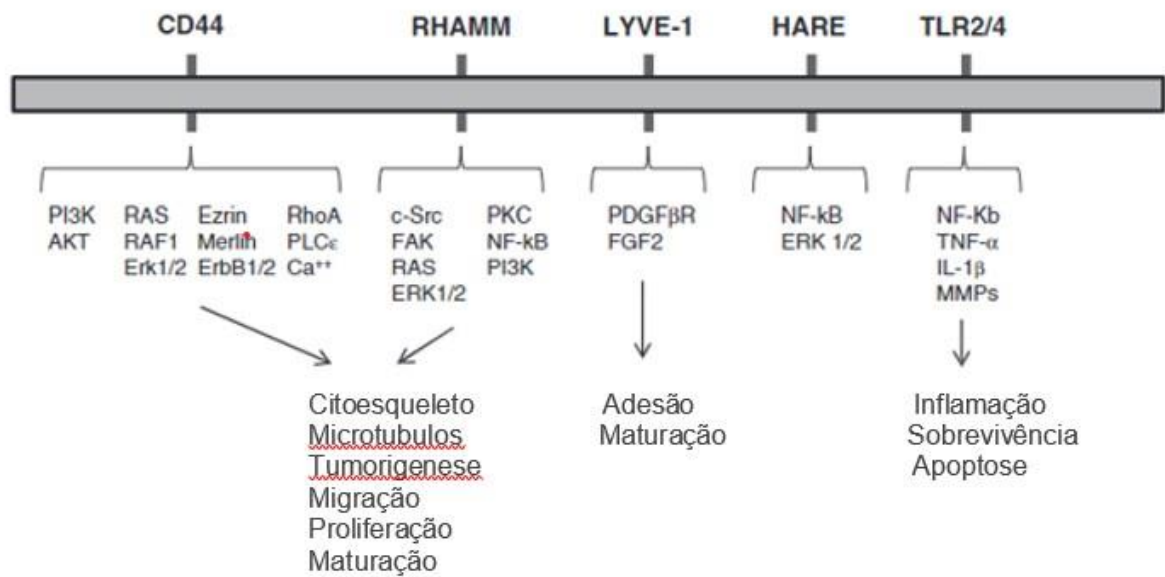


Figura 3 - Representação esquemática da cascata de sinalização dos receptores de ácido hialurônico e seu envolvimento nas funções celulares e teciduais. Fonte: Do Autor (adaptado de Vigetti et al., 2014)

A produção industrial do AH pode ser realizada por meio da extração de tecido animal ou fermentação microbiana. A extração a partir de diferentes tecidos animais, como crista de galo, cordões umbilicais humanos e globo ocular de animais (Shiedlin et al., 2004) apresenta-se como método muitas vezes limitado pela quantidade e qualidade das matérias-primas, de baixa eficiência, de alto custo, com potencial imunogênico e de contaminação. Devido a essas questões técnicas e de segurança, a fermentação microbiana é considerada o método preferido para a produção de AH, tendo principal agente utilizado o *Streptococcus zooepidemicus* (tipo C), com cepas selecionadas através de engenharia genética (Qiu et al., 2021).

A função biológica do AH está intimamente relacionada ao seu peso molecular (PM). AH de alto peso molecular (AH-APM) ($PM > 1 \times 10^6$ Da) pode ser usado para injeção na cavidade articular para restaurar a viscoelasticidade do tecido articular e reparar a degeneração da cartilagem, devido à sua boa viscoelasticidade, retenção de umidade, inibição da resposta inflamatória e funções de lubrificação. Também pode ser usado para cirurgia plástica e cosmética, pois promove cicatrização de feridas, ajuda prevenir aderências pós-operatórias e atua na liberação lenta de drogas (Stern et al., 2006). Comparado com o AH-APM, o AH de baixo peso molecular (AH-BPM) ($1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ Da) é mais facilmente absorvido pelo corpo humano, o que desempenha um papel importante na cicatrização de feridas crônicas e no desenvolvimento de reticuladores de AH (Ke et al., 2013)

O AH é usado principalmente na forma de hidrogel no campo da medicina, devido à sua segurança e biocompatibilidade (Huiyan et al., 2019). Pesquisas mostraram que o AH-BPM pode prevenir o dano do tecido de granulação causado por radicais livres de oxigênio durante a cicatrização de feridas (Trabucchi et al., 2002). AH-APM (PM > 6×10^6 Da) é comumente usado em cirurgia oftalmológica. Estudos demonstraram que, quando injetado diretamente nas articulações, o AH-APM mantém um efeito terapêutico mais prolongado, podendo desempenhar um papel de lubrificação e proteção mecânica nas partes danificadas, inibir a reação inflamatória e promover a regeneração do tecido articular (Solchaga et al., 2010).

Um estudo sobre o AH e a regeneração muscular demonstrou que a síntese de AH impulsionada pela enzima epigenética kDM6B/JMJD3 desempenha um papel pró-regenerativo que possibilita a adaptação de células satélites à inflamação e o início do reparo muscular (Nakka et al., 2021). Segundo esse estudo, a desmetilação da histona H3 lisina 27 (H3K27) pela enzima JMJD3, permitiu que as células tronco superassem a sinalização inibitória da inflamação removendo as marcas trimetiladas de H3K27 no locus Has2 para iniciar a produção de AH, que por sua vez estabeleceu uma matriz extracelular competente para integração de sinais que direcionaram as células satélites para sair da quiescência. Esse estudo abre novos horizontes terapêuticos acerca do uso do AH na lesão do tecido muscular esquelético e motiva novas pesquisas nessa área.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do PRP-PL e do AH-BPM, tanto isolados quanto associados, como método de controle do processo inflamatório em modelo de lesão muscular traumática no gastrocnêmio de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o infiltrado inflamatório através de análise histológica das amostras coletadas no 5º dia após lesão muscular no gastrocnêmio em ratos Wistar;
- Avaliar a expressão gênica de CD11c e CD206 através de RT-qPCR das amostras coletadas no quinto dia após lesão muscular no gastrocnêmio em ratos Wistar;
- Quantificar os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL6, IL4, IL10 e TGF- β) das amostras coletadas no 5º dia após lesão muscular no gastrocnêmio em ratos Wistar;
- Avaliar a produção de oxidantes, sistema antioxidante e dano oxidativo das amostras coletadas no 5º dia após lesão muscular no gastrocnêmio em ratos Wistar.

3 MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado sob protocolo 14/2023 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

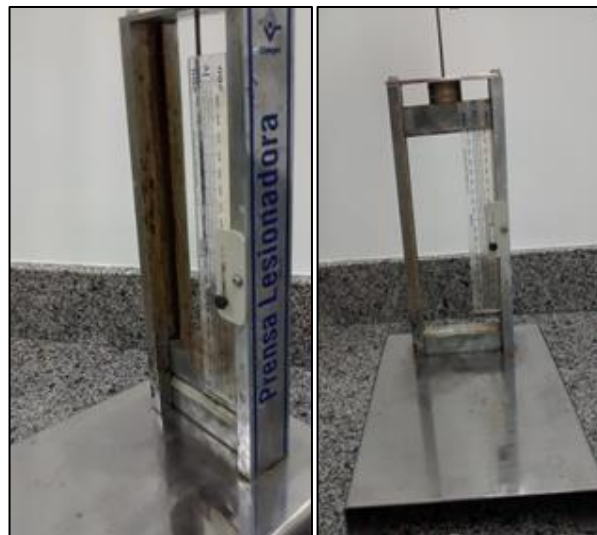
Para este estudo foram utilizados 66 ratos Wistar machos com dois meses de vida, pesando entre 200g – 300g, provenientes da colônia de reprodução do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, mantidos em temperatura ambiente controlada entre $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12h e alimentados com dieta padrão para roedores e água de forma *ad libitum*.

Enquanto 6 ratos machos Wistar foram submetidos à punção cardíaca para retirada de sangue, sob anestesia, os outros 60 machos Wistar foram divididos nos grupos de estudo.

Após finalizar o 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 essa etapa, 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 foram realizados conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (ANVISA).

3.3 MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA

Foi utilizado o modelo padrão para produção da lesão do músculo gastrocnêmio em patas traseiras dos animais (figura 4) desenvolvido por Rizzi et al. (2006), para provocar a lesão muscular traumática. Nesse modelo foi utilizada 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 4- 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. Fonte: Beirão (2022).

3.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Foram escolhidos aleatoriamente 6 ratos Wistar, dentre os 66 animais destinados ao experimento e utilizados para coleta de sangue por punção direta da cavidade cardíaca (figura 5). 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.

A extração do PRP deste estudo foi baseada pelo protocolo indicado por Yazigi Júnior et al. (2015) com algumas adaptações mediante testagens prévias. O sangue coletado foi submetido a duas centrifugações, a primeira a 200 g por 10 minutos e a segunda a 800 g por 10 minutos. Na primeira foi separado o plasma do concentrado de hemácias, obtendo-se o PRP total. Em seguida foi realizada a segunda centrifugação, em que o PRP se depositou no fundo dos tubos de coleta, e foi, então, aspirado e utilizado. A camada superior, composta pelo plasma pobre em plaquetas, foi descartada.

