

ADRIANO MARQUES DE ALMEIDA

**Efeito do plasma rico em plaquetas na
regeneração do terço central do ligamento da
patela: estudo prospectivo randomizado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Prof. Dr. Arnaldo José Hernandez

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Adriano Marques de

Efeito do plasma rico em plaquetas na regeneração do terço central do ligamento da patela : estudo prospectivo randomizado / Adriano Marques de Almeida. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Arnaldo José Hernandez.

Descritores: 1.Plasma rico em plaquetas 2.Ligamento da patela
3.Regeneração 4.Substâncias de crescimento

USP/FM/DBD-125/11

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Elizete (*in memoriam*), e ao meu pai, Adiel.

AGRADECIMENTOS

Aos **Profs. Drs. Gilberto Luís Camanho, Olavo Pires de Camargo e Tarcísio E. P. De Barros Filho**, pela oportunidade de realizar este trabalho no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo José Hernandez**, orientador desta dissertação, pelas valiosas lições de vida e de medicina.

Ao **Prof. Dr. Alberto Tesconi Croci**, pela amizade e apoio na execução deste projeto.

Ao **Dr. Marcelo Bordalo Rodrigues**, pelo auxílio na análise dos dados deste trabalho.

Aos **Drs. José Ricardo Pécora, Márcia Uchoa de Rezende e Roberto Freire da Mota e Albuquerque**, pelas críticas e sugestões.

Aos **Drs. André Pedrinelli, Marco Antônio Ambrósio, Julio César C. Nardelli, Thiago Lazaretti Fernandes, Tiago Fruges, Cássio Trevizanni**, pela amizade e colaboração nas diferentes etapas deste projeto.

Ao **Dr. Marco Kawamura Demange**, pela amizade e sugestões.

Ao acadêmico **Marcel Sobrado**, pela colaboração como bolsista de iniciação científica da FAPESP.

Às **Sras. Tânia Borges e Rosana Moreno da Costa** pela dedicação à secretaria do programa de pós-graduação e auxílio neste projeto.

Aos fisioterapeutas **Felix Andrusaitis e Rachel Luz Soares** pela reabilitação dos pacientes.

Aos **Srs. Marcelo Pedro e Antonio Marcos Bergamin Lopes** pela colaboração nos testes isocinéticos.

A **todos os pacientes** que participaram deste projeto, pela colaboração com a ciência médica.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Nomes das estruturas anatômicas baseados na *Nomina Anatômica*, 5ª ed. Rio de Janeiro, 1984.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5ª edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº 6583/2008.

A análise estatística foi realizada com a colaboração de Liliam P. De Lima.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS

LISTAS DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTAS DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Objetivos.....	28
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	30
2.1. História do uso do PRP.....	30
2.2. Métodos de obtenção do PRP e determinação dos fatores de crescimento.....	33
2.3. Aplicação do PRP na medicina esportiva.....	40
2.4. Regeneração do terço central do ligamento da patela após retirada de enxerto.....	47
2.5. Fatores de crescimento e PRP na reparação ligamentar e tendínea.....	51
2.6. Teste isocinético após reconstrução do LCA.....	55
2.7. Questionários de função do joelho.....	56
3. MÉTODOS.....	60
3.1. Aprovação da comissão de ética e consentimento informado.....	60
3.2. Casuística.....	61
3.3. Critérios de inclusão e de exclusão.....	62
3.3.1. Critérios de inclusão.....	62
3.3.2. Critérios de exclusão.....	62
3.4. Randomização.....	63
3.5. Teste isocinético e questionários.....	63
3.6. Procedimento cirúrgico.....	66
3.6.1. Preparação do PRP.....	66
3.6.2. Técnica cirúrgica.....	70
3.6.3. Pós-operatório.....	73

3.7. Ressonância magnética pós-operatória.....	74
3.8. Análise estatística.....	77
4. RESULTADOS.....	80
4.1. Análise estatística da casuística.....	81
4.2. Medidas da ressonância magnética.....	83
4.3. Características do PRP e correlação com a ressonância magnética.....	86
4.4. Teste isocinético.....	89
4.5. Questionários.....	93
5. DISCUSSÃO.....	100
6. CONCLUSÕES.....	114
7. ANEXOS.....	116
Anexo 1: Relação dos pacientes estudados.....	117
Anexo 2: Resultados dos questionários.....	118
Anexo 3: Resultados dos testes isocinéticos.....	119
Anexo 4: Medidas de ressonância magnética.....	120
8. REFERÊNCIAS.....	121

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Medidas descritivas da idade dos pacientes, segundo grupos.....	81
Tabela 2	Distribuição de sexo e lesões associadas, segundo grupos.....	82
Tabela 3	Medidas descritivas para as variáveis de ressonância magnética, segundo grupos.....	84
Tabela 4	Medidas descritivas das características do PRP.....	87
Tabela 5	Medidas descritivas para o déficit do torque 60°/s avaliadas nos momentos pré e pós cirurgia, segundo grupos.....	90
Tabela 6	Medidas descritivas para o déficit do torque 240°/s avaliadas nos momentos pré e pós cirurgia, segundo grupos.....	90
Tabela 7	Valores de p correspondentes aos testes para comparação das médias (efeitos de grupo, momento de avaliação e interação entre estes).....	91
Tabela 8	Medidas descritivas para as respostas ao questionário Lysholm avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos.....	94
Tabela 9	Medidas descritivas para as respostas ao questionário IKDC avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos.....	94
Tabela 10	Medidas descritivas para as respostas ao questionário Kujala avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos.....	95
Tabela 11	Medidas descritivas para as respostas ao questionário Tegner avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos.....	95
Tabela 12	Valores de p correspondentes aos testes dos efeitos de grupo, momento de avaliação e interação entre estes.....	96
Tabela 13	Medidas descritivas relativas à escala visual analógica (EVA) de dor, segundo grupos.....	96

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de fluxo CONSORT detalhando as etapas da pesquisa.....	64
Figura 2	Separador celular <i>Haemonetics</i> MCS+ 9000 utilizado para obtenção do PRP.....	67
Figura 3	Bolsa coletora estéril contendo o PRP.....	68
Figura 4	Alíquota de PRP (10 ml) à qual adicionamos cloreto de cálcio para obtenção de trombina autóloga.....	69
Figura 5	Gel de plaquetas obtido após adição de trombina autóloga e cloreto de cálcio ao PRP.....	69
Figura 6	Sítio de retirada do enxerto no terço central do ligamento da patela.....	72
Figura 7	Adição do gel de plaquetas ao sítio doador de enxerto no ligamento da patela.....	72
Figura 8	Fechamento do peritendão com o gel de plaquetas adicionado ao defeito.....	73
Figura 9	Corte axial da ressonância magnética com área central correspondente ao sítio de retirada do enxerto do ligamento da patela (seta).....	76
Figura 10	Corte sagital da ressonância magnética demonstrando a seleção do ponto médio do ligamento da patela, e também utilizado para medida do índice de Insall-Salvati.....	77
Figura 11	Área não regenerada do terço central do ligamento da patela (mm ²) em ambos os grupos.....	85
Figura 12	Área de secção transversa do ligamento da patela (mm ²) em ambos os grupos.....	85
Figura 13	Valores do índice de Insall-Salvati em ambos os grupos.....	86
Figura 14	Diagrama de dispersão correlacionando a concentração de plaquetas no PRP e a área não regenerada do ligamento da patela.....	88

Figura 15	Diagrama de dispersão correlacionando a concentração de leucócitos no PRP e a área não regenerada do ligamento da patela.....	88
Figura 16	Déficit de pico de torque entre o membro operado e o não operado, a 60°/s.....	92
Figura 17	Déficit de pico de torque entre o membro operado e o não operado, a 240°/s.....	92
Figura 18	<i>Scores</i> dos questionários de Lysholm no pré e pós-operatório, em ambos os grupos.....	97
Figura 19	<i>Scores</i> dos questionários IKDC no pré e pós-operatório, em ambos os grupos.....	97
Figura 20	<i>Scores</i> dos questionários de Kujala no pré e pós-operatório, em ambos os grupos.....	98
Figura 21	<i>Scores</i> dos questionários de Tegner no pré e pós-operatório, em ambos os grupos.....	98
Figura 22	Escala visual analógica de dor (EVA) pós-operatória imediata.....	99

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACS	<i>Autologous conditioned serum</i>
ANOVA	Análise de variância
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
CapPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CONSORT	<i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i>
Dr.	Doutor
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
<i>et al</i>	E outros
EV	Endovenoso
EVA	Escala visual analógica
g	Aceleração da gravidade
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IGF-I	<i>Insulin like growth factor-I</i>
IKDC	<i>International Knee Documentation Committee</i>
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
LCA	Ligamento cruzado anterior
N.S.	Não significativa
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PRGF	<i>Preparation rich in growth factors</i>
PRP	Plasma rico em plaquetas
RPM	Rotações por minuto
rho	Coefficiente de correlação de Pearson
TGF-b	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TGF-b1	<i>Transforming growth factor-beta tipo 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vs	<i>Versus</i>
%	<i>Por cento</i>
%/s	Graus por segundo
®	Marca registrada

cm	centímetro
mm ²	Milímetros quadrados
mm ³	Milímetros cúbicos
=	Igual
<	Menor que
>	Maior que

RESUMO

ALMEIDA AM. *Plasma rico em plaquetas na regeneração do terço central do ligamento da patela: estudo prospectivo randomizado* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 132 p.

INTRODUÇÃO: O plasma rico em plaquetas (PRP) é utilizado em medicina esportiva para aumentar e acelerar o processo de reparação tecidual em lesões tendíneas e ligamentares, no intuito de proporcionar um retorno mais rápido às atividades esportivas. No entanto faltam estudos com alto nível de evidência comprovando sua eficácia no tratamento destas lesões. Com o objetivo de estudar o efeito da aplicação do PRP no sítio doador de enxerto do ligamento da patela para reconstrução do ligamento cruzado anterior (LCA), realizamos ressonância magnética aos seis meses de pós-operatório para avaliar o ligamento da patela. Também aplicamos questionários de função do joelho e realizamos teste isocinético após seis meses da cirurgia. **MÉTODOS:** O presente estudo prospectivo, randomizado, avaliador cego incluiu 27 pacientes. Comparamos doze pacientes em que foi utilizado o PRP no defeito criado no terço central do ligamento da patela para retirada de enxerto com quinze pacientes do grupo controle. Aos seis meses de cirurgia realizamos ressonância magnética, em que foi avaliada a área não regenerada do defeito no terço central do ligamento da patela, a área de secção transversa do ligamento e a altura da patela pelo índice de Insall-Salvati. Realizamos teste isocinético e aplicamos questionários específicos de função do joelho. Quantificamos a dor pós-operatória imediata com escala visual analógica (EVA) de dor. **RESULTADOS:** Aos seis meses de pós-operatório a área não regenerada do defeito no terço central do ligamento da patela foi 4,95 mm² no grupo PRP e 9,38 mm² no grupo controle (p=0,046, teste t de Student). A área de secção transversa do ligamento da patela no grupo PRP foi de 173,05 mm² e no grupo controle 176,29 mm² (p=0,856). O índice de Insall-Salvati nos grupos PRP e controle foi de 1,04 e 1,06, respectivamente (p=0,808). Não houve diferença entre os grupos nos resultados dos questionários e teste isocinético. Nos pacientes em que foi utilizado o PRP houve menos dor pós-operatória imediata (p=0,02). **CONCLUSÃO:** Concluimos, nessa amostra, que o uso do PRP no defeito do terço central do ligamento da patela na reconstrução do LCA, nos primeiros seis meses; determinou maior regeneração do defeito; diminuiu a intensidade da dor pós-operatória imediata; não ocasionou alterações estruturais na avaliação por ressonância magnética; e não modificou os resultados clínicos e funcionais da cirurgia.

DESCRITORES: plasma rico em plaquetas, ligamento da patela, regeneração, substâncias de crescimento.

SUMMARY

ALMEIDA AM. *Platelet-rich plasma in the regeneration of the patellar ligament after harvesting its central third: a prospective randomized study* [dissertation]. "São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 132 p.

INTRODUCTION: Platelet-rich plasma (PRP) has been used in sports medicine to improve and accelerate ligaments and tendons healing, in an effort to provide a faster return to sports activities. However there is a lack of high evidence level studies to support its use. With the purpose to study the effect of PRP, patellar ligament was evaluated six months after harvesting its central third with magnetic resonance imaging (MRI). We also applied specific questionnaires of knee function and isokinetic testing. **METHODS:** This blinded, randomized, prospective study included 27 patients. Twelve patients in whom we added PRP in the patellar ligament after harvesting its central third for ACL reconstruction were compared to fifteen patients in the control group. After six months we evaluated the non-regenerated area of the patellar ligament, the cross section area of the patellar ligament and its length (Insall-Salvati index) with MRI. We also evaluated the results of isokinetic testing and specific questionnaires of knee function. Immediate post-operative pain was evaluated with visual analogical scale (VAS) score. **RESULTS:** The non-regenerated area of the patellar ligament was 4,95 mm² in the PRP group and 9,35 mm² in the control group (p=0,046, Student's t test). The cross section area of the patellar ligament in the PRP group was 173,05 mm² and in the control group 176,29 mm² (p=0,856). The Insall-Salvati index in the PRP and control group was 1,04 and 1,06, respectively (p=0,806). There was no difference between the groups in the questionnaires and isokinetic testing results. PRP group patients had less post-operative pain (p=0,02). **CONCLUSION:** We concluded, in this sample, that the use of PRP in the patellar ligament after harvesting its central third for ACL reconstruction, in the first six months: improved the ligament regeneration; reduced the intensity of immediate post-operative pain; did not cause structural changes in the patellar ligament in MRI; and did not modify the clinical and functional results of the procedure.

DESCRIPTORS: platelet-rich plasma, patellar ligament, regeneration, growth substances.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado plaquetário que possui uma elevada concentração de fatores de crescimento^(1, 2), e vem sendo utilizado em diversas áreas da medicina, como na cirurgia plástica⁽³⁾, oftalmologia⁽⁴⁾ e ortopedia⁽⁵⁻⁸⁾, na expectativa de acelerar o processo de cicatrização, com uma reparação ou regeneração tecidual de melhor qualidade. A reparação e regeneração tendínea e ligamentar são processos complexos, que se iniciam imediatamente após a lesão. Os fatores de crescimento presentes nas plaquetas são importantes nesse processo^(1, 2, 9-13).

Em medicina esportiva, especialmente no esporte de alto desempenho, o objetivo do tratamento das lesões é o retorno seguro ao esporte, no menor tempo possível, sem limitações e com mínimo risco de recidiva. Com esse intuito, o PRP está sendo aplicado em vários tipos de lesões, traumáticas ou por sobrecarga, como lesões tendíneas⁽¹⁴⁻¹⁸⁾, ligamentares⁽¹⁹⁻²²⁾, musculares⁽²³⁾, e de cartilagem⁽⁵⁾.

Diversos métodos de obtenção do PRP são encontrados na literatura, podendo ser basicamente classificados em dois tipos: por centrifugação⁽¹⁾ ou por plaquetaférese⁽¹⁰⁾, que foi o método utilizado nas primeiras descrições do uso do PRP, em cirurgia bucomaxilofacial^(9, 24). O PRP obtido por aférese

possui um volume final maior, maior concentração de plaquetas e menor concentração de leucócitos do que o obtido por centrifugação⁽¹¹⁾. Atualmente, os principais sistemas comercialmente disponíveis obtêm o PRP por centrifugação, devido a menor custo do equipamento e maior facilidade do procedimento⁽¹⁾, embora o PRP obtido por plaquetaférese possa ser considerado mais puro⁽²⁵⁾.

O potencial do PRP em aumentar a capacidade de reparação tecidual é atribuído à presença de uma elevada concentração de fatores de crescimento⁽²⁶⁾, que são proteínas armazenadas em organelas citoplasmáticas denominadas alfa-grânulos⁽²⁷⁾. Além dos alfa-grânulos, as plaquetas também carregam os grânulos densos, que possuem substâncias como histamina, serotonina, dopamina e catecolaminas, que podem ser responsáveis por alguns efeitos observados no PRP, como analgesia⁽²⁸⁾. Uma vez que se inicia a cascata da coagulação, a trombina presente no plasma ativa as plaquetas, que se agrupam para formação do coágulo e liberam os grânulos citoplasmáticos⁽²⁷⁾.

Diversos fatores de crescimento foram identificados no PRP, como o fator de crescimento de transformação-beta (TGF- β - *transforming growth factor-beta*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF - *platelet derived growth factor*), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF - *basic fibroblast growth factor*), fator de crescimento derivado de insulina do tipo I (IGF-I - *insulin like growth factor-I*), fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*) e fator de crescimento epidérmico (EGF - *epidermal growth factor*)^(1, 10-12).

Foram relatados *in vitro* e *in vivo* efeitos do PRP e fatores de crescimento em tendões e ligamentos, como estimulação da proliferação de fibroblastos por IGF-I, bFGF e PDGF, e síntese de colágeno e matriz extracelular pelo TGF- β ^(26, 29-31), resultando experimentalmente em uma maior regeneração e aumento da resistência e rigidez tecidual^(32, 33).