O sangue total e o PRP foram submetidos à contagem de plaquetas e leucócitos em equipamento hematológico veterinário (Mindray, Bc2800) para avaliar sua concentração, depois estando pronto para aplicação intramuscular. A contagem de plaquetas e leucócitos no PRP comparando com a contagem do sangue total foi de $3937 \times 10^3/uL$ plaquetas e $15 \times 10^3/uL$ leucócitos no PRP, enquanto no sangue total foi $1092 \times 10^3/uL$ plaquetas e $46 \times 10^3/uL$ leucócitos.



Figura 5 - Extração do sangue por punção cardíaca. Fonte: Do autor (2023).

3.5 ÁCIDO HIALURÔNICO DE BAIXO PESO MOLECULAR

O AH de baixo peso molecular foi utilizado a fim de avaliar seu efeito na lesão do tecido muscular estriado e otimizar a aplicação intramuscular do PRP. Formulado com menos de um centésimo do tamanho típico da molécula de AH em combinação com a presença de um grupo hidrofóbico, o AH (*Sigma Aldrich*) será solubilizado conforme descrito por Yamasaki et al. (2020), com concentração final de 0,9% de AH em solução aquosa purificada. A preparação de uma solução com PRP para o grupo pré-determinado será preparada através de agitação em temperatura ambiente seguido por imediata aplicação.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 66 ratos Wistar com dois meses de vida pesando entre 200-300 g. Estes foram divididos em cinco grupos experimentais com doze animais cada, de acordo com a Tabela 2.

n	Descrição do grupo
GRUPO I (n=12)	Sham
GRUPO II (n=12)	Lesão Muscular (LM)
GRUPO III (n=12)	LM + Plasma rico em plaquetas (PRP)
GRUPO IV (n=12)	LM + Ácido hialurônico (AH)
GRUPO V (n=12)	LM + PRP + AH

Tabela 2 - Quantidade e descrição de animais em cada grupo. Fonte: Do autor (2023).

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 AH nos grupos de trauma (III, IV, V).

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 no grupo III. Também foi realizada a injeção de 0,05 mL do AH no grupo IV e a combinação de PRP e AH no grupo V (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 (figura 6).

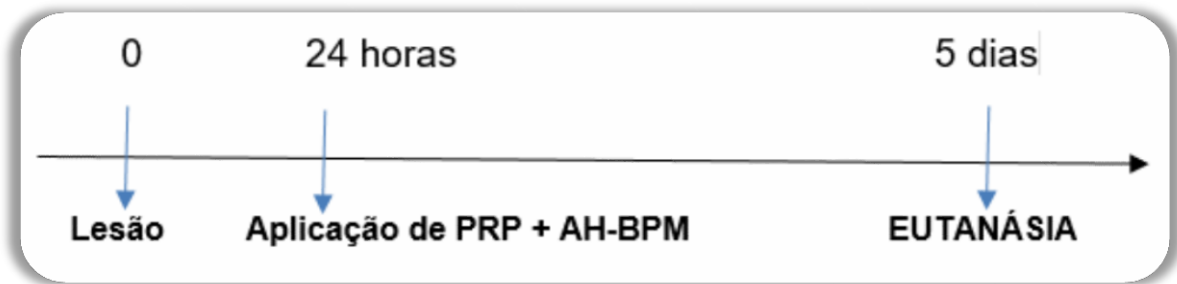


Figura 6 - Desenho experimental da pesquisa. Fonte: Do Autor (2023).

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras teciduais do gastrocnêmio 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 μ m 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 Expressão gênica (RT-qPCR)

A análise de expressão gênica do marcador CD11c e CD206 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 absorvância a 260 nm e 280nm. A relação entre as absorvâncias 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 (ELISA)

Para determinar a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos de interesse, foi realizado o imunoenensaio de imunoabsorbância enzimática - ELISA sanduiche indireto (DuoSet ELISA) utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicatas. As amostras foram primeiramente homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de proteases, com o intuito de preservar o conteúdo proteico da amostra de interesse. Com as amostras devidamente preparadas, as placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100), deixando overnight a 4 °C. No dia posterior, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas (ELISA / ELISPOT Diluent) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras dos tecidos de interesse foram então pipetadas em duplicata na placa (100 microlitros), sobre seus respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas passaram novamente pela etapa de lavagem, afim de remover-se as ligações inespecíficas. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de detecção, o qual se liga aos antígenos da amostra formando assim um “sanduiche” de anticorpo e amostra. Após período de incubação à temperatura ambiente e posterior etapa de lavagem, foi adicionado 100 microlitros de uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP). Sob esta solução, adicionou-

se um substrato cromogênico, o tetrametilbenzidina (TMB), a qual em presença da HRP emite uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utilizou-se 50 μ por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10 e TGF- β) foi determinada via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

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 (DCFHDA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) por ERO de acordo com o método descrito por Lebeland e Bondy (1992).

Foi avaliada, também, espectrofotometricamente, a produção de NO através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram 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 (NaNO₂). Os resultados foram calculados em μ mol Nitrito/mg proteína (Chaea et al. 2004).

3.8.3.2 Marcadores de Danos Oxidativos

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

Através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina foi determinada a oxidação de proteínas, mediante a quantificação de proteínas carboniladas. 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⁻¹. cm⁻¹.

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.

Para determinar os níveis de GSH foi utilizado o método descrito por Hissin e 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'- Dithiobis, 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. Para calcular os níveis de GSH nas amostras foi utilizada uma curva padrão de glutathiona reduzida (Hissin e Hilf, 1976).

3.8.4 Determinações do Conteúdo Proteico

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

3.9 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

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

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Nas análises histológicas apresentadas na figura 12 não foram observados resultados significativos em relação ao influxo de células inflamatórias. Não foram obtidos resultados significativos nesta avaliação.

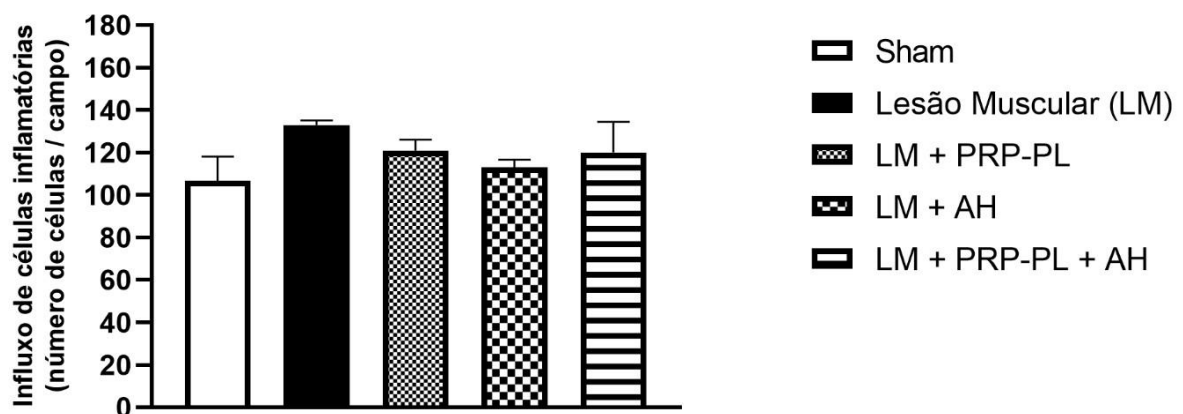


Figura 7 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre a análise histológica de influxo de células inflamatórias. Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$ v.s grupo sham; * $p < 0.05$ v.s grupo LM.

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA (RT-QPCR)

Avaliou-se a estimulação da expressão gênica relacionada aos macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios). Na figura 7, observa-se no gráfico A, que o grupo LM apresentou aumento significativo da expressão gênica relativa de CD11c, correspondente ao M1, quando comparado ao grupo Sham ($p < 0.05$). Enquanto isso, na mesma avaliação os demais grupos não apresentaram resultados significativos. Em B, o grupo LM + PRP-PL apresentou aumento significativo da expressão gênica relativa de CD206, correspondente ao M2, quando comparado ao grupo LM ($p < 0,05$). Entretanto, os demais grupos não apresentaram resultados significativos.