Estes resultados experimentais, associado ao fato de que o uso do PRP praticamente não está associado a complicações⁽³⁴⁾, encorajam o uso do PRP em seres humanos. Os ensaios clínicos empregando o PRP em tendões e ligamentos, como roturas do tendão calcâneo⁽¹⁵⁾, tendinopatia patelar^(16, 17) e do calcâneo⁽¹⁸⁾, epicondilite do cotovelo⁽¹⁴⁾, e lesões do ligamento cruzado anterior (LCA)^(20, 21) geraram resultados conflitantes, dependendo do tipo de estudo e do desfecho avaliado. Grande parte não são estudos prospectivos ou randomizados, e desta forma seu nível de evidência é limitado.

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

A retirada de enxerto do ligamento da patela é um procedimento padronizado, em que um defeito é criado no terço central do ligamento. Este ligamento tem sido frequentemente utilizado como fonte de enxerto em reconstruções do LCA. A evolução pós-operatória desse defeito é bem documentada na literatura⁽³⁵⁻³⁷⁾, com estudos por ressonância magnética seriada⁽³⁸⁻⁴¹⁾ e até mesmo histológicos^(42, 43). Observa-se uma redução progressiva do defeito, que persiste por vários anos^(40, 41). O tecido regenerado apresenta matriz extracelular heterogênea, fibras colágenas desorganizadas, hiper celularidade, e propriedades mecânicas inferiores^(43, 44).

Em animais, foi demonstrado que o uso de fatores de crescimento isolados ou do PRP aumentou a regeneração do terço central do ligamento da patela tanto *in vitro* como *in vivo*⁽⁴⁵⁾. Foi demonstrado um aumento da proliferação celular e da síntese de colágeno do tipo III com bFGF⁽⁴⁶⁾ e um aumento da força tênsil do ligamento com TGF- β ⁽³³⁾. O PRP apresenta uma concentração de fatores de crescimento três a cinco vezes maior que a do sangue, mas estes fatores permanecem em proporções fisiológicas entre si, balanceando seus efeitos isolados⁽⁴⁷⁾. Além disso, os fatores de crescimento isolados, obtidos por purificação ou por tecnologia recombinante, são utilizados em doses muito elevadas nos modelos experimentais⁽²⁸⁾.

Este é um trabalho inédito, com o objetivo de avaliar o efeito do PRP na regeneração do ligamento da patela, utilizando como modelo

experimental o sitio doador de enxerto para reconstrução do LCA. Como desfecho secundário, avaliamos os resultados clínicos e funcionais do procedimento utilizando questionários específicos e teste isocinético.

1.1. Objetivos

O objetivo primário deste trabalho é avaliar o efeito do PRP na regeneração do terço central do ligamento da patela. Utilizamos como modelo experimental o sitio de retirada de enxerto para reconstrução do ligamento cruzado anterior do joelho. Realizamos um estudo prospectivo, randomizado, avaliador cego. Medimos a área do defeito no terço central do ligamento da patela, área de secção transversa do ligamento e altura da patela na ressonância magnética seis meses após a cirurgia.

O objetivo secundário é avaliar a influência do uso do PRP no ligamento da patela nos resultados clínicos e funcionais da cirurgia. Avaliamos a dor pós-operatória imediata, os resultados da cirurgia com o emprego de questionários específicos de função do joelho e a força muscular com teste isocinético aos seis meses de pós-operatório.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. História do uso do PRP

A utilização do PRP em procedimentos cirúrgicos ocorreu inicialmente em 1997 com Whitman *et al*⁽²⁴⁾ em cirurgias bucomaxilofaciais. O PRP, então denominado gel de plaquetas, foi utilizado como uma alternativa à cola de fibrina. Segundo estes autores, as vantagens do uso do PRP sobre a cola de fibrina seriam a origem completamente autóloga e a presença de fatores de crescimento nas plaquetas, que auxiliariam na regeneração tecidual.

Em 1998, Marx *et al*⁽⁹⁾ aprofundaram os estudos sobre o uso de PRP em reconstruções mandibulares. Observaram um amadurecimento cerca de duas vezes mais rápido do enxerto ósseo quando associado ao PRP. Utilizando anticorpos monoclonais, determinaram os fatores de crescimento presentes nas plaquetas, assim como os receptores para estes fatores de crescimento nas células do enxerto ósseo utilizado.

Ainda em 1998, Landesberg⁽³⁴⁾ avaliou os riscos associados à utilização do PRP. Por se tratar de produto autólogo, o risco de reação imunogênica deveria estar praticamente eliminado. Porém, quando se utiliza

trombina bovina para ativar as plaquetas, há a possibilidade de formação de anticorpos contra fatores de coagulação, o que acarretou no desenvolvimento de coagulopatias graves em alguns casos. Isto pode ser evitado com o uso de outras substâncias para ativação das plaquetas, como cloreto de cálcio ou trombina autóloga, como realizado na maior parte dos procedimentos atuais.

A partir destes estudos iniciais, foi relatada a utilização do PRP em diversas áreas da medicina. Em 1999, Gehring *et al*⁽⁴⁾ utilizando o PRP no tratamento oftalmológico de úlceras maculares, observaram que o PRP foi bastante eficaz na cicatrização das úlceras e provocou melhora da acuidade visual na maior parte dos pacientes.

Man *et al*⁽³⁾, em 2001, observaram redução do sangramento perioperatório em cirurgias plásticas com a utilização do PRP. Segundo os autores, esta é uma técnica segura, de custo moderado, de fácil aplicação, com baixo risco e alto benefício potencial para melhorar os resultados das cirurgias.

Em um dos primeiros relatos na área ortopédica, Sanchez *et al*⁽⁵⁾, em 2003, relataram a utilização de um concentrado de plaquetas obtido por centrifugação em uma única etapa, denominado pelos autores de preparado rico em fatores de crescimento (PRGF - *preparation rich in growth factors*), para tratar uma avulsão de cartilagem articular do joelho. Os autores fixaram

o fragmento avulsionado com pinos absorvíveis, e preencheram as lacunas existentes entre o fragmento e o leito receptor com PRGF. Observaram uma boa integração da cartilagem e excelente resultado clínico, com o paciente retornando totalmente a suas atividades após 18 semanas.

Carreon *et al*⁽⁶⁾, em 2005, avaliaram o efeito do PRP em artrodeses de coluna em dois grupos retrospectivos de 76 pacientes, em que o PRP foi associado ou não a enxerto ósseo autólogo. Não observaram diferença entre os grupos com relação à incidência de pseudoartrose.

Gardner *et al*⁽⁷⁾, em 2007, em um estudo que envolveu 98 pacientes, avaliaram o efeito do PRP em artroplastias totais do joelho. Observaram menor sangramento perioperatório, melhor controle da dor, melhor recuperação funcional e alta hospitalar mais rápida nos pacientes em que foi utilizado o PRP.

Em 2008, Anitua *et al*⁽⁴⁸⁾ avaliaram o efeito do PRGF na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas. Realizaram um estudo randomizado com 14 pacientes, divididos em dois grupos. Nos pacientes do grupo experimental, que receberam PRGF, houve uma taxa de cicatrização maior das úlceras do que no grupo controle.

Galasso *et al*⁽⁸⁾, em 2008, estudaram o tratamento de pseudoartroses atróficas de ossos longos com hastes intramedulares e injeção de PRP no

sítio da pseudoartrose. Em uma série de casos com 22 pacientes, observaram consolidação óssea em 91% dos casos em um prazo médio de 21 semanas.

2.2. Métodos de obtenção do PRP e determinação dos fatores de crescimento

Os trabalhos publicados sobre PRP utilizam diferentes métodos para sua obtenção. Em muitos destes trabalhos o processo de obtenção do PRP e a concentração de plaquetas não estão bem detalhados. Muitos sistemas utilizados comercialmente para se obter o PRP são patenteados e não são descritos em detalhes. A própria nomenclatura utilizada é bastante variada e algumas vezes confusa. Isso dificulta muito a comparação entre os trabalhos. Desta forma, consideramos adequada uma revisão da literatura sobre os diversos métodos utilizados para se obter PRP.

Em um trabalho considerado pioneiro na utilização de PRP em procedimentos cirúrgicos, Whitman *et al*⁽²⁴⁾, em 1997, descreveram a obtenção de PRP, denominado em seu artigo como gel de plaquetas. Utilizaram um separador celular para autotransusão intra-operatória (*cell saver*). Foram obtidos 450 ml de sangue por punção venosa periférica, em um saco coletor contendo citrato como anticoagulante. Uma primeira

centrifugação a 5 600 rotações por minuto (RPM) foi realizada para separar os glóbulos vermelhos e outros componentes celulares do plasma, e em seguida uma segunda centrifugação, a 2 400 RPM, para separar os glóbulos vermelhos do plasma-rico em plaquetas. A ativação das plaquetas foi feita com trombina bovina e cloreto de cálcio. Segundo o autor, esta técnica permitiu uma concentração de plaquetas de 500 000/mm³ a 1 000 000/mm³. Os outros componentes do sangue não utilizados (plasma e glóbulos vermelhos) foram devolvidos ao paciente. A mesma técnica foi utilizada por Marx *et al*⁽⁹⁾.

Em 2000, Landesberg *et al*⁽¹⁾ descreveram a obtenção do PRP com uma centrífuga, considerando que este método apresenta como vantagens o menor custo e a maior facilidade de utilização. Realizaram duas etapas de centrifugação, sendo que na primeira etapa as hemácias eram separadas do plasma. O plasma era então transferido para outro tubo e na segunda etapa o plasma-rico em plaquetas era separado do plasma-pobre em plaquetas. Observaram também que com o uso do EDTA as plaquetas apareciam danificadas à observação microscópica, devido a lesão de sua membrana, preferindo então o citrato de sódio para anticoagulação. Observaram uma melhor concentração de plaquetas com duas centrifugações a 200g por 10 minutos. Nesse estudo, a concentração de plaquetas em relação aos níveis basais foi de 229%. Identificaram a presença de uma grande concentração de TGF- β 1 e PDGF no PRP, sendo que no plasma a concentração destes fatores foi mínima. Os autores condenaram a utilização de trombina bovina

para ativação das plaquetas devido ao risco de coagulopatias pela formação de anticorpos contra fatores de coagulação.

Considerando que os níveis de concentração plaquetária obtidos por Landesberg *et al*(1) não eram ideais, Efeoglu *et al*(2), em 2004, sugeriram uma modificação da técnica para obter uma maior concentração de plaquetas. Utilizando sangue de coelhos, realizaram duas etapas de centrifugação, a primeira a 300g por 10 minutos e a segunda a 5000g por cinco minutos, e obtiveram um aumento de 429% na concentração de plaquetas.

A presença de fatores de crescimento no PRP e sua correlação com idade, sexo, e concentração de plaquetas foram estudadas por Weibrich *et al*(10) em 2002. O PRP foi obtido com um separador celular por gradiente de densidade para plaquetaférese, semelhante ao utilizado no presente estudo. Coletaram amostras de sangue de 213 voluntários, sendo 158 homens e 55 mulheres. Retiraram de 400 a 450 ml de sangue por punção venosa periférica, e utilizaram citrato-fosfato-dextrose como anticoagulante (1 ml de anticoagulante para cada 5 ml de sangue). Com o separador celular, os componentes do sangue foram divididos em diferentes bolsas em glóbulos vermelhos, plasma e PRP. Ao final do processo o plasma e os glóbulos vermelhos retornavam à circulação do paciente. Com este método obtiveram uma concentração média de plaquetas de 1 407 000/mm³, o que correspondeu a um aumento de cinco vezes a concentração inicial de

plaquetas. A concentração de plaquetas no PRP apresentou correlação positiva com a concentração de plaquetas no sangue periférico ($\rho = 0,77$). A concentração de fatores de crescimento apresentou uma fraca correlação positiva com a concentração total de plaquetas no PRP ($\rho = 0,35$). O IGF-I foi o único fator de crescimento que apresentou correlação com a idade, com menor concentração em idades mais avançadas.

Em 2003, Weibrich *et al*⁽¹¹⁾ compararam os concentrados de plaquetas obtidos por centrifugação e por plaquetaférese. Observaram no PRP obtido por aférese uma concentração de plaquetas cinco vezes maior do que no sangue periférico, comparado com um aumento de três vezes no PRP obtido por centrifugação. A concentração de leucócitos no PRP obtido por aférese foi cerca de 40 vezes menor do que a observada no sangue total, enquanto no PRP obtido por centrifugação foi cerca de cinco vezes maior. Com relação aos níveis de fatores de crescimento, todos os fatores de crescimento analisados (TGF- β 1, IGF-I e PDGF) estavam aumentados em ambos os concentrados, porém o TGF- β 1 foi o fator de crescimento predominante no PRP obtido por aférese, enquanto o PDGF foi o fator dominante no PRP obtido por centrifugação. Os níveis de IGF-I não apresentaram correlação com a concentração de plaquetas. Os autores concluíram que a fonte principal de TGF- β 1 seriam as plaquetas, os leucócitos seriam a fonte principal de PDGF e o IGF-I seria localizado predominantemente no plasma.

Em 2004, Eppley *et al*⁽¹²⁾ descreveram um método de obtenção do PRP com um processo de centrifugação única. A partir de 55 ml de sangue adicionado a 5 ml de citrato, realizaram centrifugação por 12 minutos a 3 200 RPM. Obtiveram uma concentração média de plaquetas de 1 603 000/mm³, o que representou um aumento de cerca de oito vezes em relação à concentração de plaquetas no sangue total. A concentração de plaquetas foi associada também a aumento na concentração de leucócitos. Os níveis de fatores de crescimento no PRP estavam aumentados com relação ao sangue total. Observaram um grande aumento nos níveis de PDGF, TGF-b1, VEGF e EGF, porém não observaram aumento significativo nos níveis de IGF-1.

Sobre a concentração ideal de plaquetas no PRP para obtenção de um efeito ótimo, Weibrich *et al*⁽⁴⁹⁾, em 2004, estudaram o efeito da concentração de plaquetas na regeneração óssea em coelhos. Observaram que uma concentração média de plaquetas de 1 000 000/mm³ foi a que apresentou melhores resultados, enquanto concentrações mais elevadas apresentaram um efeito inibitório sobre a regeneração óssea.

Técnica semelhante foi utilizada por Anitua *et al*⁽¹³⁾, em 2005, que descreveram um método de obtenção de PRP por uma única etapa de centrifugação, e denominaram sua técnica de PRGF (*preparation rich in growth factors*). Segundo a descrição dos autores, são retirados 18 a 27 ml de sangue venoso por acesso venoso periférico e dividido em tubos de 4,5

ml, contendo citrato de sódio a 3,8%. O sangue então é centrifugado a 460 g por oito minutos. Separa-se a fração do sangue localizada exatamente acima das hemácias (*buffy coat*), correspondente ao plasma rico em plaquetas, e adiciona-se 50 microlitros de cloreto de cálcio a 10% para ativação. Com esta técnica, os autores obtiveram um aumento de duas a três vezes na concentração de plaquetas.

Borzini e Mazzucco⁽²⁷⁾, em 2005, publicaram artigo de revisão tentando esclarecer a nomenclatura utilizada nos derivados plaquetários, definindo como PRP a concentração de plaquetas pura (não ativada) e o gel de plaquetas como fruto da ativação de fibrinogênio em fibrina, quando adicionados trombina e cálcio.

Comparando as diferenças nas propriedades do PRP em diferentes espécies, Van den Dolder *et al*⁽⁵⁰⁾, em 2006, pesquisaram a presença de fatores de crescimento no PRP obtido de ratos, ovelhas e humanos. Analisaram a presença de TGF- β 1 e PDGF e observaram que o PRP humano apresenta a maior concentração de fatores de crescimento em relação aos animais estudados. Isto representa uma variação significativa entre as espécies e pode influir nos resultados de estudos experimentais. O TGF- β 1 foi o fator de crescimento encontrado em maior concentração nas três espécies estudadas.

Everts *et al*⁽⁵¹⁾, em 2006, avaliaram diferentes métodos de obtenção do PRP com relação à concentração de plaquetas, concentração de leucócitos e liberação de fatores de crescimento. Observaram que a concentração de plaquetas era significativamente maior no PRP obtido por separação celular do que no obtido por centrifugação, porém a concentração de leucócitos era semelhante, consistindo principalmente de monócitos e linfócitos, seguidos de neutrófilos. A concentração de fatores de crescimento PDGF e TGF- β foi maior no PRP obtido por aférese. Com a formação do gel de plaquetas, a concentração de leucócitos no sobrenadante diminuiu drasticamente, pois os leucócitos aderem à malha de fibrina do gel. Segundo os autores, a presença de leucócitos pode alterar as propriedades do PRP, devido à presença de mieloperoxidase, que tem atividade pró-inflamatória e bactericida.

Em 2008, Mazzucco *et al*⁽⁵²⁾ utilizaram um sistema de dupla centrifugação para obtenção do PRP. Esse sistema diferencia-se pela adição de batroxobina no lugar de trombina, para formação do gel. A batroxobina catalisa a reação do fibrinogênio em fibrina sem ativar as plaquetas, e desta forma há formação do gel sem a liberação rápida dos fatores de crescimento.

Devido à grande quantidade de sistemas disponíveis para obtenção do PRP, Ehrenfest *et al*⁽⁵³⁾, em 2009, propuseram uma classificação dos concentrados plaquetários. Segundo os autores, estes sistemas diferenciam-

se basicamente devido ao tipo de equipamento utilizado, volume final obtido e concentração de plaquetas, presença de leucócitos, e formação de malha de fibrina. Desta forma, classificaram o PRP em quatro tipos: PRP puro (P-PRP), como é o caso da aférese; PRP rico em leucócitos (L-PRP), como é o caso dos concentrados obtidos por centrifugação; fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF) e fibrina rica em plaquetas rica em leucócitos (L-PRF). Esta classificação, se adotada, pode ajudar na melhor avaliação e comparação do trabalhos.

2.3. Aplicação do plasma rico em plaquetas na medicina esportiva

Na área de medicina e traumatologia desportivas, a proposta de um tratamento que visa acelerar a regeneração das lesões, com um tecido regenerado de melhor qualidade, e com poucas complicações é sem dúvida muito atraente. Com isto almeja-se o objetivo final de qualquer tratamento em atletas, que é o retorno pleno ao esporte no menor tempo possível com ausência de recidivas. Com este objetivo alguns trabalhos foram descritos com o uso do PRP em medicina esportiva.

Em 2004, Wright-Carpenter *et al*⁽²³⁾ trataram 18 pacientes com lesões musculares utilizando o ACS (*autologous conditioned serum*), e compararam com um grupo controle de 11 pacientes, em um estudo não-prospectivo e

não-randomizado. O ACS, apesar de não ser um concentrado de plaquetas, também é rico em fatores de crescimento. Este é um dos poucos estudos publicados sobre o uso de fatores de crescimento em lesões musculares em seres humanos. Foi observada uma recuperação precoce nos pacientes tratados com ACS em relação ao grupo controle.

Em 2006, Mishra e Pavelko⁽¹⁴⁾ avaliaram um grupo de 20 pacientes com tendinose crônica do cotovelo. Foi infiltrado PRP em 15 pacientes e em cinco outros pacientes foi infiltrada bupivacaína. Comparando os resultados do tratamento com relação à dor e *scores* funcionais, observaram diferença estatisticamente significativa, a favor do PRP, quanto à melhora da dor após quatro e oito semanas, e quanto ao aumento do *score* funcional, após oito semanas. Neste artigo, que segundo os autores é o primeiro estudo *in vivo* com o PRP no tratamento de tendinose crônica do cotovelo, concluíram que o PRP pode ser uma alternativa ao tratamento cirúrgico em pacientes com este problema. Porém admitiram que o pequeno número de pacientes e a ausência de randomização são limitações importantes neste estudo.

Em 2007, Sanchez *et al*⁽¹⁵⁾ utilizaram PRP em seis pacientes com ruptura do tendão calcâneo tratados cirurgicamente, e compararam os resultados funcionais com seis casos operados previamente, sem o uso do PRP. Observaram que nos casos em que o PRP foi utilizado houve recuperação mais rápida do movimento articular e retorno precoce às atividades esportivas. Concluíram que o PRP pode representar uma nova

possibilidade para acelerar a cicatrização e recuperação funcional após lesões tendíneas, porém consideraram a necessidade de estudos clínicos randomizados.

O primeiro ensaio clínico randomizado sobre o uso do PRP em rupturas completas do tendão calcâneo foi publicado em 2011, por Schepull *et al*⁽⁵⁴⁾. Os desfechos avaliados foram o módulo de elasticidade após sete semanas e avaliações funcionais após um ano. Não observaram diferença entre os grupos no módulo de elasticidade e observaram um possível efeito deletério do PRP nos resultados funcionais após um ano. Nota-se neste estudo uma concentração média de plaquetas no PRP cerca de 10 vezes maior do que no sangue periférico, bastante elevada comparada a estudos semelhantes.

Em 2008, Maniscalco *et al*⁽⁵⁵⁾ descreveram, em um relato de caso, o uso do PRP em forma de gel na reparação de uma lesão maciça do manguito rotador, como alternativa à transposição tendínea. Observaram cicatrização completa da lesão após seis meses.

Creaney e Hamilton⁽⁴⁷⁾, em 2008, publicaram uma revisão sobre o uso do PRP em medicina esportiva. Concluíram que o uso do PRP e as tecnologias para sua obtenção ainda estão em fase incipiente, mas o PRP pode ser uma importante modalidade terapêutica para o tratamento de lesões de ligamento, músculo e tendão em atletas. O PRP é considerado

doping pelas regras vigentes no momento deste estudo, podendo ser utilizado em situações restritas. Segundo os autores, entretanto, a quantidade de fatores de crescimento encontradas no PRP não é suficiente para ter efeitos sistêmicos. Cita como exemplo o IGF-I, cuja dose necessária para um efeito anabolizante é 500 vezes maior do que a observada no PRP.

Em 2009, Silva e Sampaio⁽¹⁹⁾ avaliaram o uso do PRP na integração tendão-osso em reconstruções do LCA em dupla-banda com tendões semitendinoso e gracilis. Quarenta pacientes foram avaliados e divididos em quatro grupos: A: sem PRP; B: com PRP adicionado ao túneis femorais no intra-operatório; C: com PRP adicionado aos túneis femorais no intra-operatório e intra-articular após duas e quatro semanas; D: PRP ativado com trombina autóloga adicionado aos túneis femorais no intra-operatório. Utilizando ressonância magnética, avaliaram a intensidade de sinal nos túneis após três meses, e não observaram diferença entre os grupos.

Em 2009, Nin *et al*⁽²⁰⁾ estudaram o uso do PRP na reconstrução do LCA com aloenxerto de ligamento da patela. Em um estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, avaliaram cem pacientes, divididos em dois grupos, em que foi utilizado ou não o PRP adicionado ao enxerto e ao túnel tibial. Foram avaliados parâmetros clínicos (escala visual analógica de dor, IKDC, presença de derrame articular, avaliação da estabilidade articular) e radiológicos por ressonância magnética. Não observaram diferença significativa entre os grupos.

Em 2009, Kon *et al*⁽¹⁶⁾ realizaram um estudo piloto em uma série de casos com 20 pacientes para avaliar os resultados do PRP na tendinopatia patelar crônica. Segundo os autores, este é o primeiro estudo *in vivo* sobre o uso do PRP nesta condição. Realizaram três infiltrações com intervalo de 15 dias entre cada uma delas. Observaram melhora dos resultados funcionais em todos os casos, e não observaram nenhuma complicação. Concluíram que o PRP é uma forma de tratamento segura e promissora para o tratamento de tendinopatia patelar, porém ressaltaram a necessidade de ensaios clínicos randomizados antes de recomendá-lo amplamente.

Ainda em 2009, Filardo *et al*⁽¹⁷⁾ avaliaram o uso do PRP no tratamento de tendinopatia patelar crônica. Compararam 15 pacientes com tendinopatia patelar crônica, refratária ao tratamento conservador, com um grupo controle de 16 pacientes com tendinopatia patelar, não submetidos a tratamento prévio. Os pacientes com tendinopatia patelar crônica refratária foram tratados com PRP associado a exercícios excêntricos, enquanto os pacientes com tendinopatia patelar de início recente, não submetidos a tratamento prévio, foram tratados apenas com exercícios excêntricos. Ambos os grupos melhoraram com relação à dor e nível de atividade. Comparando os grupos, observaram melhora significativa no nível de atividades esportivas no grupo PRP, quando comparado ao grupo controle. Segundo os autores, este efeito provavelmente se deve a um aumento do potencial de cicatrização do tendão, porém ressaltaram a necessidade de estudos de histologia e de imagem para verificar esta afirmação.

Em 2010, de Vos *et al*⁽¹⁸⁾ avaliaram a eficácia do PRP para o tratamento de tendinopatia crônica do tendão calcâneo. Em um estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, compararam 27 pacientes em que foi utilizada uma infiltração de PRP, com 27 pacientes em que foi infiltrada solução salina. Ambos os grupos foram também tratados com exercícios excêntricos. Não observaram diferença estatisticamente significante entre os grupos com relação a dor e atividade. Na conclusão deste trabalho, não recomendaram o PRP para o tratamento da tendinopatia crônica do tendão calcâneo. Também em 2010, de Vos *et al*⁽⁵⁶⁾, publicaram revisão sistemática sobre o uso do PRP em tendinopatias crônicas, concluindo que há evidências limitadas sobre a eficácia do PRP nessas condições, devido a metodologia inadequada dos poucos estudos existentes sobre o assunto. Concluíram que há necessidade de “mais estudos com grupo controle adequado, randomização, avaliação cega e medidas de resultado para dor e função validadas e específicas”.

Em outra revisão sobre o assunto, não-sistemática, Lopez-Vidriero *et al*⁽⁵⁷⁾, em 2010, concluíram que as “tecnologias do PRP abriram uma nova porta para o tratamento de lesões de partes moles”, com resultados promissores nos campos da artroscopia e medicina esportivas. Porém afirmaram que há necessidade de mais estudos sobre os princípios básicos da influência do PRP na cicatrização tecidual e das diferenças nas várias preparações de PRP.

Em 2010, Sánchez *et al*⁽²²⁾ publicaram um estudo em que realizaram *revisão* artroscópica (*second-look*) após seis meses a dois anos em 37 pacientes submetidos previamente a reconstrução do LCA. Vinte e dois destes pacientes haviam sido tratados com PRP adicionado ao enxerto de tendões flexores autólogos, enquanto os outros 15 pacientes haviam sido tratados com a reconstrução convencional com tendões flexores autólogos. Avaliaram o aspecto macroscópico e tensão do enxerto e realizaram biópsia do enxerto para estudo histológico. Não observaram diferença significativa entre os grupos quanto ao aspecto macroscópico do enxerto. No estudo histológico, porém, observaram maior maturação do enxerto tratado com PRP.

Em 2010, Radice *et al*⁽²¹⁾ avaliaram os resultados da utilização do PRP na reconstrução do LCA, em um estudo prospectivo, avaliador-cego, não randomizado. Cinqüenta pacientes foram incluídos neste estudo, submetidos a reconstrução do LCA com enxerto autólogo de ligamento da patela ou isquiotibiais, e divididos em dois grupos, em que foi utilizado ou não o PRP no enxerto. Realizaram exames seriados de ressonância magnética, entre três meses e um ano após a cirurgia, e avaliaram a homogeneidade do enxerto. Observaram que no grupo em que foi utilizado PRP o enxerto tornou-se homogêneo em um período de tempo 48% menor do que no grupo controle (179 *versus* 369 dias, respectivamente).

2.4. Regeneração do terço central do ligamento da patela após retirada de enxerto

Com a popularização da reconstrução do LCA com enxerto autólogo do ligamento da patela, a regeneração do tendão no local de retirada de enxerto foi motivo de várias publicações. Complicações graves decorrentes da retirada do enxerto, como a ruptura do ligamento da patela, são raras, segundo afirmaram Mickelsen *et al*⁽⁵⁸⁾, em 2001. Lee *et al*⁽⁵⁹⁾ avaliaram 1 725 pacientes com seguimento de até 20 anos após retirada de enxerto do terço central do ligamento da patela, e observaram ruptura do ligamento em três pacientes, o que corresponde a 0,2% dos casos. Os trabalhos encontrados na literatura que estudaram a regeneração do ligamento da patela após retirada do terço central serão apresentados a seguir em ordem cronológica.

Em 1992, Berg⁽³⁵⁾ relatou o caso de um paciente reoperado oito meses após reconstrução do LCA com enxerto do terço central do ligamento da patela. Após a retirada do enxerto o defeito foi mantido aberto, ou seja, o tendão não foi suturado, apenas o peritendão. A ressonância magnética e o exame histológico demonstraram, após oito meses, o preenchimento do defeito no ligamento com tecido colágeno, com hipertrofia do ligamento da patela doador.

As alterações morfológicas do ligamento da patela após retirada de enxerto do terço central foram avaliadas por Meisterling *et al*⁽³⁶⁾, em 1993. Quinze pacientes submetidos a reconstrução do LCA com ligamento da patela, com um seguimento médio de 30 meses, foram estudados com ressonância magnética bilateral. Comparando o ligamento da patela do joelho operado com o não operado, em relação ao comprimento, largura e espessura do tendão, não encontraram diferença entre os grupos. Não referiram, porém, qualquer dado relacionado ao defeito criado no tendão no local doador do enxerto.

Hernandez *et al*⁽³⁷⁾, em 1993, avaliaram por ultrassonografia os ligamentos da patela de 11 pacientes submetidos a reconstrução ligamentar do joelho com terço central do ligamento da patela, em um período pós-operatório entre 10 dias e 30 meses e identificaram o preenchimento progressivo do defeito na área doadora a partir de três semanas de pós-operatório.

Posteriormente alguns estudos avaliaram a evolução pós-operatória do defeito criado no ligamento da patela, bem como do ligamento em si, por ressonância magnética seriada. Em 1998, Bernicker *et al*⁽³⁸⁾ realizaram ressonância magnética em 12 pacientes, com três semanas, seis semanas, seis meses e um ano após reconstrução do LCA com o terço central do ligamento da patela. Observaram aos seis meses um defeito no ligamento com cerca de seis milímetros de largura. Houve um declínio progressivo da

largura do defeito criado no local doador do enxerto, declínio este que atingiu uma média de 61% com um ano de pós-operatório, mas não observaram o fechamento completo do defeito neste período.

Com o mesmo propósito, Kartus *et al*⁽³⁹⁾, em 1999, realizaram ressonância magnética seriada com seis semanas, seis meses e dois anos em pacientes nos quais o ligamento da patela havia sido utilizado com fonte de enxerto. Observaram a persistência de um defeito no local doador de cerca de nove milímetros após seis meses, e dois milímetros após dois anos, além de espessamento e alargamento do ligamento da patela como um todo.

Em 2000, Kartus *et al*⁽⁴²⁾ estudaram o tipo histológico do tecido cicatricial na área doadora do enxerto em humanos, em estudo histopatológico *in vivo* associado a ressonância magnética seriada. Dezenove pacientes foram submetidos a biópsia guiada por ultrassonografia com uma média de 26 meses de pós-operatório. Foram também avaliados por ressonância magnética com cerca de seis semanas, seis meses e 26 meses de pós-operatório. A análise histopatológica demonstrou um aumento de celularidade e vascularização do tecido cicatricial, com alteração da estrutura das fibras do ligamento, as quais apresentavam aspecto heterogêneo e desorganizado das fibras colágenas, quando comparadas à organização paralela das fibras do grupo controle. A ressonância magnética seriada demonstrou um defeito médio de cinco milímetros de largura aos

seis meses, e dois milímetros de largura aos 26 meses de pós-operatório. Ao comparar a largura e espessura do ligamento da patela com o lado não operado, observou-se hipertrofia do ligamento operado.

Em 2004, Koseoglu *et al*⁽⁴⁰⁾ e Svensson *et al*⁽⁴¹⁾ demonstraram após oito anos e seis anos, respectivamente, a redução progressiva do defeito criado no sitio doador, porém com persistência de um afilamento no seu terço central, com média de dois milímetros de largura.

Liden *et al*⁽⁴⁴⁾, em 2006, avaliaram 14 pacientes submetidos a revisão de reconstrução do LCA utilizando o mesmo ligamento da patela doador, e observaram maus resultados do procedimento, em termos de dor e instabilidade. Desta forma, não recomendaram a reutilização do ligamento da patela para nova retirada de enxerto, devido à cicatrização incompleta e à persistência de anormalidades na celularidade, vascularização e organização das fibras colágenas do ligamento.

Em 2007, Svensson *et al*⁽⁴³⁾ avaliaram as alterações ultraestruturais das fibras colágenas do ligamento da patela doador de enxerto, por meio de biópsia *in vivo* do terço central do ligamento da patela seis anos após retirada do enxerto. Observaram matriz extracelular heterogênea, com fibras colágenas desorganizadas e debris celulares ocasionais. Os autores concluíram que mesmo depois de longo período de evolução não havia normalização completa do sitio doador.

O comprimento do ligamento da patela e a altura da patela em seguida à retirada de enxerto para reconstrução do LCA foram avaliados por Hantes *et al*⁽⁶⁰⁾ em 2007. Nos pacientes que realizaram a reconstrução com enxerto do ligamento da patela observou-se um encurtamento do ligamento com relação ao comprimento pré-operatório de 9,7%, contra 2,6% nos pacientes que realizaram a reconstrução com isquiotibiais. Quanto aos resultados clínicos não foi observada diferença clínica significativa.

2.5. Fatores de crescimento e PRP na reparação ligamentar e tendínea

A literatura em ciência básica a respeito da utilização de fatores de crescimento isolados e de PRP em tendões e ligamentos de animais experimentais, *in vitro* ou *in vivo*, é bastante extensa. Não é nosso objetivo esgotar esse assunto, mas sim procurar embasamento na literatura sobre o efeito dos fatores de crescimento encontrados nas plaquetas, conforme demonstrado previamente, sobre a regeneração tendinea e ligamentar. Os trabalhos encontrados avaliam principalmente o uso de fatores de crescimento isolados e de PRP sobre o tendão calcâneo e ligamento da patela em ratos e coelhos.

Em extensa revisão sobre esse assunto, Molloy *et al*⁽²⁶⁾, em 2003, afirmaram que estes fatores atuam isoladamente ou em sinergia na cicatrização tecidual de tendões e ligamentos. O IGF-1, PDGF e bFGF atuam predominantemente nas fases iniciais e intermediárias da cicatrização, na migração e proliferação de fibroblastos e síntese de matriz extracelular. O TGF- β e EGF, além de atuarem nestas etapas, também tem um papel importante na fase de remodelação. Segundo os autores, o PRP é uma fonte importante de fatores de crescimento autólogo e possui grande potencial de aplicação clínica.

Em outra revisão, Bagnaninchi *et al*⁽⁶¹⁾, em 2007, afirmaram que a aplicação de fatores de crescimento parece ter um efeito positivo na reparação de tendões e ligamentos. O bFGF e o PDGF tem efeito mitogênico sobre fibroblastos, e aumentam a proliferação celular em tenócitos de ratos.