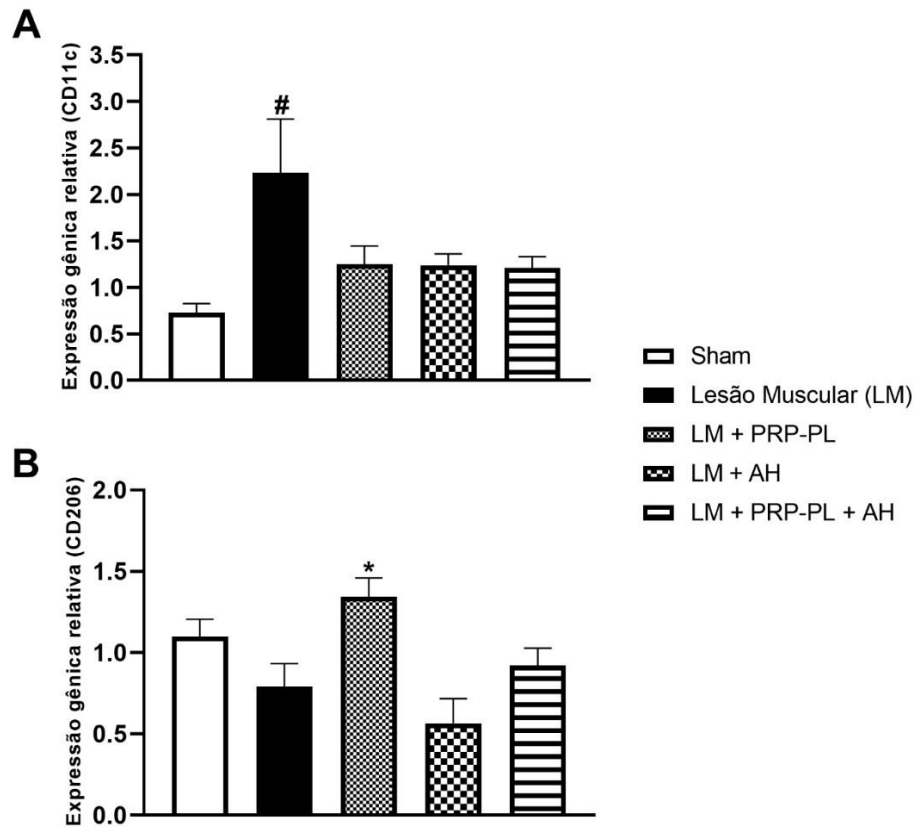


Figura 8 – Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre a expressão gênica relativa de CD11c (marcador de M1) e CD206 (marcador de M2). Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$ vs grupo sham; * $p < 0.05$ v.s grupo LM.

4.3 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Na sequência, avaliou-se a estimulação de quadros pró-inflamatórios por meio de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6. Na figura 8, os resultados apresentaram que no grupo LM e LM + AH houve aumento significativo de TNF- α e IL-6 em comparação com o grupo Sham ($p < 0.05$), conforme imagens A e C respectivamente. Observou-se também, no grupo LM + PRP-PL, aumento de TNF- α em comparação com o grupo Sham ($p < 0.05$). Enquanto isso, no grupo LM + PRP-PL + AH foi observada diminuição significativa quando comparado com o grupo LM nas análises de IL-1 β ($p < 0,001$) e IL-6 ($p < 0,05$), conforme imagens B e C, respectivamente.

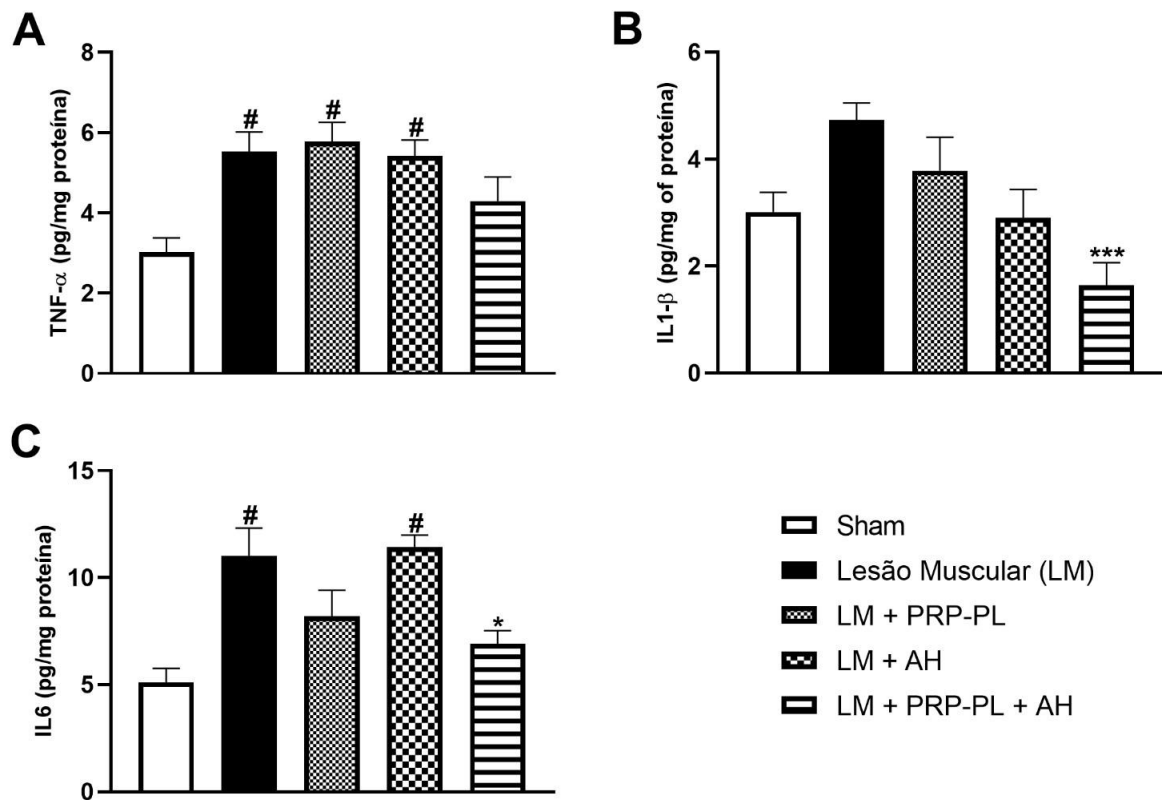


Figura 9 – Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de citocinas pró inflamatórias. Abreviações: IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral. Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$ v.s grupo sham; * $p < 0.05$ v.s grupo LM; *** $p < 0.001$ v.s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

4.4 CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS E FATOR DE CRESCIMENTO

Foi avaliada, também, a estimulação de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 e o fator de crescimento TGF- β que podem ser visualizadas na figura 9. Os resultados mostraram que no grupo LM houve redução significativa de IL-10, IL-4 e TGF- β em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$) conforme observado nas imagens A, B e C, respectivamente. Por outro lado, os grupos LM + PRP-PL, LM + AH e LM + PRP-PL + AH apresentaram aumento significativo de IL-10, IL-4 e TGF- β em relação ao grupo LM ($p < 0,05$) conforme observado nas imagens A, B e C, respectivamente.

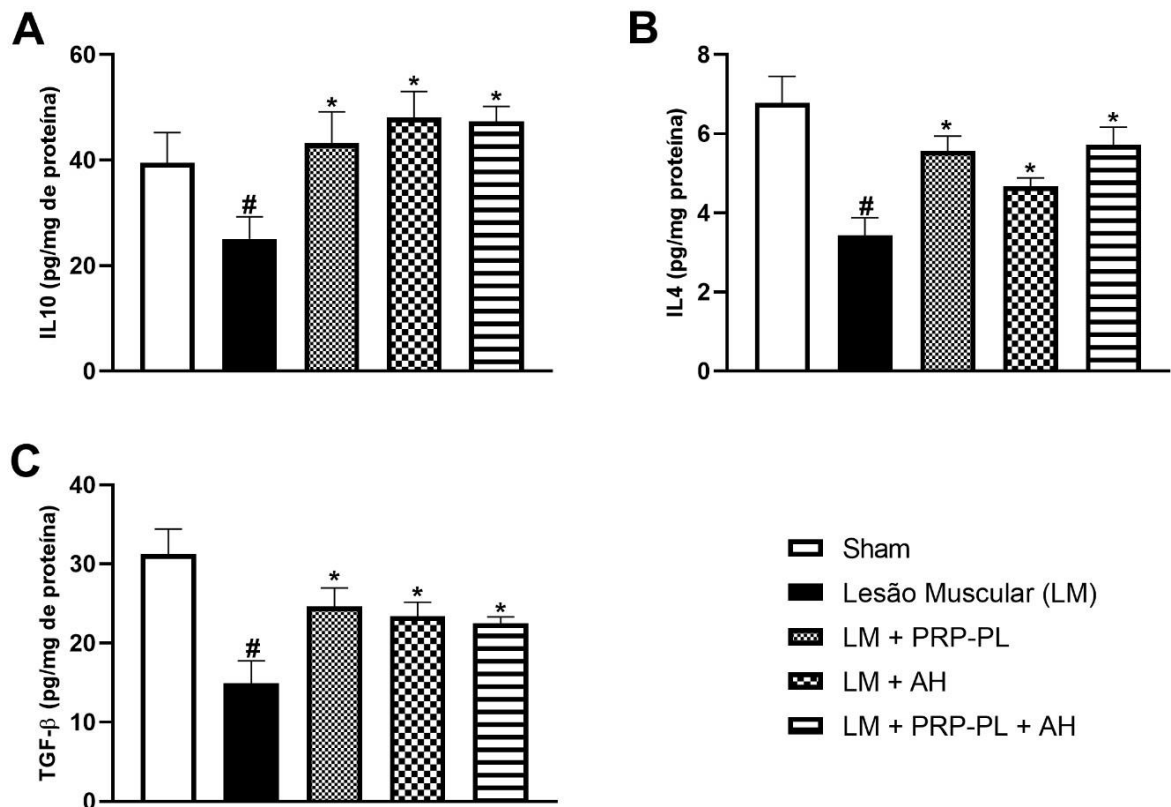


Figura 10 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento. Abreviações: IL, interleucina; TGF, fator de crescimento transformador. Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$ v.s grupo sham; * $p < 0.05$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

4.5 OXIDANTES

Entre os parâmetros de avaliação do estresse oxidativo, foi avaliada a atividade de moléculas oxidantes conforme figura 10. Em A, o grupo LM apresentou aumento significativo de DCF em comparação ao grupo Sham ($p < 0.05$). Além disso, no grupo LM + PRP-PL + AH 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 ($p < 0.05$). Da mesma forma, os grupos LM + PRP-PL, LM + AH e LM + PRP-PL + AH apresentaram aumento significativo de Nitrito em comparação ao grupo Sham ($p < 0.05$).