Avaliando o efeito do IGF-I em tendões calcâneos de ratos, Kurtz *et al*⁽³⁰⁾, em 1999, observaram que os ratos tratados com IGF-I apresentaram melhor e mais rápida recuperação funcional do que o grupo controle após transecção dos tendões.

Em 2004, Aspenberg e Virchenko⁽³²⁾ observaram que uma única injeção de PRP provocou aumento de 27% na resistência do tendão calcâneo de ratos em relação ao grupo controle, uma semana após a lesão.

Com três semanas, os tendões tratados com PRP alcançaram 84% da resistência de tendões íntegros, comparados com 63% no grupo controle.

Em 2006, Virchenko e Aspenberg⁽⁶²⁾ demonstraram o efeito sinérgico da aplicação de PRP e estímulo mecânico em tendões calcâneos de ratos. As lesões foram tratadas com PRP isolado ou associado a infiltração de toxina botulínica intramuscular, comparados com grupos controle. Observaram que a aplicação de PRP teve um efeito inicial na reparação tendinea, porém após duas semanas a diferença entre os grupos PRP e controle foi eliminada quando realizada infiltração de toxina botulínica. Segundo estes autores, o PRP auxilia na regeneração tecidual precoce, porém há necessidade de estímulo mecânico adjuvante.

Em 2006, Virchenko *et al*⁽⁶³⁾ avaliaram o efeito do concentrado de plaquetas e da trombina na cicatrização e reparação de tendões calcâneos em ratos. Avaliaram o efeito da aplicação de plaquetas e trombina isoladamente ou associadas na resistência dos tendões. Um terceiro grupo foi tratado com PRP e uma substância neutralizadora da trombina, a hirudina. Demonstraram que tanto o concentrado de plaquetas quanto a trombina isolada podem aumentar a reparação tendinea em ratos. A neutralização da trombina com hirudina provocou redução deste efeito. Concluíram que o uso da trombina para ativar o gel de plaquetas aumenta sua eficiência na reparação tendinea.

Avaliando o efeito dos fatores de crescimento no ligamento da patela, Chan *et al*⁽⁴⁶⁾, em 1997, estudaram a regeneração do defeito no terço central do ligamento de ratos *in vitro* com aplicação de bFGF, demonstrando maior regeneração do ligamento, devido a aumento da proliferação de fibroblastos.

Chan *et al*⁽³¹⁾, em 2000, avaliaram *in vivo* o efeito do bFGF na regeneração do ligamento da patela de ratos. O bFGF foi infiltrado após três dias e os animais foram sacrificados após sete e 14 dias. Observaram maior proliferação de fibroblastos e maior síntese de colágeno tipo III na primeira semana. Concluíram que o bFGF tem um efeito positivo sobre a cicatrização ligamentar e que este efeito ocorre nas fases iniciais da cicatrização.

Anaguchi *et al*⁽³³⁾, em 2005, estudaram o efeito do TGF- β na regeneração do ligamento da patela em coelhos *in vivo* após ressecção do seu terço central. Trinta coelhos foram divididos em três grupos, em que foi injetado TGF- β , salina (*sham*), ou nada (controle). Os testes biomecânicos, utilizando a porção regenerada do tendão, demonstraram aumento da força tênsil e do módulo de Young com TGF- β comparado aos outros dois grupos.

Lyras *et al*, em 2009⁽⁴⁵⁾, avaliaram o efeito da aplicação do PRP nas propriedades mecânicas e histológicas do ligamento da patela em coelhos, em modelo semelhante ao utilizado por Anaguchi⁽³³⁾. Observaram no grupo PRP um aumento da resistência final e rigidez do ligamento nas primeiras duas semanas. Histologicamente, observaram cicatrização mais rápida e

maior síntese de colágeno no grupo PRP. Concluíram que o PRP melhorou as propriedades mecânicas do ligamento da patela neste modelo, e que seu maior efeito ocorreu nas fases iniciais da regeneração tendinea. Em 2010, Lyras *et al*⁽⁶⁴⁾, demonstraram, no mesmo modelo experimental, que nos casos do grupo PRP houve uma aceleração do processo de cicatrização e aumento da expressão celular de IGF-1.

Em 2010, Magarian *et al*⁽⁶⁵⁾ avaliaram *in vitro* a resposta de fibroblastos provenientes do LCA de pacientes de diferentes idades à estimulação com PRP. Observaram que os fibroblastos de pacientes com esqueleto imaturo apresentaram maior migração e proliferação celular quando estimulados pelo PRP do que as células provenientes de indivíduos com esqueleto maduro, evidenciando um efeito idade-dependente.

2.6. Teste isocinético após reconstrução do LCA

De acordo com Pua *et al*⁽⁶⁶⁾, em 2008, os testes isocinéticos não reproduzem perfeitamente os movimentos e contrações musculares das atividades cotidianas. Porém, estes testes são úteis por permitirem quantificar déficits musculares, possibilitarem distinguir os pacientes aptos a retornar de forma mais segura às atividades esportivas, e correlacionarem-

se, ao menos de forma moderada, a avaliações subjetivas de função do joelho.

O déficit de força muscular após reconstrução de LCA com ligamento da patela foi avaliado de forma seriada por Kobayashi *et al*⁽⁶⁷⁾, em 2004, utilizando teste isocinético. O parâmetro utilizado foi o déficit percentual do pico de torque, relativo ao lado não operado. Aos seis meses de pós-operatório, o déficit de pico de torque foi de 37%, a uma velocidade angular de 60°/s, e 31%, a 180°/s. A presença de dor anterior do joelho foi o único fator neste estudo relacionado a atraso na recuperação da força muscular.

Em 2005, Dauty *et al*⁽⁶⁸⁾ publicaram uma revisão sistemática sobre os resultados de testes isocinéticos após reconstrução do LCA. Analisando as publicações que avaliaram os déficits de força muscular para extensão do joelho após seis meses da reconstrução, observaram um déficit de 28% a 34% na avaliação a 60°/s e 18% a 31% a 180°/s.

2.7. Questionários de função do joelho

Para avaliação da função e sintomas da articulação do joelho existem questionários específicos, com a função de padronizar a análise dos resultados, tentando excluir a subjetividade do pesquisador e do paciente. O

questionário IKDC subjetivo (*International Knee Documentation Committee Subjective Knee Form*), publicado por Irrgang *et al*⁽⁶⁹⁾ em 2001, foi desenvolvido como uma medida de avaliação para detectar evolução dos sintomas, atividades habituais e esportivas em pacientes com uma variedade de condições do joelho.

O questionário proposto por Lysholm⁽⁷⁰⁾, em 1982, foi desenvolvido para avaliar o seguimento de cirurgias para lesões ligamentares do joelho e enfatiza os sintomas de instabilidade. É constituído de oito questões, com alternativas de respostas fechadas. O resultado final é expresso ordinalmente e nominalmente. Um resultado de 95 a 100 pontos é classificado como excelente, 84 a 94 como bom, 65 a 83 regular e abaixo de 64 como ruim. Este questionário foi validado para o português por Peccin *et al*⁽⁷¹⁾ em 2006.

Em 1985, foi proposta por Tegner e Lysholm⁽⁷²⁾ uma modificação do questionário de Lysholm, que leva em conta o nível de atividade esportiva do paciente. A principal vantagem deste questionário é comparar, no mesmo paciente, modificações do nível de atividade em diferentes momentos.

Um questionário mais específico de sintomas da articulação patelofemoral foi proposto por Kujala *et al*⁽⁷³⁾ em 1993. O questionário é composto de 13 perguntas e a pontuação máxima é de cem pontos. Este

questionário foi utilizado para avaliar pacientes com dor ou instabilidade patelofemoral.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Aprovação da comissão de ética e consentimento informado

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CapPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em 25 de abril de 2008 como protocolo de pesquisa 0162/08.

Todos os pacientes envolvidos no projeto receberam orientações e assinaram termo de consentimento informado, detalhando todas as etapas da pesquisa. O termo assegurava ao paciente a prerrogativa de participar ou não da pesquisa, bem como deixar de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento.

A pesquisa foi realizada no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP. Parte dos exames de ressonância magnética foi realizada no Instituto de Radiologia da mesma instituição.

3.2. Causuística

Foram selecionados para a pesquisa 28 pacientes, sendo 25 do sexo masculino e três do sexo feminino, do Ambulatório do Grupo de Medicina do Esporte do IOT HCFMUSP. Os pacientes apresentavam sinais e sintomas de lesão do ligamento cruzado anterior do joelho, confirmada pelo exame físico, testes específicos (testes de Lachman, gaveta anterior, *pivot-shift* e *jerk*) e ressonância magnética. Nestes pacientes foi indicada a reconstrução do LCA com ligamento da patela, após serem avaliados por junta médica composta por membros do grupo de Medicina do Esporte do IOT.

Nesta ocasião o paciente era informado da existência da pesquisa e questionado sobre o desejo de participar. O formulário de consentimento informado era apresentado ao paciente, que o assinava caso consentisse com a pesquisa. Apenas um paciente, do sexo masculino, recusou-se a participar. Desta forma foram incluídos no projeto 27 pacientes, sendo 24 do sexo masculino e três do sexo feminino.

3.3. Critérios de inclusão e de exclusão

3.3.1. Critérios de inclusão:

- 1- Lesão do ligamento cruzado anterior do joelho com indicação de reconstrução com enxerto autólogo do ligamento da patela ipsilateral, associada ou não a lesão meniscal;
- 2- Maturidade esquelética;
- 3- Idade inferior a 45 anos;
- 4- Ausência de lesões ligamentares complexas;
- 5- Ausência de lesões condrais graves (grau IV de Outerbridge) ou osteoartrose em qualquer compartimento do joelho;
- 6- Ausência de cirurgias prévias na articulação em questão.

3.3.2. Critérios de exclusão**:

- 1- Infecção profunda pós-operatória;
- 2- Artrofibrose;

*Caso houvesse a necessidade de exclusão por motivo que pudesse estar relacionado aos métodos utilizados, o caso seria descrito como complicação, porém os dados relacionados não seriam computados para comparação entre os grupos.

- 3- Necessidade de reoperação do joelho em questão durante o intervalo do estudo;
- 4- Seguimento pós-operatório inadequado;
- 5- Plaquetopenia.

3.4. Randomização

Os pacientes selecionados para o estudo foram divididos de forma randomizada em dois grupos: grupo PRP e grupo controle. O esquema de randomização foi gerado utilizando o programa de computador fornecido pelo *web site* Randomization.com (<http://www.randomization.com>). O diagrama de fluxo da pesquisa, de acordo com a recomendação do *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT), é apresentado na figura 1.

3.5. Teste isocinético e questionários

Antes da cirurgia os pacientes realizavam um teste isocinético e respondiam a questionários sobre a função do joelho a ser operado.

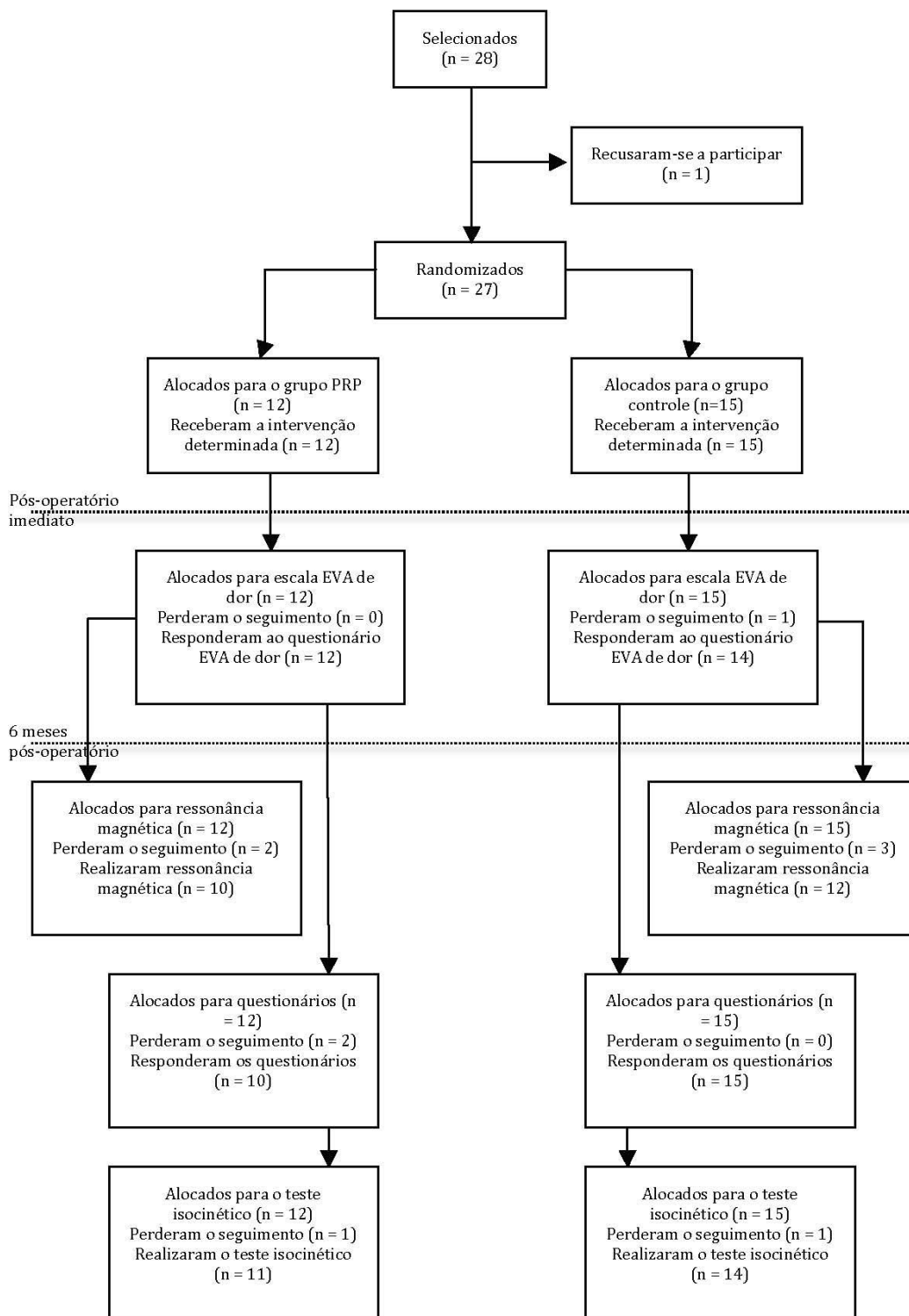


Figura 1. Diagrama de fluxo CONSORT detalhando as etapas da pesquisa

O teste isocinético foi realizado no aparelho Biodex System 3 Pro (*Biodex Medical Systems, Inc. NY, EUA*), no Laboratório de Medicina do Esporte do IOT. O paciente realizava um aquecimento de cinco minutos em bicicleta ergométrica, seguido de alongamento. Foram realizados testes para avaliação da musculatura extensora e flexora do joelho em 60°/s e 240°/s. O paciente era orientado quanto ao teste, e realizava três repetições para aprendizado, com a perna não lesionada. O teste era iniciado a 60°/s, com quatro repetições sucessivas com a perna não lesionada, e a seguir com a perna lesionada. Após descanso de oito segundos eram feitas 20 repetições a 240°/s, na mesma sequência. O parâmetro considerado foi o déficit percentual do pico de torque com relação ao lado não lesionado. O mesmo teste era repetido após seis meses de pós-operatório.

Os pacientes também respondiam a questionários específicos de avaliação da função do joelho, a saber: Lysholm, IKDC subjetivo, *score* patelofemoral de Kujala e questionário de Tegner. Os mesmos questionários eram também aplicados após seis meses da cirurgia. No primeiro dia de pós-operatório o paciente era questionado sobre a intensidade da dor com a utilização da escala visual analógica (EVA).

3.6. Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob raquianestesia associada a sedação. Realizamos antibioticoprofilaxia com cefalosporina de primeira geração por 24 horas, segundo protocolo da instituição para este tipo de cirurgia.

3.6.1. Preparação do PRP

Nos pacientes do grupo PRP, após a indução anestésica, foram retirados cerca de 450 ml de sangue por acesso venoso periférico para coleta de plaquetas por aférese. Utilizamos um separador celular *Haemonetics* MCS+ 9000 (figura 2) e o kit específico para plaquetaférese 995-E (*Haemonetics Corp, MA, EUA*). O sangue era drenado para um dispositivo de separação sob centrifugação contínua. Utilizamos como anticoagulante citrato de sódio na proporção de 1 ml para cada 9 ml de sangue. Nesse dispositivo, um analisador de refração ótica determinava a camada de plaquetas por gradiente de densidade e o separava em uma bolsa coletora estéril (figura 3), obtendo cerca de 70 ml de PRP. As hemácias e o plasma eram devolvidos ao paciente pelo acesso venoso.

Avaliamos os índices hematimétricos do sangue total e do concentrado de plaquetas.



Figura 2. Separador celular *Haemonetics* MCS+ 9000 utilizado para obtenção do PRP



Figura 3. Bolsa coletora estéril contendo o PRP

No próprio centro cirúrgico o PRP era dividido em alíquotas de 10 ml (figura 4). Na primeira alíquota, eram acrescentados 800 microlitros de cloreto de cálcio a 10% para geração de trombina de fonte autóloga, após a formação de gel nesta amostra. Nas demais alíquotas, o gel de plaquetas era obtido pelo acréscimo de 800 microlitros de cloreto de cálcio a 10% e 1 ml de trombina autóloga, retirada da primeira alíquota, para cada alíquota de PRP. O gel resultante desta mistura (figura 5) era colocado rapidamente no sítio cirúrgico.