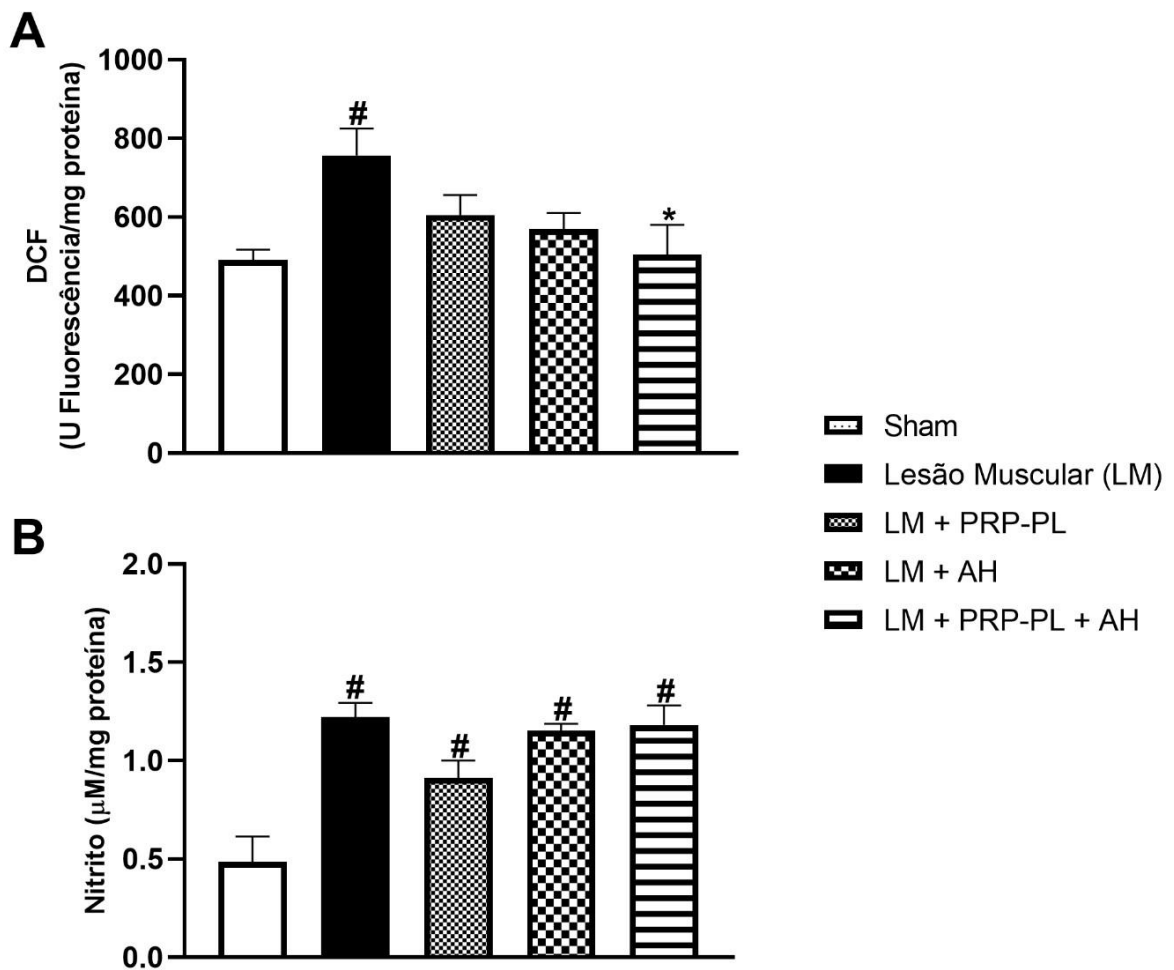


Figura 11 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de oxidantes. Abreviações: DCF, Diclofluoresceína. Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$ v.s grupo sham; * $p < 0.05$ v.s grupo LM.

4.6 DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Foram também avaliados, dentre os componentes para avaliação do estresse oxidativo, o dano oxidativo (figura 11, A e B) e a atividade de enzimas antioxidantes (figura 11, C e D). Em A, o grupo LM obteve aumento significativo de carbonil quando comparado ao grupo Sham ($p < 0.05$). Por outro lado, o grupo LM + AH apresentou diminuição significativa em comparação com o grupo LM ($p < 0.05$) e o grupo LM + PRP-PL + AH apresentou diminuição significativa ainda maior quando comparado ao grupo LM ($p < 0.01$). Em B não houve resultados significativos. Em C, os grupos LM e LM + AH apresentaram redução significativa de SOD quando comparados ao grupo Sham ($p < 0.05$). Em D, o grupo LM obteve redução significativa de GSH quando comparado ao grupo Sham ($p < 0.05$). Por outro lado, o grupo LM +

AH apresentou aumento significativo de GSH ($p < 0.05$). Além disso, os grupos LM + PRP-PL e LM + PRP-PL + AH apresentaram aumento significativo ainda maior quando comparados ao grupo LM ($p < 0.01$).

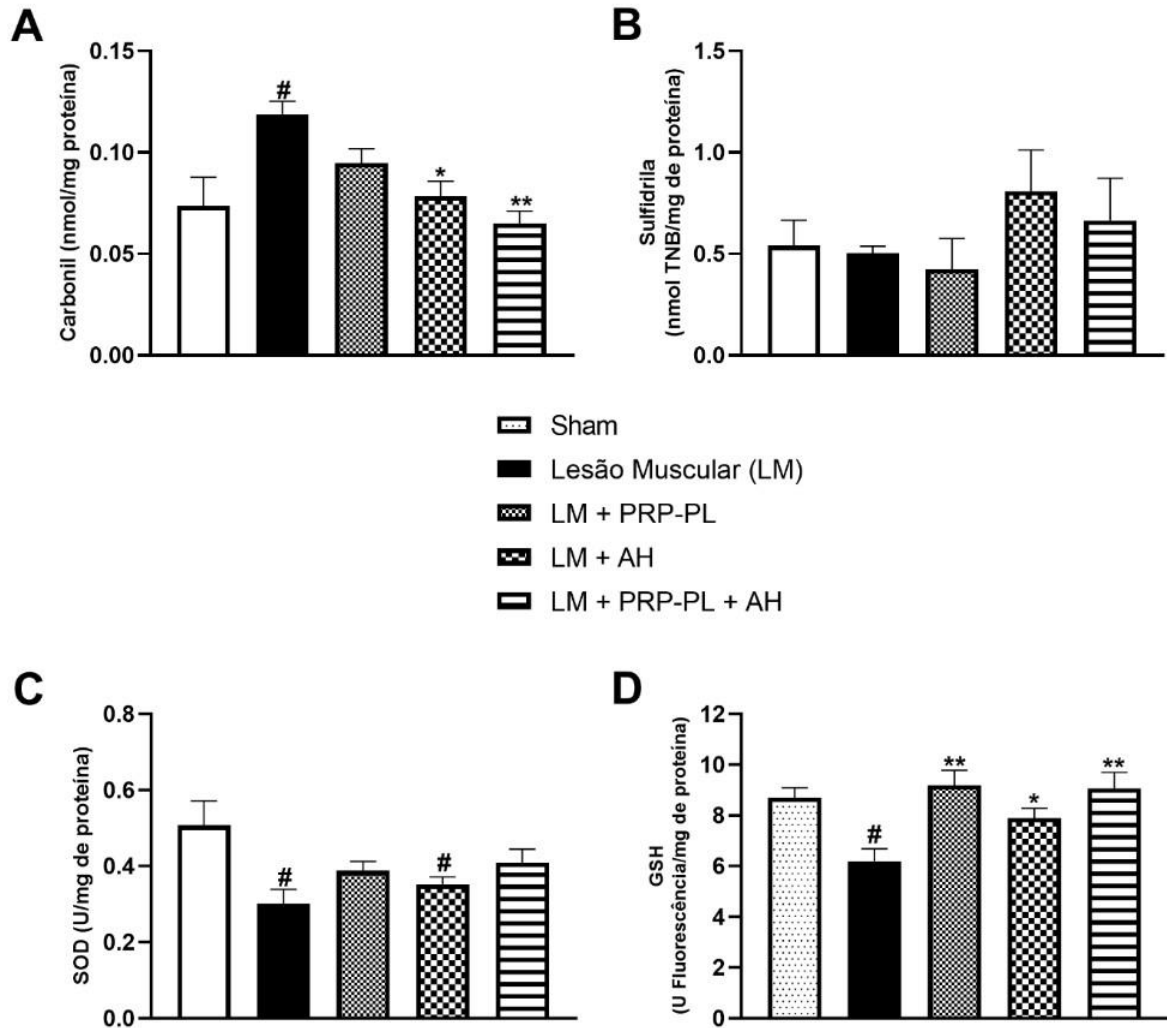


Figura 12 - Efeitos do tratamento isolado e associado de PRP-PL e AH sobre os níveis de dano oxidativo e antioxidantes. Abreviações: SOD, superóxido dismutase; GSH, Glutathione. Dados são apresentados como média +/- EPM em que: # $p < 0.05$ v.s grupo sham; * $p < 0.05$ v.s grupo LM; ** $p < 0.01$ v.s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

5. DISCUSSÃO

O músculo esquelético apresenta uma notável capacidade regenerativa, que envolve ativação, proliferação, diferenciação e crescimento de células miogênicas (Bentzinger et al., 2013). A lesão muscular provoca ativação de células satélites, que proliferam e se diferenciam em mioblastos. Os mioblastos se fundem para formar miotubos que crescem e se diferenciam em miofibras maduras (Wang e Zhou, 2022). Nesse contexto, os macrófagos desempenham papel fundamental na modulação da resposta inflamatória com alternância adequada de fenótipo M1 para M2 e formação de um microambiente favorável ao reparo tecidual (Brown et al., 2014). É fundamental, nesse processo, o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias e o controle das ERO (Perdiguerro et al., 2011). Caso ocorra desequilíbrio e interrupção da polarização dos macrófagos pode haver deposição excessiva de MEC e fibrose muscular, que irá prejudicar a função e aumentar a suscetibilidade do músculo a novas lesões (Jarvinen et al., 2002).

Dessa forma, deve-se buscar terapias que favoreçam o processo de reparação tecidual e atuem positivamente na modulação da resposta inflamatória. Nesse sentido, o uso de ortobiológicos na lesão muscular tem apresentado resultados promissores no reparo do tecido muscular com redução do tecido fibrótico (Quarteiro et al., 2015). O PRP, que apresenta concentrações suprafisiológicas de plaquetas, está incluído nessa classe de biomateriais e têm se popularizado nas últimas décadas pelo potencial regenerativo tecidual, visto que, entrega múltiplos fatores de crescimento e citocinas, criando um microambiente molecular ideal, que atua, simultaneamente, através de diferentes mecanismos (Andia e Abate., 2015).

Outro agente ortobiológico utilizado nesse estudo foi o AH, um polissacarídeo natural que está presente na MEC dos tecidos. Após a lesão tecidual, ocorrem estímulos para produção de uma matriz rica em AH. Essas moléculas desempenham função de facilitar a motilidade celular, promover interação com receptores de parede celular, participando da migração e proliferação celular (Vigetti et al., 2014).

Apesar de haver estudos que mostram a eficácia do uso do PRP na lesão muscular, são necessários mais estudos experimentais para compreender completamente os mecanismos de ação locais e sistêmicos e padronizar a técnica de preparo e aplicação (Borrione et al., 2014; Tsai et al., 2018). Por outro lado, existe

uma escassez de estudos que avaliem a ação do AH na lesão muscular (George et al., 2019). Devido a isso, este estudo se propôs a investigar as respostas do PRP-PL e do AH-BPM isoladamente e em associação quando aplicados na lesão muscular aguda. Além disso, verificar se o uso destas substâncias poderia reduzir o processo inflamatório inicial, que favoreceria um melhor reparo tecidual.

Desta forma, foi realizada a análise de diversos parâmetros, dentre eles, avaliou-se pela histologia o influxo de células inflamatórias. Nesta análise o grupo LM mostrou aumento nas células inflamatórias, porém não foi considerado significativo comparado ao grupo sem lesão. Acredita-se que isso se deva ao fato de a inflamação estar no período de transição da fase inflamatória para fase regenerativa. Perspectiva que vai de encontro com a análise de expressão gênica avaliada pelo RT-qPCR, em que o aumento de M1 e não aumento da expressão gênica de M2 no grupo LM, reforça essa hipótese. Deste modo 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 (Galli et al., 2011).

Nos grupos de tratamento também não houve aumento do influxo de células inflamatórias, porém, na análise de expressão gênica foi observada manutenção dos níveis de M1 próximos ao grupo Sham. Esse fato sugere uma resposta inflamatória inicial atenuada em relação ao grupo LM, visto que, o aumento do influxo de neutrófilos e aumento da expressão de M1 está associado a níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (Tidball, 2011; Wang et al., 2018). Na literatura são encontrados dados controversos em relação a avaliação desse parâmetro após aplicação de PRP na lesão muscular em ratos wistar e análise histológica no quinto dia após lesão muscular, sendo constatado tanto aumento (Borrione et al., 2014), quanto redução do influxo de células inflamatórias (Beirão, 2022). Postula-se que apesar de não haver redução ou aumento quantitativos desse influxo no presente estudo, houve aumento qualitativo na atividade dos macrófagos, hipótese reforçada pelos achados das análises de citocinas anti-inflamatórias e estresse oxidativo.

Ademais como já retratado, avaliou-se a expressão gênica de receptores M1 e M2, visto que a transição da resposta inicial dominada por macrófagos M1 para uma população com predomínio de M2 após lesão muscular facilita a remodelação do músculo esquelético e é necessária para uma restauração funcional eficiente (Tidball et al., 2004). Nesse contexto, o aumento da expressão de receptores M1 encontrados

no grupo LM, indica predomínio desse fenótipo. Essa observação evidencia que ainda não ocorreu transição da inflamação para fase regenerativa nesse grupo. Por outro lado, nos grupos de tratamento observa-se manutenção dos níveis de M1, sugerindo melhor controle da expressão de macrófagos inflamatórios nos grupos tratados com PRP e AH ou associação de ambos (Wang e Zhou, 2022).

Adicionalmente, o grupo LM + PRP-PL apresentou aumento da expressão gênica de receptor M2, fenótipo que está associado ao aumento da produção e secreção de IL-4, IL-10, TGF- β 1 e IGF-1 (Serhan e Savill, 2005; Tidball et al., 2011). Dessa forma, evidencia-se que nesse grupo de tratamento o PRP-PL contribuiu para a alternância dos fenótipos M1 e M2 e antecipação da fase regenerativa. Um possível mecanismo seria a indução da polarização de macrófagos do fenótipo M1 para M2 pelo HGF e micropartículas de plaquetas contidos no PRP (Renn et al., 2015; Vasina et al., 2011).

Na avaliação das dosagens de citocinas pró-inflamatórias no tecido muscular, o aumento significativo de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no grupo LM encontra-se alinhado com literatura, haja vista a indicação que após a ocorrência de uma lesão muscular, os macrófagos infiltram-se no músculo lesado e, seu fenótipo M1, classicamente ativado, produz um nível relativamente alto de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Wang et al., 2018; Wang e Zhou, 2022). Estas citocinas pró-inflamatórias ativam a proliferação de fibroblastos e amplificam o recrutamento de células inflamatórias, levando ao aumento do dano tecidual (Arnold et al., 2007; Wang e Zhou, 2022). Além disso, o TNF- α é mitogênico para os mioblastos e inibe sua diferenciação, já a IL-1 β prejudica a diferenciação miogênica através do IGF-1 (Tidball, 2011).

Em contrapartida, a menor expressão de IL-1 β e IL-6 no grupo LM + PRP-PL + AH sugere ação sinérgica do PRP e AH na atenuação do processo inflamatório nesse grupo. Um possível mecanismo para redução da IL-1 β pelo PRP seria o aumento do TGF- β que, possivelmente, promoveria a síntese do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) (Zigler et al., 2019). Estudos demonstraram também que a liberação de fatores de crescimento pelo PRP como IGF-1 e PDGF podem suprimir a via de sinalização do NF κ B, o que pode levar à diminuição de IL-1 β e TNF- α (Bendinelli et al., 2010; Montaseri et al., 2011). Somado a isso, o AH pode se ligar aos receptores CD44 e inibir a expressão de IL-1 β (Karna et al., 2008).

Na sequência dos eventos do processo inflamatório, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos M1 suprime a expressão de IL-1 β e TNF- α , enquanto aumenta-se a expressão de IL-10 e TGF- β pelos macrófagos M2, esse cenário indica uma mudança em direção a predominância do fenótipo M2 (Tidball, 2011). Esses macrófagos anti-inflamatórios contribuem, em parte, para a resolução da inflamação, haja vista que expressam uma variedade de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, TGF- β 1, IL-10 e IGF-1. Estas moléculas anti-inflamatórias neutralizam os sinais pró-inflamatórios, reduzem a produção de ERO, bloqueiam o recrutamento de neutrófilos e promovem a apoptose e eliminação de neutrófilos por macrófagos (Serhan e Savill, 2005). Além disso, inibem a proliferação de mioblastos e promovem a formação e diferenciação de miotubos (Arnold et al., 2007).