Figura 4. Alíquota de PRP (10 ml) à qual adicionamos cloreto de cálcio para obtenção de trombina autóloga

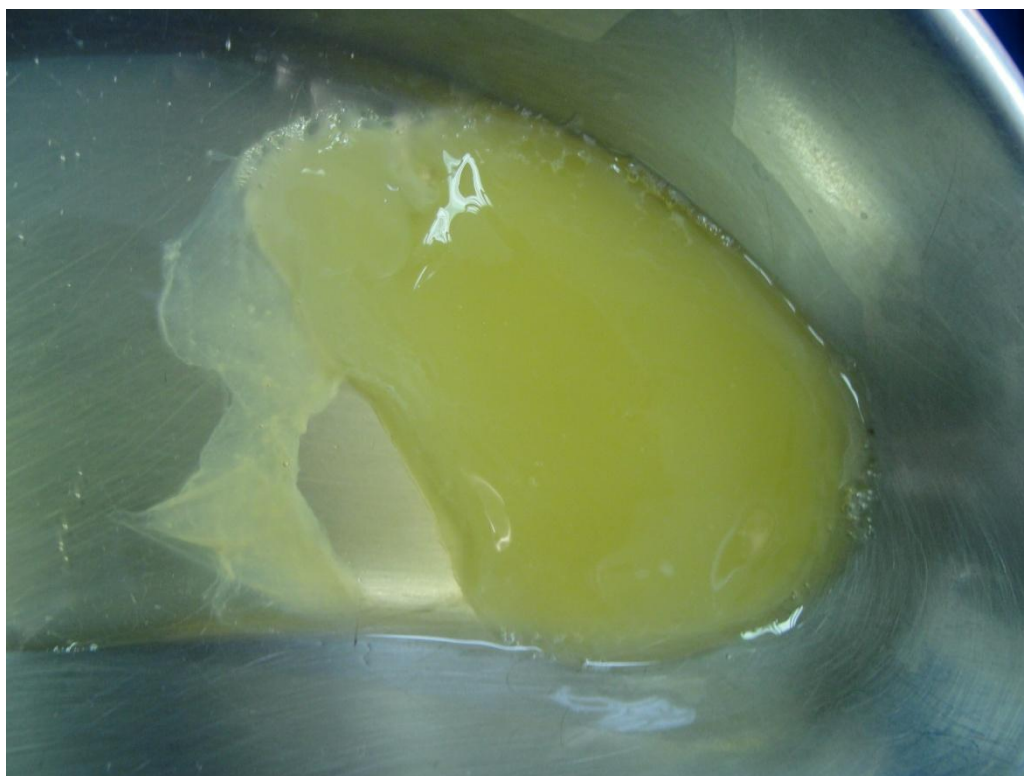


Figura 5. Gel de plaquetas obtido após adição de trombina autóloga e cloreto de cálcio ao PRP

3.6.2. Técnica cirúrgica

O enxerto era retirado do terço central do ligamento da patela, e consistia de um fragmento ósseo do pólo inferior da patela de 25 mm de comprimento por 10 mm de largura e 10 mm de espessura, em continuidade com um feixe longitudinal do ligamento da patela de 10 mm de largura com a espessura e comprimento originais do ligamento, por sua vez em continuidade com um bloco ósseo da inserção tibial do ligamento da patela com 25 mm de comprimento por 10 mm de largura por 10 mm de espessura, formando um enxerto osso-ligamento-osso. As medidas eram feitas com régua milimetrada. O enxerto era fixado com o sistema de duplo pino transversal bioabsorvível no fêmur (*Rigid-fix®*, *Johnson&Johnson®*) e com parafuso de interferência bioabsorvível na tibia (*Millagro®*, *Johnson&Johnson®*), com exceção de três casos do grupo PRP em que foi utilizado parafuso de interferência metálico para fixação do enxerto, devido à não disponibilidade do outro material.

O local de retirada do enxerto (figura 6) era preparado com sutura absorvível de *Vicryl®* n°3-0, suturando as margens do sítio doador à gordura retropatelar adjacente, para formar um leito receptor. O espaço correspondente ao local de retirada do enxerto era mantido aberto. Ao final do procedimento de reconstrução do LCA por via artroscópica era colocado

o gel nos pacientes do grupo PRP (figura 7), ou nada, nos pacientes do grupo controle, e fechado apenas o peritendão (figura 8). A incisão era fechada de maneira habitual e era colocado dreno de sucção intra-articular, mantido por cerca de 24 horas.

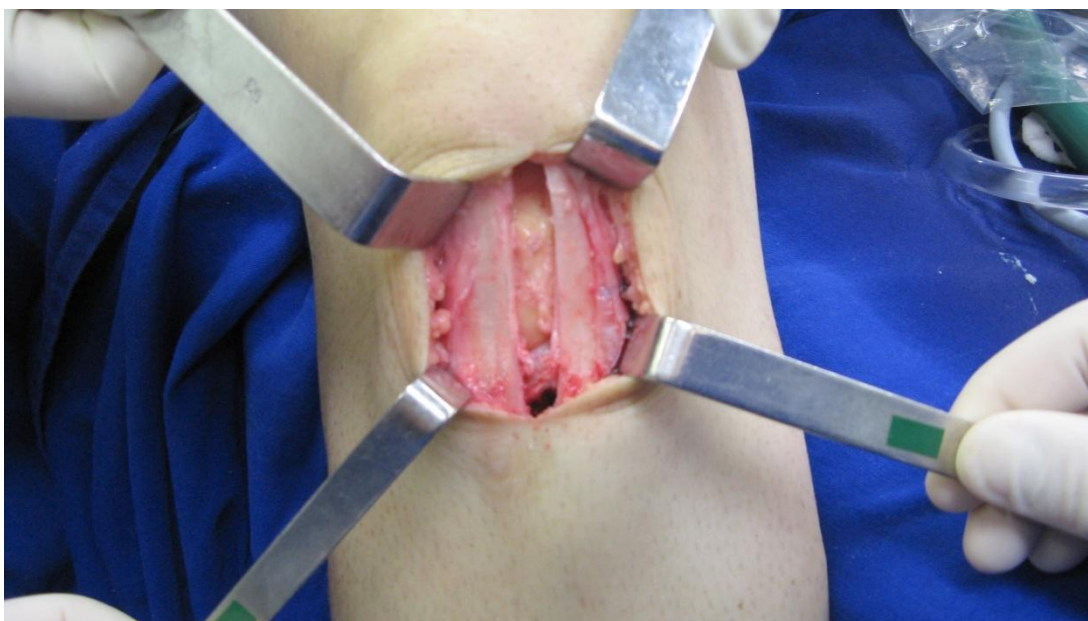


Figura 6. Sitio de retirada do enxerto no terço central do ligamento da patela

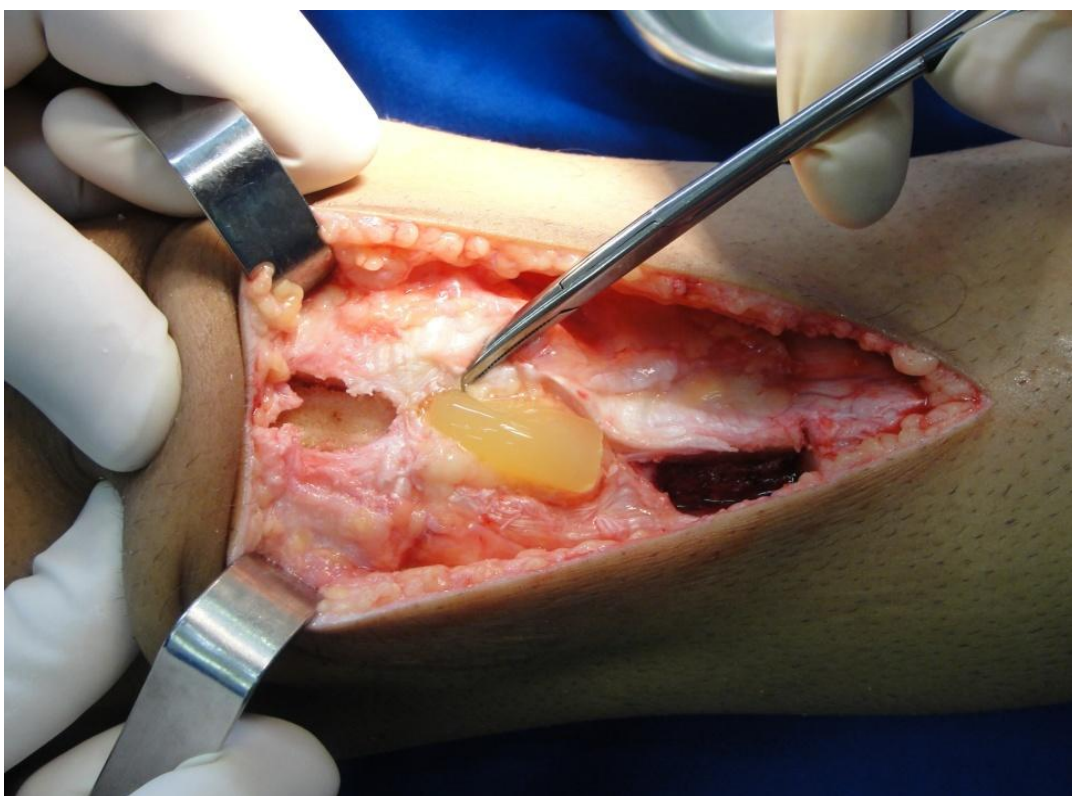


Figura 7. Adição do gel de plaquetas ao sitio doador de enxerto no ligamento da patela

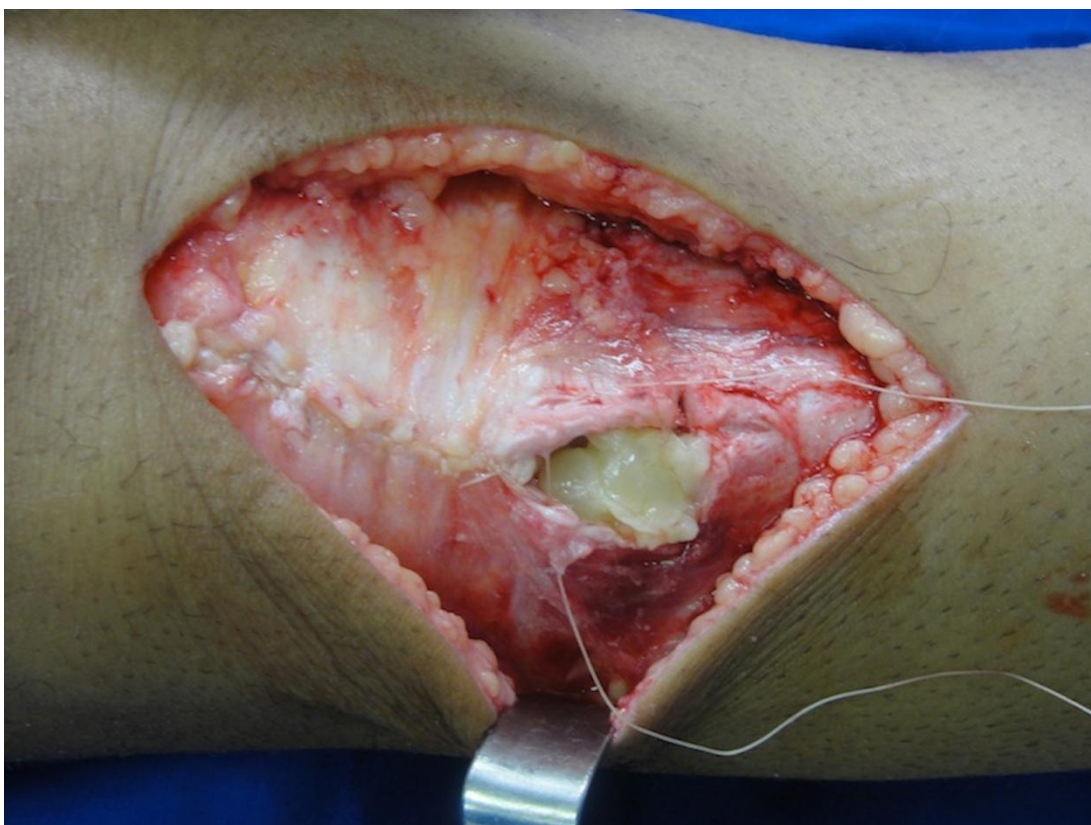


Figura 8. Fechamento do peritendão com o gel de plaquetas adicionado ao defeito

3.6.3. Pós-operatório

Utilizamos analgesia endovenosa no período de internação, consistindo de anti-inflamatório não hormonal (cetoprofeno, 100 mg EV a cada 12 horas), analgésico opióide (cloridrato de tramadol, 100 mg EV a cada oito horas) e analgésico de ação central de resgate (dipirona sódica, 2 ml EV a cada seis horas em caso de dor intensa). No primeiro dia de pós-operatório era aplicada a escala visual analógica de dor (EVA), para todos os pacientes. A escala consistia em uma linha reta de 10 cm de

comprimento, graduada de um a 10 em intervalos de um centímetro. O paciente era questionado sobre a presença de dor e solicitado a assinalar o ponto correspondente a sua intensidade, sendo zero equivalente a ausência de dor e 10 correspondente a dor máxima.

A fase de reabilitação iniciava-se durante a internação, com exercícios para recuperação da amplitude de movimento articular e contração isométrica do quadríceps. A marcha era permitida com auxílio de muletas, com apoio progressivo no membro operado, durante três semanas. Os pacientes retornavam ao ambulatório na primeira e segunda semanas para avaliar o aspecto do curativo, presença de derrame articular e sinais flogísticos. A seguir orientamos o retorno após duas semanas, completando o primeiro mês, e a seguir mensalmente. Enfatizamos a recuperação do arco de movimento articular e da força muscular. Exercícios de propriocepção em plataforma instável eram recomendados após o terceiro mês de pós-operatório.

3.7. Ressonância magnética pós-operatória

A ressonância magnética do joelho operado era solicitada após seis meses de pós-operatório. Eventualmente o exame não era realizado exatamente na data prevista, devido a características do serviço aonde foi

realizado o estudo, por ser um serviço público com grande volume de exames e emergências, e outras vezes por atraso dos pacientes. Desta forma, para o grupo PRP o exame foi realizado em média após 208 dias e no grupo controle após 212 dias da cirurgia. Do total de 27 pacientes incluídos no estudo, realizaram a ressonância magnética 22 pacientes, sendo 10 do grupo PRP e 12 do grupo controle.

Os exames eram realizados em aparelho GE HDXT de 1,5 Tesla (General Electric Corp®. EUA). As imagens eram avaliadas por radiologista especialista em aparelho músculo-esquelético do serviço de radiologia do IOT. Esta avaliação era feita de forma cega, ou seja, o radiologista em nenhum momento sabia a qual grupo pertencia o caso que estava sendo avaliado.

Os parâmetros avaliados na ressonância magnética foram:

1 – área não regenerada do ligamento da patela, em mm^2 , correspondente ao defeito remanescente no local de retirada do enxerto no terço central do ligamento da patela. A medida foi realizada no corte axial, na região correspondente ao ponto médio entre a origem e a inserção do ligamento da patela (figuras 9 e 10);

2 – área de secção transversa do ligamento da patela, em mm^2 , no mesmo corte em que foi medida a área do defeito;

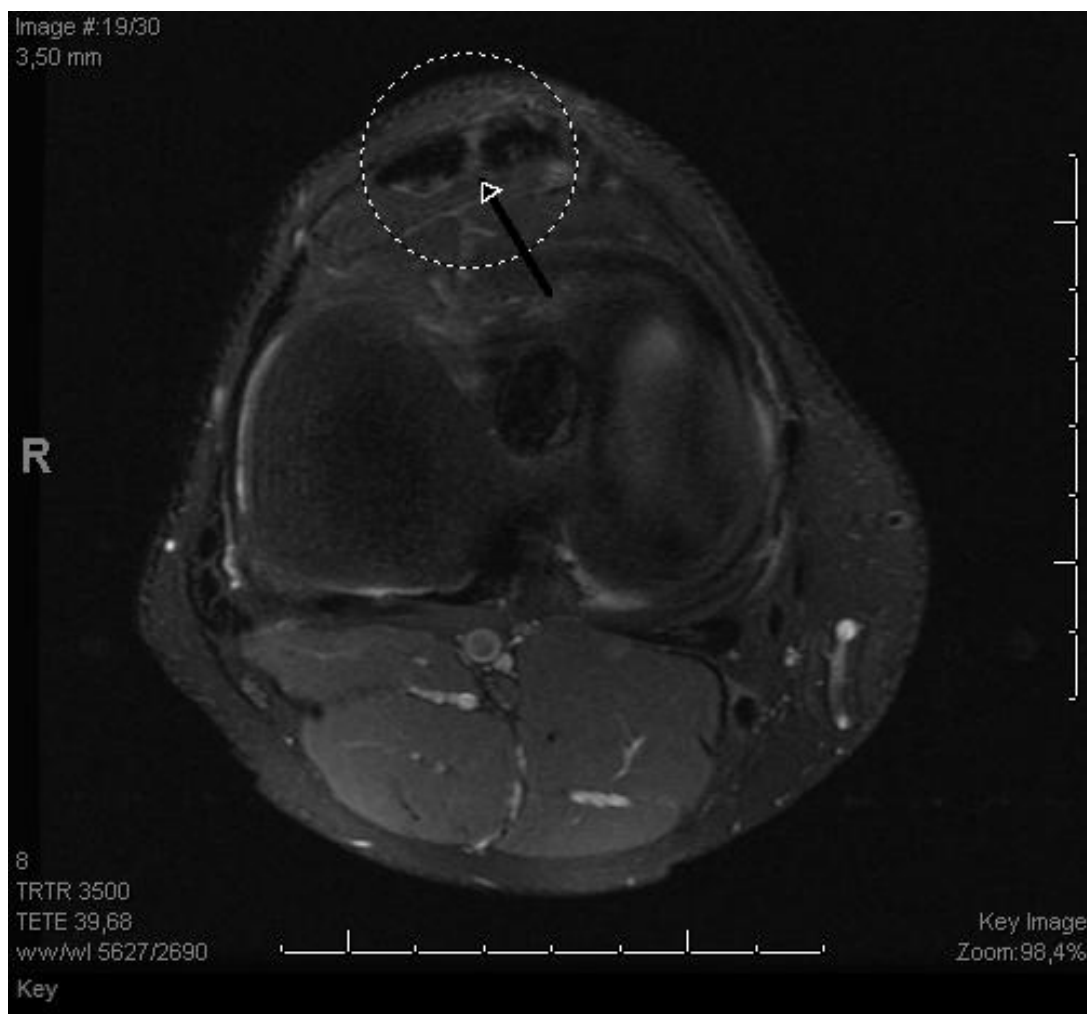


Figura 9. Corte axial da ressonância magnética com área central correspondente ao sitio de retirada do enxerto do ligamento da patela (seta)

3 – altura da patela, pelo índice de Insall-Salvati, definido como a razão entre o comprimento total do ligamento da patela e o comprimento total da patela, no corte sagital (figura 9).



Figura 10. Corte sagital da ressonância magnética demonstrando a seleção do ponto médio do ligamento da patela, e também utilizado para medida do índice de Insal-Salvati

3.8. Análise estatística

As suposições necessárias para aplicação dos modelos estatísticos utilizados neste estudo foram avaliadas com o teste de

Kolmogorov-Smirnov, para avaliar a distribuição, e teste de Levene, para avaliar a homocedasticidade (ou homogeneidade de variância) dos dados. As médias das variáveis de ressonância magnética (área não regenerada, área de secção transversa do ligamento da patela e índice de Insall-Salvati), da idade dos pacientes e da escala visual analógica de dor (EVA) foram comparadas por meio do teste t de Student. Em relação à EVA as médias dos grupos também foram comparadas controlando as idades dos pacientes, utilizando um modelo de análise de variância (ANOVA) com dois fatores: grupo e idade do paciente.

Os dados obtidos dos questionários (Lysholm, IKDC, Kujala e Tegner) e do déficit do torque no teste isocinético (60°/s e 240°/s), foram avaliados utilizando-se um modelo de efeitos mistos, em que as médias nos momentos pré e pós cirurgia entre os grupos e dentro de cada um dos grupos foram comparadas nos dois momentos de avaliação. Para aplicação destes testes, é importante observar a possível existência de efeito de interação entre os grupos, o que não foi detectado.

Avaliamos a presença de correlação entre a concentração de plaquetas no PRP e a área não regenerada do ligamento da patela com o coeficiente de correlação de Pearson (ρ).

A análise estatística da casuística em relação à porcentagem de homens e mulheres e à presença de lesões associadas foi feita utilizando o teste exato de Fisher.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise estatística da casuística

Foram incluídos 12 pacientes no grupo PRP e 15 pacientes no grupo controle. Comparamos os grupos com relação à idade e gênero. A idade média do grupo PRP foi de 25,8 anos e do grupo controle 23,1 anos. A análise estatística não demonstrou diferença entre os grupos com relação à idade (tabela 1).

Tabela 1 - Medidas descritivas da idade dos pacientes, segundo grupos

	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Idade							
(anos)	PRP	12	25,8	7,7	24,0	18,0	44,0
p=0,309	Controle	15	23,1	5,9	23,0	15,0	34,0
	TOTAL	27	24,3	6,7	24,0	15,0	44,0

Valor de p referente ao teste t de Student.

O grupo PRP incluía duas mulheres e o grupo controle uma. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao gênero dos pacientes (tabela 2).

Avaliamos a presença de lesões meniscais ou condrais associadas à lesão do LCA no momento intra-operatório. No grupo PRP sete pacientes apresentavam alguma lesão associada, e no grupo controle nove pacientes as apresentavam. Não houve diferença entre os grupos com relação à presença de lesões associadas à lesão do LCA (tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição de sexo e lesões associadas, segundo grupos

		GRUPOS		
		PRP	Controle	TOTAL
Sexo	Masculino	10	14	24
p=0,569	Feminino	2	1	3
Lesões Associadas	Sim	7	9	16
p>0,99	Não	5	6	11
	TOTAL	12	15	27

Valores de p referentes ao teste exato de Fisher.

4.2. Medidas da ressonância magnética

Dos 27 pacientes do estudo, 22 pacientes realizaram a ressonância magnética pós-operatória, sendo 10 do grupo PRP e 12 do grupo controle (tabela 3). Para o grupo PRP o exame foi realizado em média 208 dias e no grupo controle 212 dias após a cirurgia, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,830$) com relação a este parâmetro.

A área não regenerada do ligamento da patela (tabela 3, figura 11), no grupo PRP foi menor do que no grupo controle. A análise estatística indicou um valor de $p=0,046$, demonstrando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$). Os casos do grupo PRP, portanto, apresentaram maior regeneração do terço central do ligamento da patela do que os casos do grupo controle.

As medias da área de secção transversa do ligamento da patela e índice de Insall-Salvati não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos PRP e controle (tabela 3, figuras 12 e 13).

Tabela 3 - Medidas descritivas para as variáveis de ressonância magnética, segundo grupos

	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Dias	PRP	10	208	32	201	170	266
	Controle	12	212	37	201	170	285
	TOTAL	22	211	35	201	170	285
Área não regenerada (mm ²)	PRP	10	4,95	5,37	3,03	0,00	15,43
	Controle	12	9,38	4,39	9,38	3,71	17,10
	TOTAL	22	7,37	5,25	7,37	0,00	17,10
Área do ligamento (mm ²)	PRP	10	173,05	30,49	165,97	131,25	238,57
	Controle	12	176,29	48,59	181,64	85,06	250,00
	TOTAL	22	174,82	40,47	169,75	85,06	250,00
Insall- Salvati	PRP	10	1,04	0,15	1,01	0,82	1,32
	Controle	12	1,06	0,19	1,05	0,82	1,59
	TOTAL	22	1,05	0,17	1,03	0,82	1,59

Valores de p referentes ao teste t de Student.

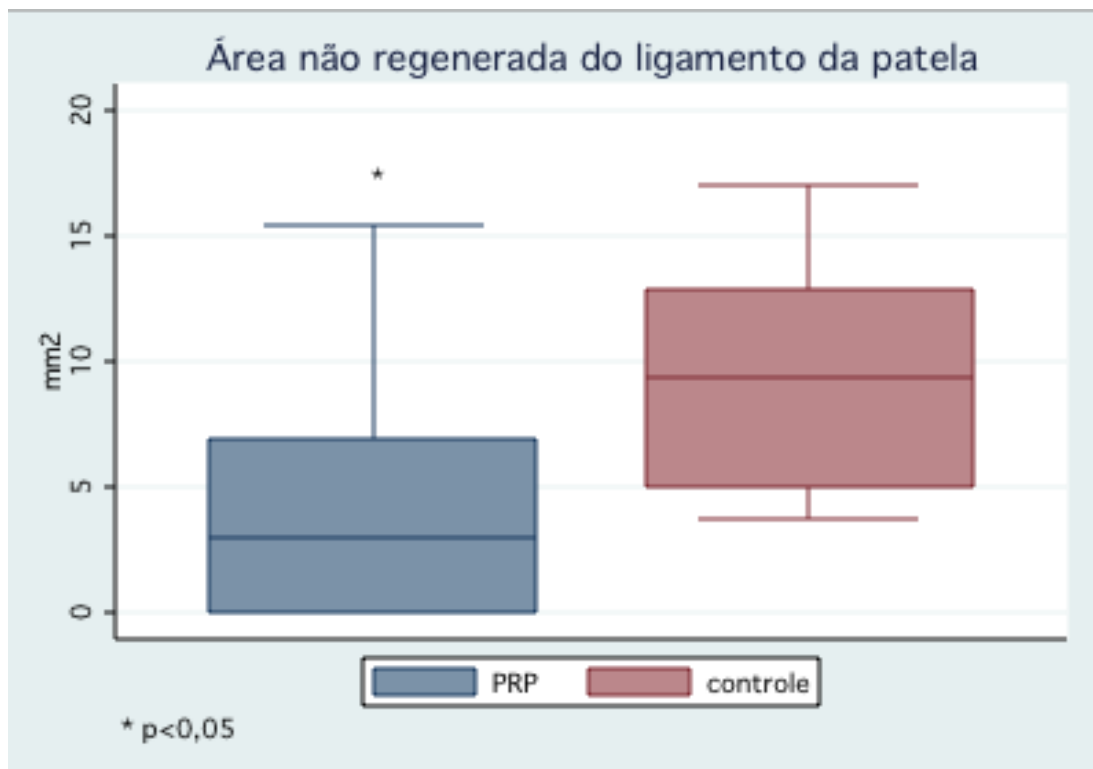


Figura 11. Área não regenerada do terço central do ligamento da patela (mm²) em ambos os grupos

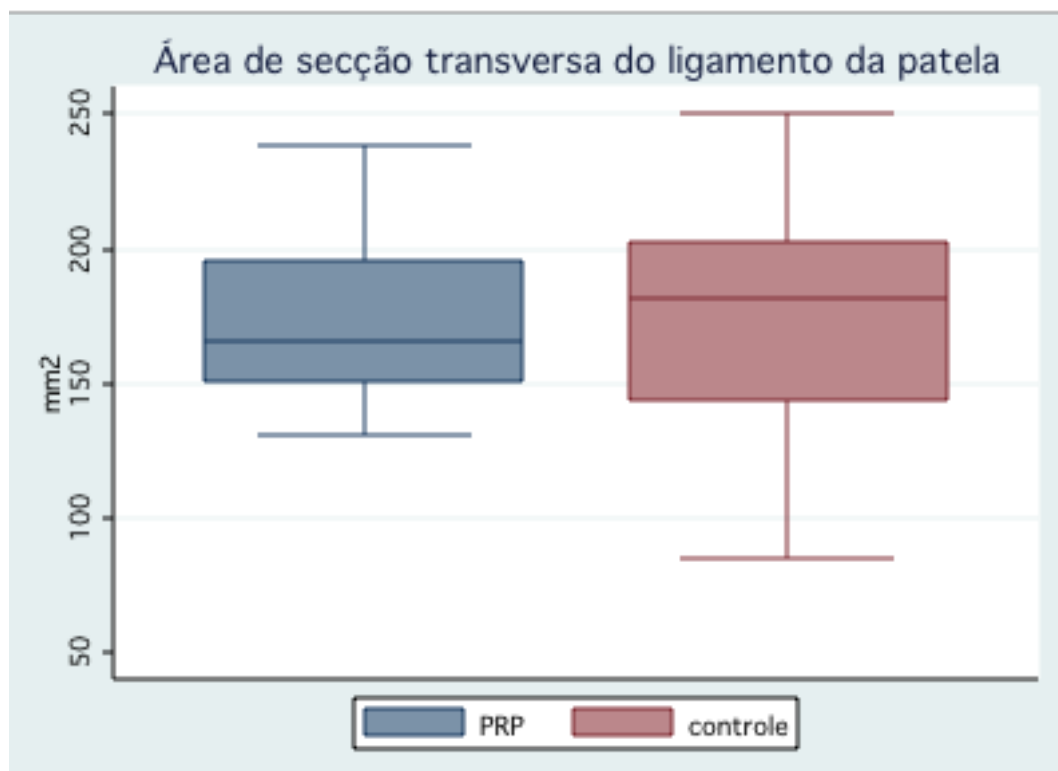


Figura 12. Área de secção transversa do ligamento da patela (mm²) em ambos os grupos

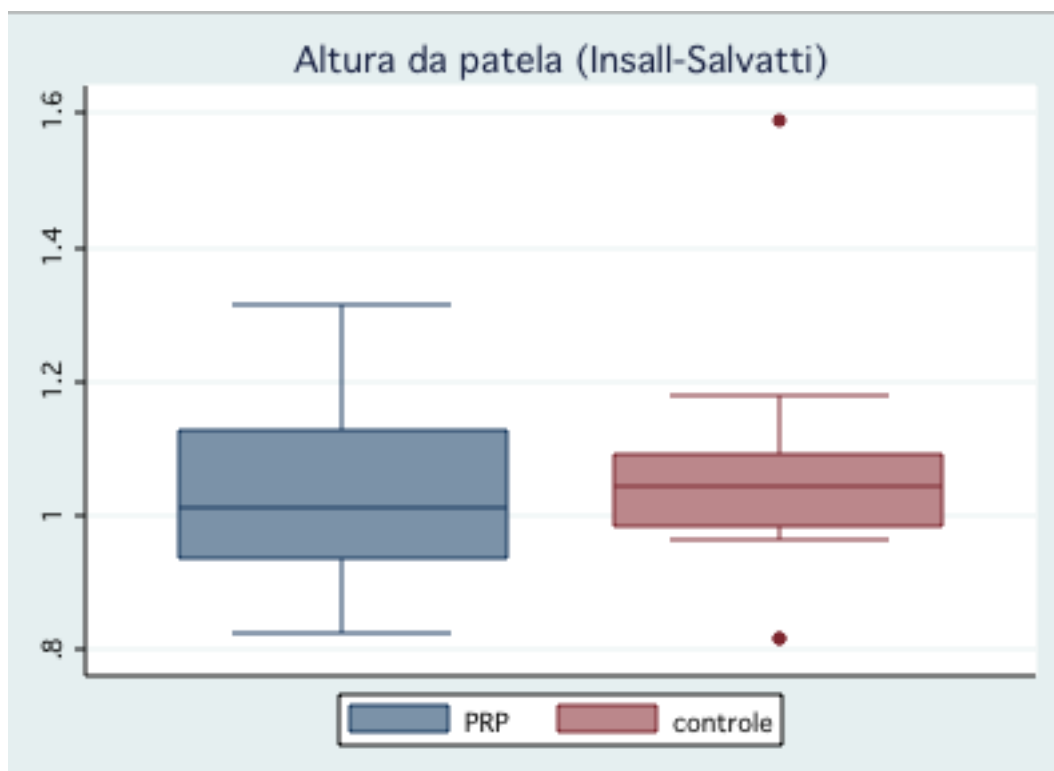


Figura 13. Valores do índice de Insall-Salvati em ambos os grupos

4.3. Características do PRP e correlação com a ressonância magnética

As medidas descritivas do PRP com relação à concentração de plaquetas, aumento da concentração em relação ao basal e concentração de leucócitos estão apresentados na tabela 4. A associação entre a área não regenerada do ligamento da patela e a concentração de plaquetas e leucócitos do PRP e entre as concentrações de plaquetas no sangue e no PRP foram avaliadas utilizando os coeficientes de correlação de Pearson (ρ).

Avaliando a correlação entre a concentração de plaquetas no sangue periférico e no PRP foi observado $\rho = -0,46$, ou seja, fraca correlação negativa entre estes parâmetros.

Quanto à correlação entre a concentração de plaquetas do PRP e a área não regenerada do ligamento da patela obtivemos os valores de $\rho = 0,609$ (figura 14). Ou seja, observamos a presença de moderada correlação positiva entre uma maior área não regenerada do ligamento da patela e a concentração de plaquetas do PRP.

Avaliando a correlação entre a quantidade de leucócitos e a área não regenerada do ligamento obtivemos $\rho = 0,214$, ou seja, fraca correlação positiva entre estes parâmetros (figura 15).