Diante dessas considerações, são almejados tratamentos para LM capazes de induzir aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 e da expressão de TGF- β , que, teoricamente, poderiam acelerar o processo de reparo tecidual (Dimauro et al., 2014). Fato alinhado com as evidências encontradas no presente estudo em que todos os grupos com tratamento possuíram aumento nos marcadores de IL-4 e IL-10. Este achado está de acordo com trabalhos que referem que o PRP-PL aumentou o receptor CD206 em macrófagos, que regula a função dos macrófagos M2 e, por sua vez, induzem a redução da inflamação e dano tecidual mediante secreção de citocinas anti-inflamatórias (como IL-4 e IL-10) e fatores de crescimento (Hammond et al., 2009; Nasirzade et al., 2019). De forma semelhante, outro estudo também demonstrou aumento de citocinas anti-inflamatórias após aplicação do PRP na lesão muscular (Borrione et al., 2014).

Somado a isso, os resultados do presente estudo também mostraram aumento na expressão do TGF- β nos grupos tratados com PRP-PL, AH e PRP-PL + AH indicando um possível papel protetor dos tratamentos e uma tentativa de reparação tecidual. Isto é, o TGF- β é associado com a regulação da diferenciação miogênica, deposição de MEC com formação de tecido conjuntivo e regulação da resposta imune (Delaney et al., 2017). Além disso, estima-se que o aumento dos níveis de TGF- β possa ter ajudado a modular os efeitos das citocinas inflamatórias mediante sua associação com a indução de IL-1RA, que por sua vez diminui a sinalização do receptor de IL-1 β (Zigler et al., 2019).

Adicionalmente, o aumento tanto do TGF- β quanto de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no grupo tratado apenas com o AH, pode estar atrelado à

formação de uma MEC mais competente pela ação do AH e ativação de macrófagos M2 com liberação dessas citocinas. Conforme a literatura, moléculas de AH podem estimular vias de sinalização que promovem a proliferação celular, proporcionando um ambiente favorável para o crescimento e divisão celular em MEC's ricas em AH (Day e Prestwich., 2002; Vigetti et al., 2014). O AH-BPM é catabolizado em oligômeros que se ligam aos receptores de membrana CD44 e RHAMM e estimulam produção de TGF- β e fatores de crescimento como VEGF (Yang et al., 2020). Da mesma forma, a soma destes mecanismos pode ter contribuído para o aumento de IL-4, IL-10 e TGF- β no grupo com tratamento combinado de PRP-PL + AH-BPM, direcionando para antecipação da fase regenerativa (Singampalli et al., 2020; Dimauro et al., 2014).

Destaca-se ainda nos marcadores anti-inflamatórios, redução dos níveis de IL-4, IL-10 e TGF- β no grupo LM. Aspecto condizente com a literatura, visto que, o pico dos macrófagos M2 durante o processo inflamatório ocorre normalmente entre o oitavo e décimo dia após a lesão (Kuninaka et al., 2022). Como essa análise ocorreu no quinto dia de lesão muscular não é esperado ainda elevação dessas citocinas anti-inflamatórias expressas pelos M2, reforçando, portanto, que os resultados nos grupos tratados denotam a capacidade de tentativa de reparação tecidual em menor espaço de tempo.

Ademais, a resposta inflamatória induzida pela lesão muscular resulta em maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que em níveis elevados podem levar à formação de macromoléculas oxidadas que causam modificações no DNA, lipídios, proteínas e carboidratos. Esses eventos resultam em perda da função e morte de mioblastos e piora da reparação muscular (Duranti, 2023). Portanto considerando a importância do estresse oxidativo na lesão muscular, foram analisadas, neste estudo, a produção de oxidantes, atividade do sistema antioxidante e dano oxidativo.

Os níveis de nitrito e DCF foram usados para avaliar a produção de oxidantes. O nitrito é produto da oxidação de NO e, portanto, utilizado para estimativa indireta dos níveis deste radical livre, secretado por macrófagos, neutrófilos e células endoteliais nos processos inflamatórios (Dusse et al., 2003). Uma ação tóxica cooperativa de NO e O_2^- resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas. O $ONOO^-$ pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio (H^+), originando o radical OH^\bullet , altamente reativo e tóxico, aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O_2^- (Beckman e Koppenol., 1996).

Na análise do nitrito houve um aumento significativo no grupo LM, fato esperado, visto que o trauma gera processo inflamatório no músculo e desencadeia aumento da secreção de NO (Tidball, 2011). Porém, não foi observada diminuição significativa dos níveis de nitrito nos grupos de tratamento. Essa redução do NO seria esperada, uma vez que em todos os grupos de tratamento ocorreu aumento do TGF- β , que, teoricamente, diminuiria a transcrição do receptor de IL-1 β , pela possível síntese de IL-1RA, e impediria também a síntese de NO pelos macrófagos (Zigler et al., 2019). Além desse mecanismo, a supressão da via do NF κ B por fatores de crescimento presentes no PRP poderia reduzir os níveis de IL-1 β (Bendinelli et al., 2010; Montaseri et al., 2011). De fato, ocorreu redução bastante significativa da IL-1 β no grupo tratado com PRP-PL + AH, apoiando tais teorias. No entanto, esse mecanismo isoladamente não foi capaz de reduzir os níveis de nitrito, sugerindo que outras vias de estímulo a secreção de NO não foram suprimidas de forma efetiva.

Porém, é importante ressaltar que o NO produzido pelas células endoteliais está associado a efeitos positivos na regeneração do tecido muscular, tais como manutenção do tônus vascular, prevenção de agregação plaquetária e inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular (Souza Junior et al., 2012). Acredita-se, portanto, que nessa fase da regeneração do tecido muscular, que é altamente vascularizado, os níveis de NO ainda deveriam se manter pouco aumentados para favorecer a perfusão tecidual.

Adiante, a produção intracelular de ERO pode ser detectada utilizando-se os níveis de DCF, produto da oxidação de DCFH por espécies reativas intracelulares (Effiting et al., 2019). Foi observado na análise de DCF que o grupo LM + PRP-PL + AH foi aquele que obteve o melhor controle das ERO. Esse fato pode estar associado ao significativo aumento de GSH nesse grupo de tratamento, além de um provável aumento de outras enzimas como CAT, que não foi testada neste estudo (Martins et al., 2016). Além disso, o AH interage com o receptor CD44 ativando as vias envolvidas na regulação do estado redox celular e na geração de ERO intracelular e também forma um revestimento citoprotetor na membrana celular e, como resultado, protege a célula da apoptose (Litwiniuk et al., 2016).

Na avaliação dos marcadores de dano oxidativo, carbonil e sulfidril foram utilizados como parâmetros para determinação do grau de dano celular ocorrido nos grupos de tratamento e LM. A geração do grupo carbonil é usado como um marcador de oxidação de proteínas mediada por ERO, especialmente sobre os resíduos das

cadeias laterais de aminoácidos lisina, arginina, prolina e treonina (Requena et al., 2001). O complexo formado pelo sulfidril ligado às proteínas pode ser reversivelmente oxidado pelas ERO e dessa forma, o conteúdo de grupos sulfidrila tem sido usado como um avaliador do estresse oxidativo (Di Simplicio et al., 2003). Assim, o aumento de carbonil e a diminuição das sulfidrilas indicam dano oxidativo a proteínas, bem como redução das defesas antioxidantes.

O aumento dos níveis de carbonil no grupo LM em relação ao grupo Sham ocorreu conforme esperado, devido ao estresse oxidativo induzido pela resposta inflamatória associada ao trauma. Por outro lado, nos grupos de tratamento LM + AH e LM + PRP-PL + AH foram observados níveis reduzidos de carbonil indicando um aumento das defesas antioxidantes e menor dano celular. Nesses dois grupos foi observado também, aumento do conteúdo de sulfidrila, que não foi considerado significativo, mas sugere melhor controle do estresse oxidativo (Tohidnezhad et al., 2014; Tognoloni et al., 2023).

As defesas antioxidantes foram avaliadas através da SOD e GSH, que são representantes do sistema enzimático e não enzimático, respectivamente (Simioni et al., 2018). A SOD é composta por uma família de metaloenzimas que através da dismutação do radical superóxido formam H_2O_2 , enquanto o GSH é utilizado como substrato pela glutathiona peroxidase para catalise do H_2O_2 (Di Meo et al., 2019). Na análise da SOD não houve aumento significativo dos níveis dessa enzima. Por outro lado, em todos os grupos de tratamento foi observado aumento da GSH, com maior significância naqueles em que foi utilizado o PRP. Uma provável explicação para esse aumento seria, conforme demonstrado em estudos, a indução da translocação do Fator Nuclear Eritróide 2 (Nrf2) do citoplasma para o núcleo, sob estímulo do PRP, com subsequente ativação do elemento de resposta antioxidante e expressão de diversas enzimas e proteínas com ação antioxidante (Tohidnezhad et al., 2014; Tognoloni et al., 2023).

As análises dos parâmetros avaliados mostram que os grupos de tratamento apresentaram melhor controle do estresse oxidativo e da inflamação inicial. Em todos os grupos observou-se aumento significativo das citocinas anti-inflamatórias avaliadas sugerindo polarização dos macrófagos M1 para M2 e antecipação da fase regenerativa (Wang e Zhou, 2022). Em todos os grupos observou-se, também, aumento significativo dos níveis de GSH, que representa aumento da defesa antioxidante (Di Meo et al., 2019).