Tabela 4. Medidas descritivas das características do PRP

	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
PRP	12	1 185 166	404 472	1 061 000	783 000	2 239 000
Concentração (vezes)		7,65	5,92	6,11	3,82	26,03
Leucócitos		0,91	0,81	0,55	0,1	2,5

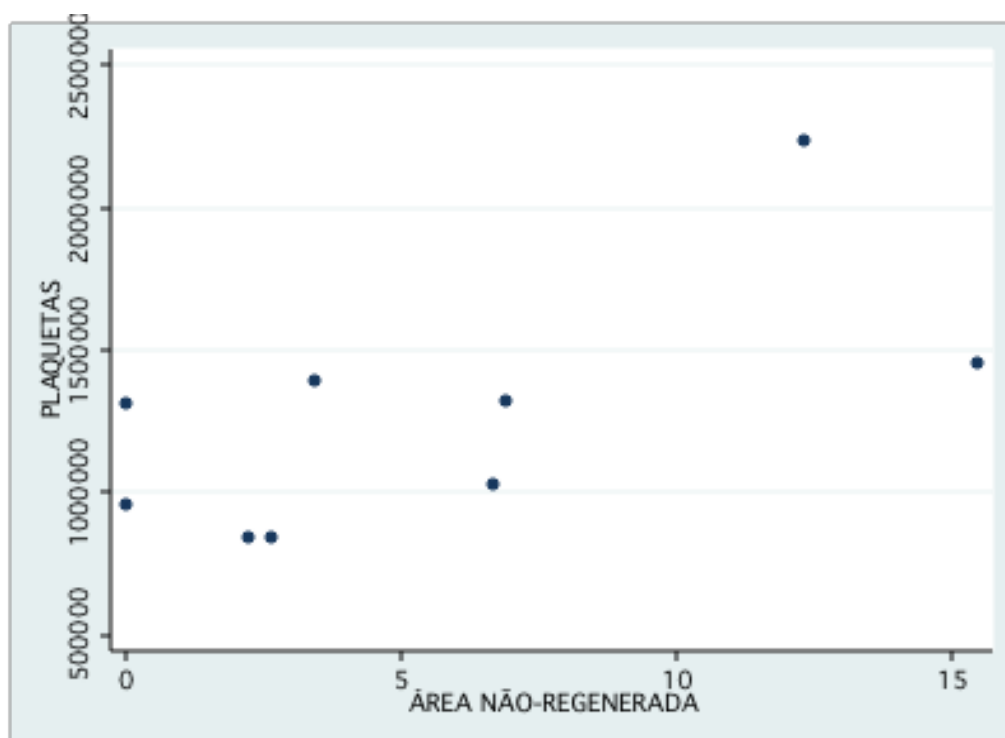


Figura 14. Diagrama de dispersão correlacionando a concentração de plaquetas no PRP e a área não regenerada do ligamento da patela

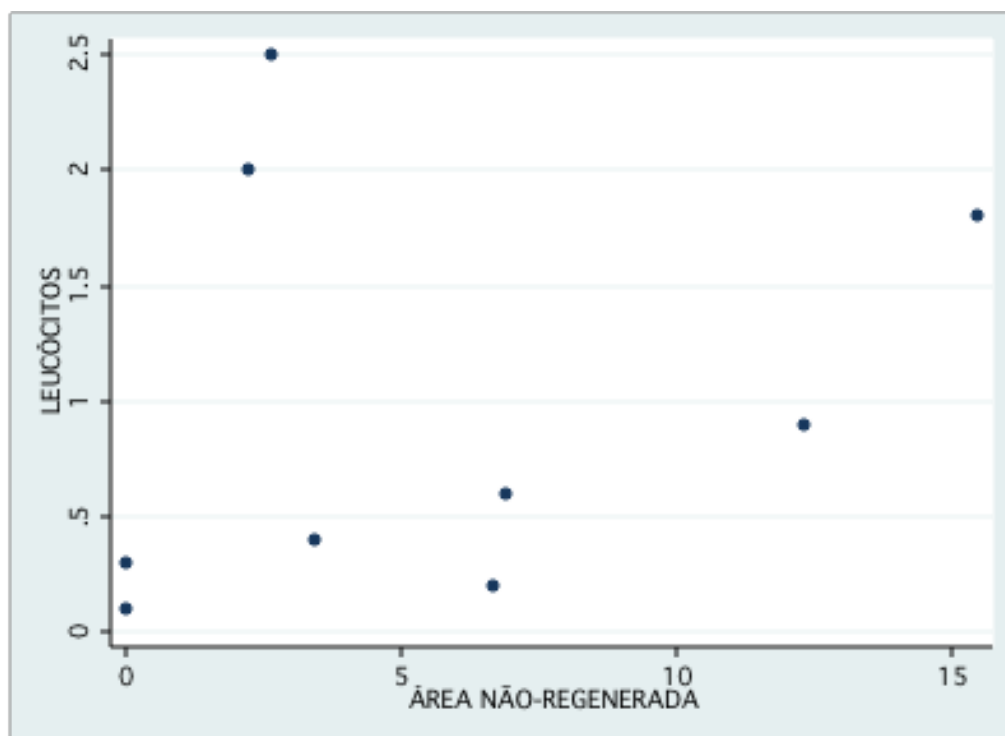


Figura 15. Diagrama de dispersão correlacionando a concentração de leucócitos no PRP e a área não regenerada do ligamento da patela

4.4. Teste isocinético

O pico de torque do joelho lesionado foi comparado ao do joelho não lesionado para cálculo do déficit de pico de torque, em porcentagem. Comparamos os resultados entre os grupos PRP e controle e entre os momentos pré e pós-operatório. As medidas descritivas referentes aos testes a 60°/s e a 240°/s são apresentadas nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

As médias entre os grupos nos momentos pré e pós-operatório e entre os momentos pré e pós-operatório em cada um dos grupos foram comparadas utilizando um modelo estatístico de efeitos mistos. Para aplicação deste modelo é necessário observar a presença de efeitos de interação entre os momentos de avaliação e grupos. O efeito de interação ocorre quando as diferenças entre os grupos não são as mesmas nos diferentes momentos de avaliação ou, de forma equivalente, quando as diferenças entre os momentos de avaliação não são as mesmas nos diferentes grupos.

No caso do torque a 60°/s, a análise não indicou efeito de interação significativa entre os momentos de avaliação e os grupos ($p=0,818$). Não observamos diferenças significativas entre os grupos PRP e controle ($p=0,450$). Entre os momentos pré e pós-operatório a média do déficit pós-

operatório foi maior que no momento pré-operatório em ambos os grupos (figura 16).

Tabela 5. Medidas descritivas para o déficit do torque 60°/s avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos

DÉFICIT DO TORQUE 60°/S (%)	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Pré-operatório	PRP	10	27,3	34,4	24,6	(12,7)	89,6
	Controle	13	18,2	14,2	14,7	0,1	47,1
	TOTAL	23	22,2	24,8	14,7	(12,7)	89,6
Pós-operatório	PRP	11	44,7	18,0	38,0	18,2	79,3
	Controle	14	40,8	12,3	42,9	16,6	56,1
	TOTAL	25	42,5	14,9	40,2	16,6	79,3

Tabela 6. Medidas descritivas para o déficit do torque 240° por segundo avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos

DÉFICIT DO TORQUE 240°/S (%)	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Pré-operatório	PRP	10	16,8	28,7	10,3	(21,8)	77,1
	Controle	13	11,4	15,8	13,4	(18,0)	32,2
	TOTAL	23	13,7	21,9	10,3	(21,8)	77,1
Pós-operatório	PRP	11	30,6	21,9	23,3	(11,8)	71,5
	Controle	14	30,9	10,8	29,4	12,2	50,1
	TOTAL	25	30,8	16,2	29,2	(11,8)	71,5

Conclusões semelhantes são obtidas para o torque a 240°/s. A análise estatística não indicou efeito de interação ($p=0,711$). Não observamos diferenças significativas entre os grupos PRP e controle ($p=0,711$). A média do déficit pós-operatório foi maior que a do momento pré-operatório em ambos os grupos (figura 17).

A tabela 7 resume os dados estatísticos de comparação entre os grupos e momentos de avaliação para as médias do teste isocinético.

Tabela 7 - Valores de p correspondentes aos testes para comparação das médias (efeitos de grupo, momento de avaliação e interação entre estes)

EFEITO	60°/S	240°/S
Grupo (PRP X controle)	0,450	0,711
Momento de avaliação (pré X pós)	<0,001	0,002
Interação	0,818	0,562

Valores de p obtidos do modelo de efeitos mistos.

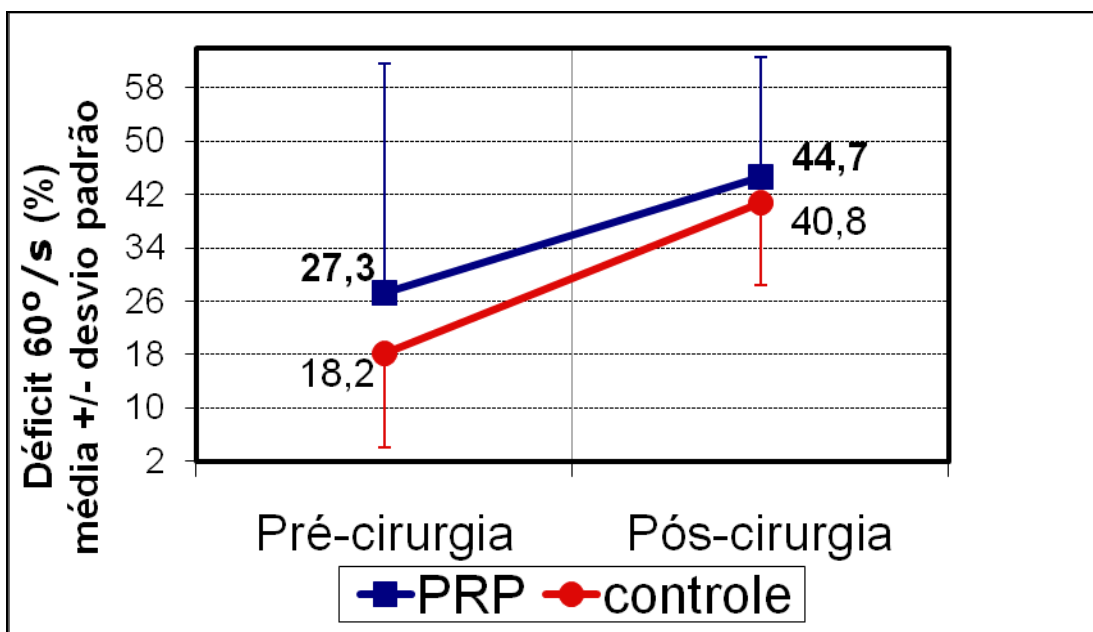


Figura 16. Déficit de pico de torque entre o membro operado e o não operado, a 60°/s

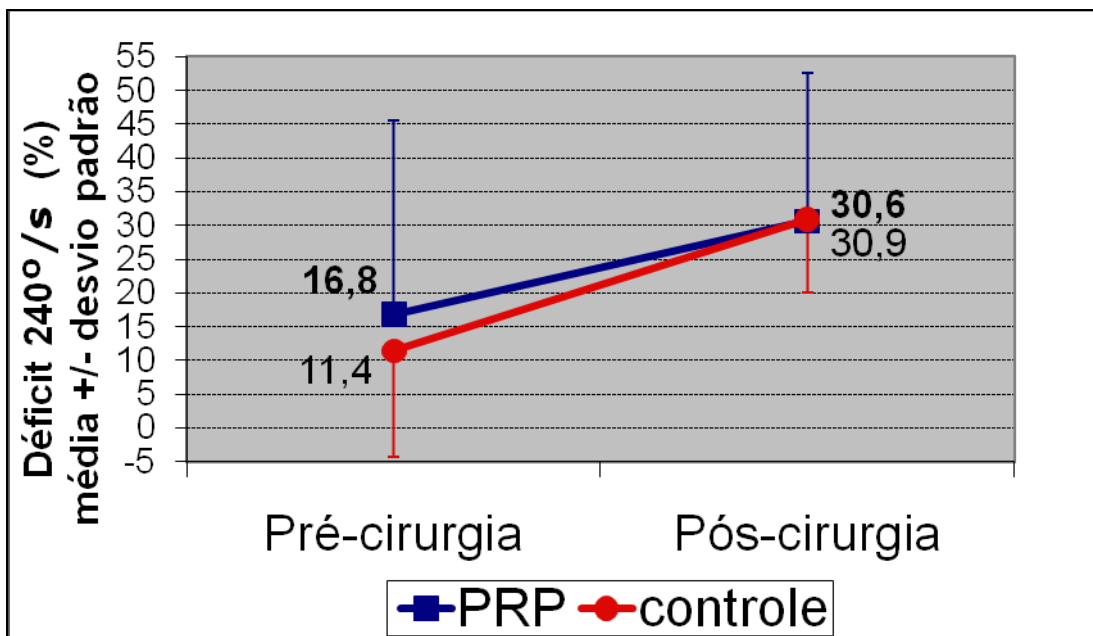


Figura 17. Déficit de pico de torque entre o membro operado e o não operado, a 240°/s

4.5. Questionários

As medidas descritivas dos dados obtidos dos questionários Lysholm, IKDC, Kujala e Tegner são apresentadas, respectivamente, nas tabelas 8 a 11 e nas figuras 18 a 21.

A tabela 12 mostra os resultados dos testes estatísticos para as comparações das médias dos questionários. Para todos os questionários a análise estatística não evidenciou efeitos de interação. Não observamos diferenças significantes entre os grupos. No entanto, observamos um efeito marginal para as médias do questionário Tegner entre os grupos, com maiores valores pós-operatórios no grupo PRP ($p=0,064$).

Observamos diferenças significantes entre as médias de pré e pós-operatório em ambos os grupos. Nos questionários Lysholm, IKDC e Kujala, os valores foram maiores no pós-operatório. No questionário Tegner os valores foram menores no pós-operatório.

Tabela 8. Medidas descritivas para as respostas ao questionário Lysholm avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos

LYSHOLM	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Pré-operatório	PRP	12	65,8	15,9	63,5	45	88
	Controle	15	55,8	15,5	58,0	25	75
	TOTAL	27	60,2	16,2	60,0	25	88
Pós-operatório	PRP	10	88,5	10,5	91,5	64	100
	Controle	15	88,1	8,2	89,0	69	100
	TOTAL	25	88,2	8,9	90,0	64	100

Tabela 9. Medidas descritivas para as respostas ao questionário IKDC avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos

IKDC	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Pré-operatório	PRP	12	56,17	18,87	54,28	25,28	83,91
	Controle	15	53,49	17,18	55,17	25,29	93,10
	TOTAL	27	54,68	17,65	54,54	25,28	93,10
Pós-operatório	PRP	10	76,21	13,34	79,31	50,57	96,55
	Controle	15	74,45	10,99	73,56	52,87	98,85
	TOTAL	25	75,15	11,75	74,71	50,57	98,85

Tabela 10. Medidas descritivas para as respostas ao questionário Kujala avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos

KUJALA	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Pré-operatório	PRP	12	68,4	22,2	62,5	32	98
	Controle	15	69,3	13,6	69,0	51	91
	TOTAL	27	68,9	17,6	64,0	32	98
Pós-operatório	PRP	10	87,3	9,3	88,5	70	98
	Controle	15	84,7	7,1	86,0	72	95
	TOTAL	25	85,7	8,0	87,0	70	98

Tabela 11. Medidas descritivas para as respostas ao questionário Tegner avaliadas nos momentos pré e pós-operatório, segundo grupos

TEGNER	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Pré-operatório	PRP	10	8,6	1,2	9,0	7	10
	Controle	14	7,4	1,3	7,0	5	10
	TOTAL	24	7,9	1,4	7,0	5	10
Pós-operatório	PRP	9	5,2	1,0	5,0	4	7
	Controle	14	4,9	1,5	4,0	4	9
	TOTAL	23	5,0	1,3	5,0	4	9

Tabela 12. Valores de p correspondentes aos testes dos efeitos de grupo, momento de avaliação e interação entre estes

EFEITO	LYSHOLM	IKDC	KUJALA	TEGNER
Grupo (PRP X controle)	0,147	0,698	0,748	0,064
Momento de avaliação (pré X pós)	<0,001	<0,001	0,001	<0,001
Interação	0,204	0,826	0,640	0,294

Valores de p obtidos do modelo de efeitos mistos.

A Tabela 13 apresenta as medidas descritivas da escala visual analógica de dor segundo os grupos. Observamos que a média para o grupo PRP foi menor que a do grupo controle (figura 22).

Tabela 13 - Medidas descritivas referentes à escala visual analógica de dor (EVA), segundo grupos

	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
EVA	PRP	12	3,8	1,0	4,0	2,0	6,0
	Controle	14	5,1	1,4	5,0	2,0	7,0
p=0,020	TOTAL	26	4,5	1,4	4,0	2,0	7,0

Valor de p referente ao teste t de Student.