Conforme a conjuntura dos dados, destaca-se nas avaliações o grupo tratado com PRP + AH em que se observou, além do aumento de GSH, menor dano oxidativo pela redução bastante significativa de carbonil e níveis reduzidos do marcador oxidativo DCF. Ressalta-se ainda, que esse foi o único grupo de estudo que apresentou redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL1- β), indicando atenuação mais evidente da fase inflamatória e alternância dos macrófagos M1 para M2, uma vez que também foi observado o aumento das citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) (Brown et al., 2014; Wang et al., 2018).

6. CONCLUSÃO

Com base nos parâmetros avaliados neste estudo é possível afirmar que a aplicação de PRP-PL, AH e a combinação PRP-PL + AH possibilitou melhores resultados nas análises realizadas no quinto dia após lesão muscular provocada. Houve melhor controle do estresse oxidativo e atenuação da resposta inflamatória inicial com achados indicando adequada polarização de macrófagos M1 para M2. Esse fato sugere antecipação da fase regenerativa nos grupos de tratamento e direciona para um reparo tecidual eficaz.

Vale ressaltar que, dentre os grupos de tratamento, a associação PRP-PL + AH-BPM apresentou o maior volume de resultados benéficos para o tratamento da lesão muscular tanto no estresse oxidativo quanto no processo inflamatório, indicando, portanto, ação sinérgica para promoção do reparo tecidual. Com isso, apresentando maior indicação como possível modalidade de tratamento para a lesão muscular.

Destaca-se ainda que não foram encontrados estudos na revisão de literatura com associação de ambos ortobiológicos aplicados no tratamento da lesão muscular, o que torna esse estudo pioneiro na abordagem dessa modalidade terapêutica. Apesar do presente estudo evidenciar potencial benéfico e promissor dessas terapias no tratamento da lesão muscular aguda, ainda são necessárias mais pesquisas nessa área para comprovação de eficácia e melhor entendimento dos mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- Aasa U, Svartholm I, Andersson F, Berglund L. Injuries among weightlifters and powerlifters: a systematic review. *Br J Sports Med* 2017;51(04):211–219
- 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.
- Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord*. 2018 Jan;4(1):18-24. doi: 10.1159/000477353. Epub 2017 Jul 6. PMID: 29457008; PMCID: PMC5806188.
- Andia I, Abate M. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(7):987–99.
- Anitua E, Sánchez M, Zaldueño MM, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Proliferation*. 2009;42:162-70
- Anitua E, Muruzabal F, de la Fuente M, Merayo J, Duran J, Orive G. Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Ocular Surface Diseases. *Current eye research*. 2016;41:875-82.
- Andrade BM, Baldanza MR, Ribeiro KC, Porto A, Pecanha R, Fortes FS, et al. Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127561
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204:1057-1069
- 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
- Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 271: C1424-37, 1996.
- Bentzinger C. F., Wang Y. X., Dumont N. A., Rudnicki M. A. (2013a). Cellular Dynamics in the Muscle Satellite Cell Niche. *EMBO Rep*. 14 (12), 1062–1072. 10.1038/embor.2013.182
- Beirão, Marcelo Emílio. Plasma rico em plaquetas e peptídeo inibidor de IL-1 β atenuam o processo inflamatório de lesão muscular em ratos Wistar. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de PósGraduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-kappaB inhibition via HGF. *Journal of cellular physiology*. 2010;225:757-66.

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.

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

Borselli C, Storrie H, Benesch-Lee F, et al. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:3287-92.

Brooks SV, Vasilaki A, Larkin LM, McArdle A, Jackson MJ. Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation. *The Journal of physiology*. 2008;586:3979-90

Brown, B. N., Sicari, B. M., & Badylak, S. F. (2014). Rethinking Regenerative Medicine: A Macrophage-Centered Approach. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00510

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.

Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exercise and sport sciences reviews*. 2009;37:18-22.

Cohen, M., Arliani, G.G., Kaleka, C.C. (2019). Biologic Treatment in Tendon and Muscle Injuries. In: Rocha Piedade, S., Imhoff, A., Clatworthy, M., Cohen, M., Espregueira-Mendes, J. (eds) *The Sports Medicine Physician*. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-030-10433-7_42

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.

Conboy I, Freimer J, Weisenstein L. 5.526 - Tissue Engineering of Muscle Tissue. In: Ducheyne P, ed. *Comprehensive Biomaterials*. Oxford: Elsevier; 2011:345-59.

Cornelison DD. Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;105:663-9

Creaney, L., & Hamilton, B. (2008). Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *British journal of sports medicine*, 42(5), 314–320.

Day A.J., G.D. Prestwich, Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant, *J. Biol.Chem.* 277 (2002) 4585–4588.

DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy.* 2012;28(7):998–1009.

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.

Di Meo S, Napolitano G, Venditti P. Mediators of Physical Activity Protection against ROS-Linked Skeletal Muscle Damage. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 20;20(12):3024. doi: 10.3390/ijms20123024. PMID: 31226872; PMCID: PMC6627449.

Di Simplicio, P., Franconi, F., Frosalí, S. *et al.* Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids* **25**, 323–339 (2003). doi.org/10.1007/s00726-003-0020-1

Dohan Ehrenfest DM, 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;27(3):158–67.

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

Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2009

Duranti, Guglielmo. (2023). Oxidative Stress and Skeletal Muscle Function. *International Journal of Molecular Sciences*, doi: 10.3390/ijms241210227

Dusse, L. M. S., Vieira, L. M., & Carvalho, M. das G.. (2003). Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial*, 39(4), 343–350. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000400012>

Efftig PS, Brescianini SMS, Sorato HR, Fernandes BB, Fidelis GDSP, Silva PRLD, Silveira PCL, Nesi RT, Ceddia RB, Pinho RA. Resistance Exercise Modulates Oxidative Stress Parameters and TNF- α Content in the Heart of Mice with Diet-Induced Obesity. *Arq Bras Cardiol.* 2019 May;112(5):545-552. doi: 10.5935/abc.20190072. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31038529; PMCID: PMC6555563.

Ekstrand J, Hagglund M, Walden M. Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *Am J Sports Med.* 2011;39(6):1226–32.

Evans MD, Cooke MS. Oxidative damage to DNA in non-malignant disease: biomarker or biohazard? *Genome Dyn.* 2006;1:53–66.

Everts, P.; Onishi, K.; Jayaram, P.; Lana, J.F.; Mautner, K. Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7794.

Fernandes TL, Pedrinelli A, Hernandez AJ. Dor na coxa e na perna. In: Nobrega A, editor. *Manual de Medicina do Esporte*. Sao Paulo: Atheneu; 2009:140–141

Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli ML, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(9):2459–74.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* (2011) 12(11):1035–44. doi:10.1038/ni.2109

Gardner T, Kenter K, Li Y. Fibrosis following Acute Skeletal Muscle Injury: Mitigation and Reversal Potential in the Clinic. *J Sports Med (Hindawi Publ Corp)*. 2020 Sep 1;2020:7059057. doi: 10.1155/2020/7059057. PMID: 33376749; PMCID: PMC7745048.

George, J., Christ., Kevin, E., Healy., Juliana, A., Passipieri., Shane, Browne. (2019). Use of a hyaluronic acid-based hydrogel for treatment of volumetric muscle loss injury.

Goossens V, De Vos K, Vercammen D, Steemans M, Vancompernelle K, Fiers W, Vandenaabeele P, Grooten J. Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors*. 1999;10:145–156.

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., “Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life,” *Plant Physiology*, vol. 141, no. 2, pp. 312–322, 2006.

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.

Hernandez AJ. Distensões e rupturas musculares. In: Camanho GL, editor. *Patologia do Joelho*. Sao Paulo: Sarvier; 1996:132–138

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced 64 glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1):214-26.

Huard J, Lu A, Mu X, Guo P, Li Y. Muscle injuries and repair: what’s new on the horizon! *Cells Tissues Organs*. 2016;202(3–4):227–36.

Huiyan, Y., Juan, Z., Mingyu, W., & Ma. (2019). In situ formed collagen-hyaluronic acid hydrogel as biomimetic dressing for promoting spontaneous wound healing. *Materials Science & Engineering, C: Materials for Biological Applications*, 101, 487–498.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:276–285.

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

Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol*. 1999;57:231–245.

Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Aarimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, et al. Lesões musculares: otimizando a recuperação. *Melhores Práticas Res Clin Rheumatol*. 2007;21(2):317–31.

Karna E, Milyk W, Surazyński A, Pałka JA. Protective effect of hyaluronic acid on interleukin-1-induced deregulation of beta1-integrin and insulin-like growth factor-I receptor signaling and collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes. *Mol Cell Biochem*. 2008 Jan;308(1-2):57-64. doi: 10.1007/s11010-007-9612-5. Epub 2007 Sep 25. PMID: 17899316.

Ke, C., Wang, D., Sun, Y., Qiao, D., Ye, H., & Zeng, X. (2013). Immunostimulatory and antiangiogenic activities of low molecular weight hyaluronic acid. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 401–407.

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.

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

Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds*. 2016 Mar;28(3):78-88. PMID: 26978861.

Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*. 2015;11:35-44.

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

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) *J Biol Chem*. 1969;244:6049–6055.

Maffulli N, Oliva F, Frizziero A, et al. ISMuLT Guidelines for muscle injuries. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014;3(04):241–249

Malanga G, Abdelshahed D, Jayaram P. Orthobiologic interventions using ultrasound guidance. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2016;27(3):717–31. Manning MR, Levy RS. Futebol. *Phys Med Rehab Clin N Am*. 2006;17(3):677–95, vii.

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.

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.

Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Dugdale EM, Hansen D, Cote MP, Bradley JP, Romeo AA, Arciero RA, Beitzel K. The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. *Am J Sports Med*. 2012;40:1742–1749.

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

Medical Research Archives, Vol. 5, Issue 6, June 2017. Platelet Rich Plasma: Current Indications and Use in Orthopaedic Care

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.

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 Nº 3 I Ano 27 (2019)*

Montaseri A, Busch F, Mobasher A, et al. IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1beta-induced cartilage degradation through down-regulation of NF-kappaB signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway. *PloS one*. 2011;6:e28663.

Mueller-Wohlfahrt HW, Haensel L, Mithoefer K, et al. Terminology and classification of muscle injuries in sport: the Munich consensus statement. *Br J Sports Med* 2013;47(06):342–350

Nakka k, Hachmer S, Mokhtari Z, Kovac R, Bandukwala H, Bernard C, Li Y, Xie G, Liu C, Fallahi M, Megeney LA, Gondin J, Chazaud B, Brand M, Zha X, Ge K, Dilworth FJ. JMJD3 activated hyaluronan synthesis drives muscle regeneration in an inflammatory environment. *Science*, 2022 Aug 5;377(6606):666-669. doi: 10.1126/science.abm9735. Epub 2022 Aug 4

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.

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

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

Peetrons P. Ultrasound of muscles. *Eur Radiol* 2002;12(01):35–43

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.

Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, et al. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2007;21:1393-402.

Perdiguero E., Sousa-Victor P., Ruiz-Bonilla V., Jardí M., Caelles C., Serrano A. L., et al. (2011). p38/MKP-1-regulated AKT Coordinates Macrophage Transitions and Resolution of Inflammation during Tissue Repair. *J. Cell Biol.* 195 (2), 307–322. 10.1083/jcb.201104053

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1499–1503.

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.

Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:332–340.

Prisk V, Huard J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. *Histology and histopathology.* 2003;18:1243-56.

Qiu Y, Ma Y, Huang Y, Li S, Xu H, Su E. Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights. *Carbohydr Polym.* 2021 Oct 1;269:118320. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118320. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34294332.

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. doi:10.1016/j.rbo.2014.09.002.

Renn TY, Kao YH, Wang CC, Burnouf T. Anti-inflammatory effects of platelet biomaterials in a macrophage cellular model. *Vox sanguinis.* 2015.

Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 2;98(1):69-74. doi: 10.1073/pnas.98.1.69. PMID: 11120890; PMCID: PMC14546.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec 1;49(11):1603-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20840865; PMCID: PMC2990475.

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. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. Robbins, S. L.; Cotran R.S.; Kumar, V.

Rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules*, 5(6), 2122–2127.

Sampson S VH, Aufiero D. *Orthobiologics: A new generation of orthopaedics*. Orthopreneur. 2014.

Sánchez M AE, Andía I. Application of autologous growth factors on skeletal muscle healing. 2nd World Congress on Regenerative Medicine; 2005; Leipzig, Germany

SantAnna JP, Fernandes TL, Pedrinelli A, Hernandez AJ. Lesão muscular: Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento *Rev Bras Ortop* 2022;57(1):1–13.

Serhan C. N., Savill J. (2005). Resolution of Inflammation: the Beginning Programs the End. *Nat. Immunol.* 6 (12), 1191–1197. 10.1038/ni1276

Serrano AL, Mann CJ, Vidal B, Ardite E, Perdiguero E, Munoz-Canoves P. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Current topics in developmental biology*. 2011;96:167- 201.

Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L., Maier, R. V., & Miller, R. J. (2004). Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*,

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.

Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, Neri LM. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*. 2018 Mar 30;9(24):17181-17198. doi: 10.18632/oncotarget.24729. PMID: 29682215; PMCID: PMC5908316.

Singampalli KL, Balaji S, Wang X, Parikh UM, Kaul A, Gilley J, Birla RK, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jul 17;8:636. doi: 10.3389/fcell.2020.00636. PMID: 32850791; PMCID: PMC7396613.

Solchaga, L. A., Dennis, J. E., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (2010). Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 17(2), 205–213.

Souza Junior, T. P., Asano, R. Y., Prestes, J., Sales, M. M., Coelho, J. M., & Simões, H. G. (2012). Nitric oxide and exercise: a review. *Journal of Physical Education*, 23(3), 469-481. doi :10.4025/reveducfis.v23i3.11738

Stern, R., Asari, A. A., & Sugahara, K. N. (2006). Hyaluronan fragments: An informationrich system. *European Journal of Cell Biology*, 85(8), 699–715.

Takebayashi S, Takasawa H, Banzai Y, et al. Sonographic findings in muscle strain injury: clinical and MR imaging correlation. *J Ultrasound Med* 1995;14(12):899–905

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.

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Developmental biology.* 1998;194:114-28.

Tidball JG, Yillalta 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, J. G. (2011). *Mechanisms of Muscle Injury, Repair, and Regeneration. Comprehensive Physiology.* doi:10.1002/cphy.c100092

Tognoloni, A.; Bartolini, D.; Pepe, M.; Di Meo, A.; Porcellato, I.; Guidoni, K.; Galli, F.; Chiaradia, E. Platelets Rich Plasma Increases Antioxidant Defenses of Tenocytes via Nrf2 Signal Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13299. doi.org/10.3390/ijms241713299

Tohidnezhad M, Wruck CJ, Slowik A, et al. Role of platelet-released growth factors in detoxification of reactive oxygen species in osteoblasts. *Bone.* 2014;65:9-17.

Trabucchi, E., Pallotta, S., Morini, M., Corsi, F., & Minghetti, P. (2002). Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. *International Journal of Tissue Reactions*, 24(2), 65–71.

Tsai, W.-C., Yu, T.-Y., Chang, G.-J., Lin, L.-P., Lin, M.-S., & Pang, J.-H. S. (2018). *Platelet-Rich Plasma Releasate Promotes Regeneration and Decreases Inflammation and Apoptosis of Injured Skeletal Muscle. The American Journal of Sports Medicine*, 46(8), 1980–1986. doi:10.1177/0363546518771076

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44–84.

Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MA, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell death & disease.* 2011;2:e211.

Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Suelves M, Ardite E, De Mori R, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev.* 2008;22(13):1747–52.

Vieira ACQM, Medeiros LA, Palácio SB, Lyra MAM, Alves LDS, Rolim LA, Rolim Neto PJ. Fatores de crescimento: uma nova abordagem cosmeceutica para o cuidado antienvhecimento. *Rev. Bras. Farm.* 2011;92(3):80-9.

Vigetti D., A. Genasetti, E. Karousou, M. Viola, P. Moretto, M. Clerici, S. Deleonibus, G. De Luca, V.C. Hascall, A. Passi, Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronansynthase 2 (HAS2) and the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway, *J. Biol.Chem.* 285 (2011) 24639–24645.

Vigetti D., M. Rizzi, P. Moretto, S. Deleonibus, J.M. Dreyfuss, E. Karousou, M. Viola, M. Clerici, V.C. Hascall, M.F. Ramoni, G. De Luca, A. Passi, Glycosaminoglycans and glucose prevent apoptosis in 4-methylumbelliferone-treated human aortic smoothmuscle cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 34497–34503.

Vigetti D., Eugenia Karousou, Manuela Viola, Sara Deleonibus, Giancarlo De Luca, Alberto Passi. Review Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2014) 2452–2459

Wang X, Zhao W, Ransohoff RM, Zhou L. Infiltrating macrophages are broadly activated at the early stage to support acute skeletal muscle injury repair. *J Neuroimmunol.* 2018 Apr 15;317:55-66. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.01.004. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29325905; PMCID: PMC5835410.

Wang X, Zhou L. The Many Roles of Macrophages in Skeletal Muscle Injury and Repair. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jul 11;10:952249. doi: 10.3389/fcell.2022.952249. PMID: 35898401; PMCID: PMC9309511.

Weissmann, B., & Meyer, K. (1954). The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*, 76 (7), 1753–1757.

Williams PN, Moran G, Bradley JP, S ElAttrache N, Dines JS. Platelet-rich plasma and other cellular strategies in orthopedic surgery. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015 Mar;8(1):32-39. doi: 10.1007/s12178-014-9246-7. Erratum in: *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2017 Jul 15;; PMID: 25576070; PMCID: PMC4596183.

Yang H, Song L., Zou Y, Sun D., Wang L., Yu Z., Guo J. Role of Hyaluronic Acids and Potential as Regenerative Biomaterials in Wound Healing. *ACS Applied Bio Materials* 2021 4 (1), 311-324. DOI: 10.1021/acsabm.0c01364

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.

Yibin Qiu, Yanqin Ma , Yanyan Huang a , Sha Li d , Hong Xu d , Erzhen Su. Review Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights. *Carbohydrate Polymers* 269 (2021)

Ziegler CG, Van Sloun R, Gonzalez S, Whitney KE, De Phillipio 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. doi: 10.3390/ijms22063265. PMID: 33806895; PMCID: PMC8005179.