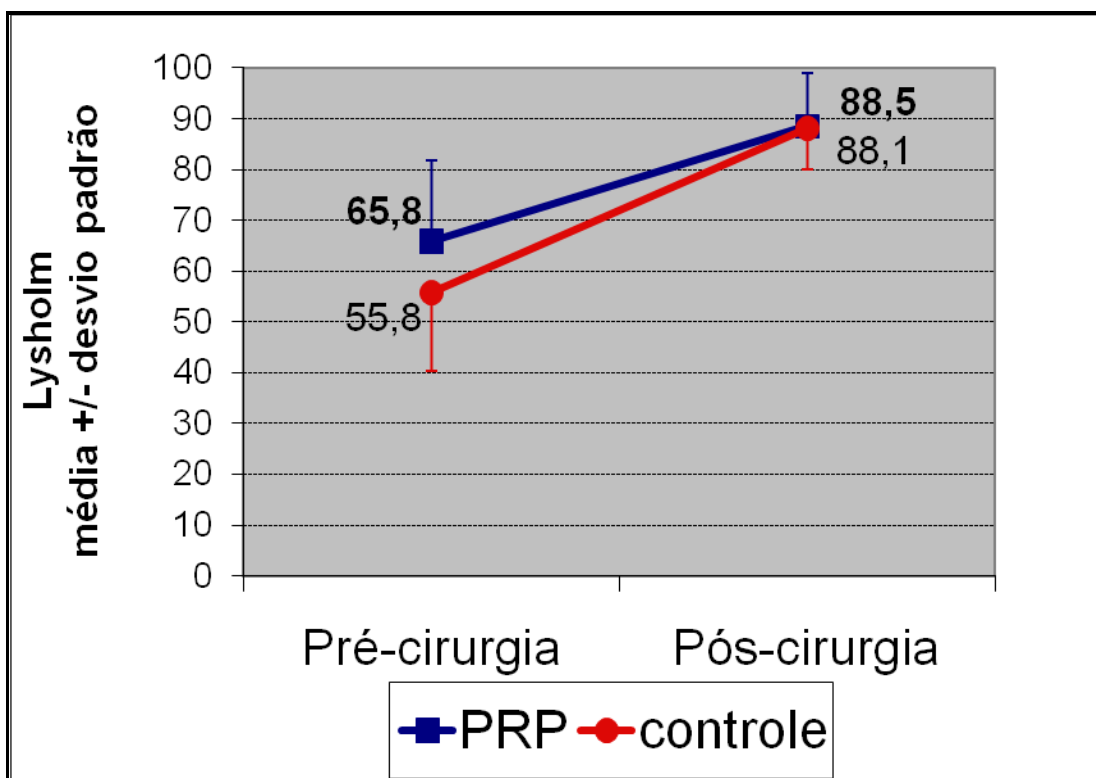


Figura 18. Scores dos questionários de Lysholm no pré e pós-operatório, em ambos os grupos
 $p < 0,001$ (pré vs pós-operatório) N.S. entre os grupos

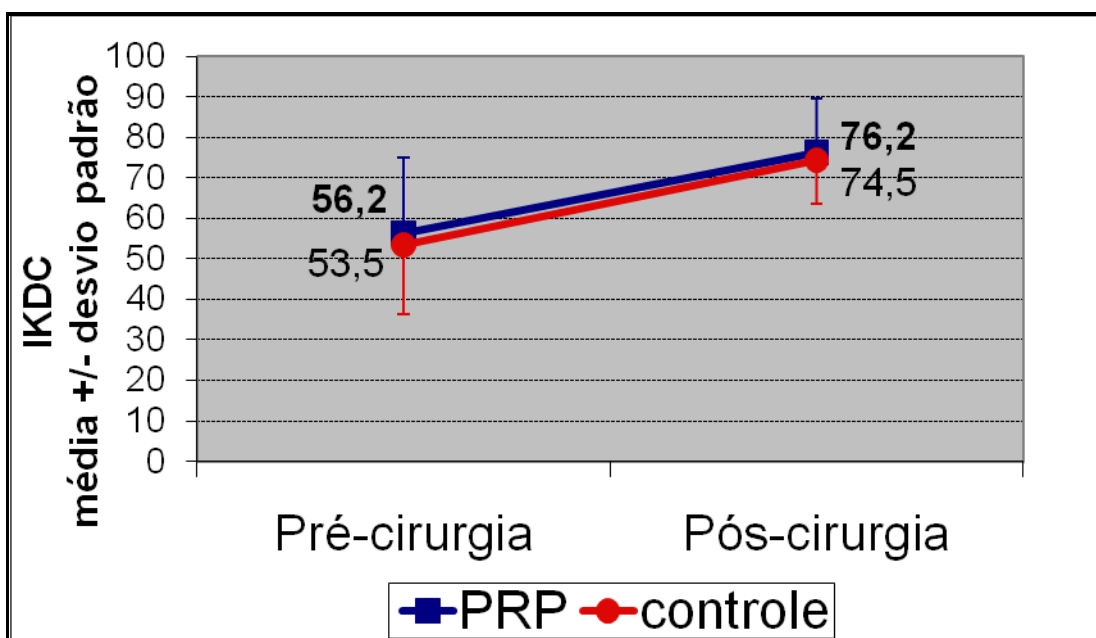


Figura 19. Scores dos questionários IKDC no pré e pós-operatório, em ambos os grupos
 $p < 0,001$ (pré vs pós-operatório) N.S. entre os grupos

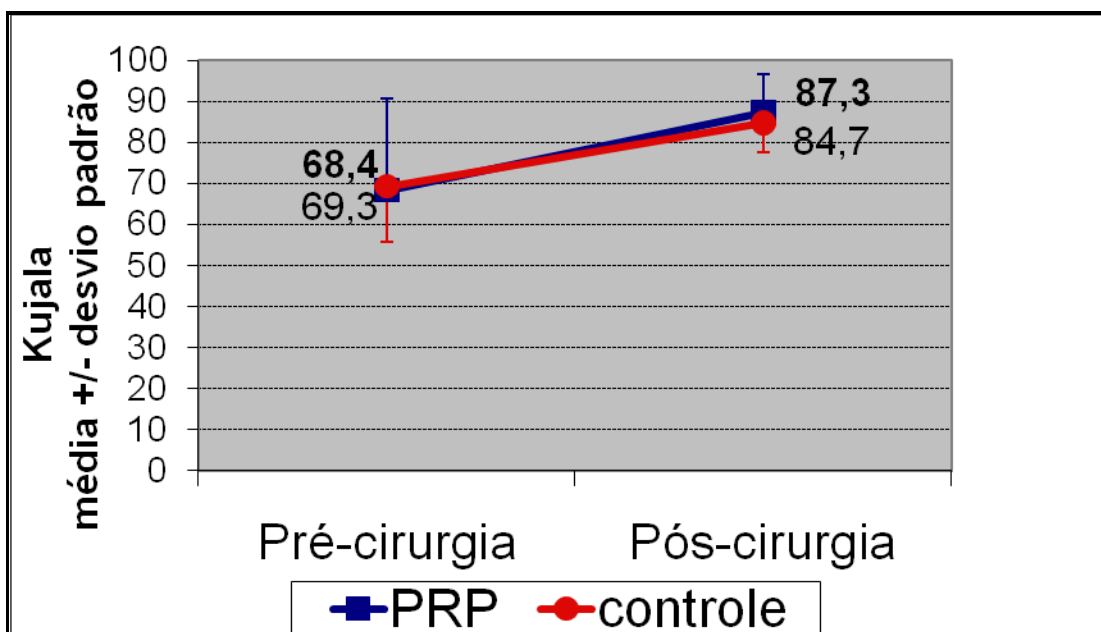


Figura 20. Scores dos questionários de Kujala no pré e pós-operatório, em ambos os grupos
 $p < 0,001$ (pré vs pós-operatório) N.S entre os grupos.

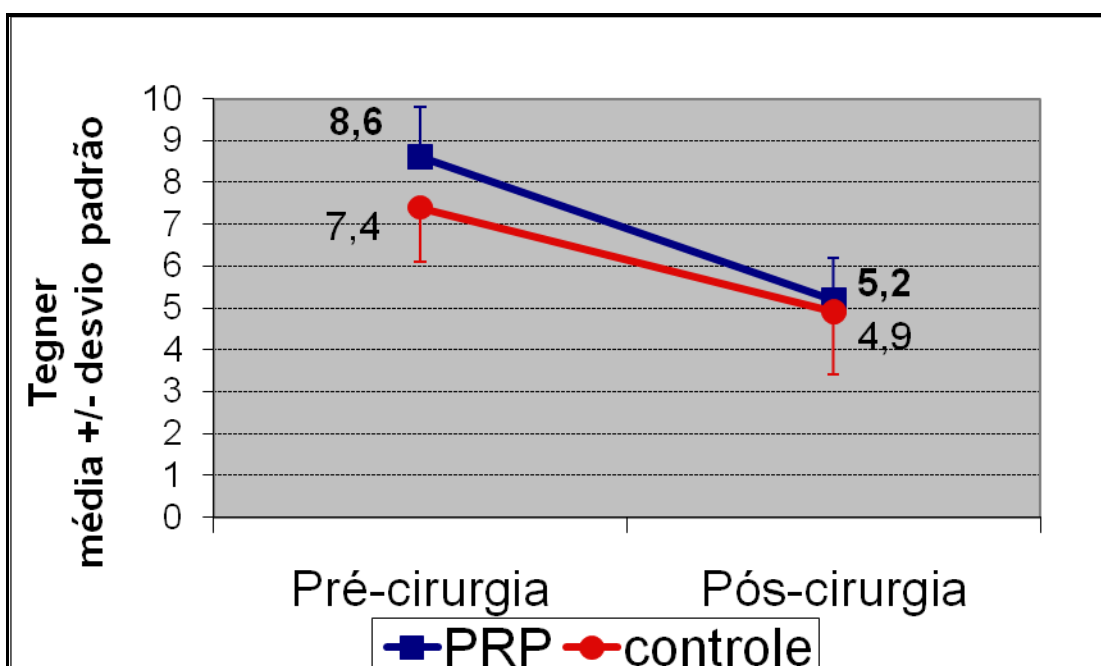


Figura 21. Scores dos questionários de Tegner no pré e pós-operatório, em ambos os grupos
 $p < 0,001$ (pré vs pós-operatório); $p = 0,064$ entre os grupos (N.S.)

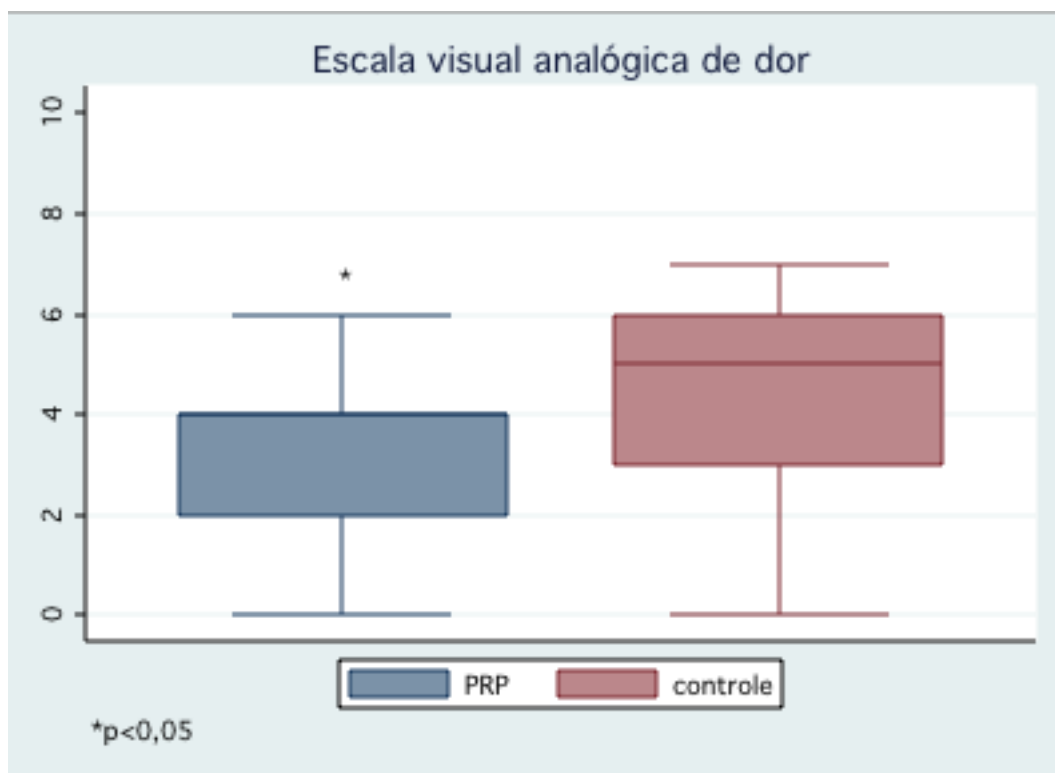


Figura 22. Escaia visual analógica de dor (EVA) pós-operatória imediata

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os primeiros relatos do uso do PRP em cirurgia datam de meados da década de 1990, em cirurgias bucomaxilofaciais^(9, 24). A partir de então, o PRP vem sendo utilizado em diversas áreas da medicina e cirurgia, inclusive na ortopedia e medicina esportiva. Apesar de ser um assunto bastante discutido e debatido na atualidade, há uma carência de estudos prospectivos, randomizados, de elevado nível de evidência científica, que corroborem sua utilização. Essa opinião é compartilhada por diversos especialistas em revisões sobre o assunto^(47, 56, 57).

Os métodos de obtenção do PRP descritos até o momento podem basicamente ser divididos em dois tipos: por centrifugação ou por plaquetaférese. O PRP obtido por plaquetaférese foi utilizado nos primeiros estudos⁽²⁴⁾, e o método de centrifugação foi desenvolvido em seguida como uma alternativa mais rápida e menos dispendiosa de obtenção do PRP^(1, 2). A literatura mostra que o PRP obtido por aférese, método utilizado nesse estudo, apresenta uma maior concentração de plaquetas e menor concentração de leucócitos do que o obtido por centrifugação⁽¹¹⁾, podendo ser considerado portanto um concentrado de plaquetas mais puro⁽⁵³⁾.

Há diversos estudos na literatura demonstrando o efeito de fatores de crescimento na reparação ou regeneração tecidual em tendões e

ligamentos. São em sua maioria estudos de ciência básica em animais de experimentação, realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esses estudos mostram que os fatores de crescimento agem em diferentes fases do processo de reparação e regeneração tecidual (fase inflamatória, proliferativa, de reparação e de remodelação)⁽²⁶⁾.

A fase inflamatória caracteriza-se pela migração celular, processo em que atuam principalmente o IGF-I, PDGF e TGF- β . Lyras *et al*⁽⁶⁴⁾ observaram maior cicatrização do ligamento da patela em coelhos com o uso do PRP, associada a maior expressão celular de IGF-1. A fase proliferativa é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e neoangiogênese, fase em que atuam o VEGF, IGF-I e bFGF. Chan *et al*^(31, 46) demonstraram aumento na proliferação de fibroblastos com a aplicação de bFGF em ligamentos da patela em coelhos. Na fase de reparação ocorre a produção de matriz extracelular, principalmente colágeno tipos I e III e proteoglicanos. Observou-se aumento da síntese de colágeno e aumento da resistência e rigidez de ligamentos patelares em coelhos com a aplicação de TGF- β ⁽³³⁾. Na fase de remodelação, além da atuação dos fatores de crescimento, é fundamental a presença de estímulo mecânico. Virchenko e Aspenberg⁽⁶²⁾ observaram que a aplicação de toxina botulínica em tendões calcâneos de ratos eliminou os efeitos positivos do PRP. Esses estudos nos ajudam a explicar como uma única infiltração de PRP pode aumentar a regeneração e a resistência final do tendão ou ligamento^(32, 33, 63). A aplicação do PRP pode acelerar a reparação tecidual e permitir a aplicação do estímulo mecânico

precocemente, gerando um círculo virtuoso que culmina em uma maior regeneração tecidual.

Uma das vantagens do PRP é possuir um aumento proporcional na concentração dos fatores de crescimento⁽⁴⁷⁾. A regeneração tecidual é um processo complexo e composto de várias etapas, e a aplicação de um fator de crescimento isolado pode levar a um desequilíbrio nesse processo. No PRP, estes fatores de crescimento estão em concentrações aumentadas proporcionalmente, e espera-se haver uma estimulação equilibrada do processo de cicatrização⁽⁴⁷⁾.

Outra vantagem do PRP é sua origem completamente autóloga, o que praticamente elimina o risco de complicações alérgicas ou transmissão de doenças, exceto as causadas por contaminação no preparo. Alguns sistemas de obtenção do PRP utilizavam trombina bovina para ativação das plaquetas, o que acarretou em casos de coagulopatias graves por formação de anticorpos em alguns pacientes⁽³⁴⁾. Em nosso estudo a ativação das plaquetas para formação do gel foi feita utilizando trombina autóloga, obtida do plasma do próprio paciente.

Embora os modelos experimentais em animais nos ajudem a compreender os mecanismos básicos da atuação do PRP no processo de cicatrização, existem limitações importantes em transpor os resultados destes estudos para seres humanos. Por outro lado, em seres humanos há

dificuldade de se empregar uma metodologia adequada em estudos experimentais ou de intervenção, principalmente quando se trata de lesões traumáticas como as lesões tendíneas e ligamentares. Isto ocorre devido a heterogeneidade das lesões, com relação ao tempo de evolução, localização precisa e magnitude da lesão, demanda do paciente, entre outros fatores. Por este motivo grande parte dos estudos sobre o PRP em lesões tendíneas e ligamentares são séries de casos ou estudos não randomizados. Sanchez *et al*, em 2007⁽¹⁵⁾, avaliaram o uso do PRP em lesões traumáticas do tendão calcâneo, observando que houve uma melhora funcional e um retorno precoce às atividades esportivas nos pacientes em que o PRP foi adicionado ao reparo cirúrgico, comparado com um grupo controle retrospectivo. Radice *et al*⁽²¹⁾ utilizaram o PRP em reconstruções do LCA, e com ressonância magnética seriada avaliaram o aspecto do enxerto quanto à presença de alteração de sinal na imagem da ressonância. Observaram que nos casos do grupo PRP o enxerto apresentou um aspecto homogêneo em metade do tempo.

Recentemente foram publicados ensaios clínicos controlados e randomizados sobre o uso do PRP em lesões de tendões e ligamentos. Schepull *et al*, em 2010, em um estudo prospectivo e randomizado, não demonstraram eficácia do PRP no tratamento de lesões do tendão calcâneo. Nin *et al*⁽²⁰⁾ avaliaram o efeito do PRP nos resultados clínicos da reconstrução do ligamento cruzado anterior com aloenxerto de ligamento da patela, em um estudo prospectivo, randomizado, duplo cego, em um total de

cem pacientes. Não observaram diferença entre os grupos com relação a estabilidade articular, presença de sinais inflamatórios, escala de dor, ou imagem de ressonância magnética.

A retirada de enxerto do terço central do ligamento da patela é um procedimento cirúrgico padronizado, e por essa razão optamos por utilizá-lo como modelo experimental. O objetivo primário desse estudo foi avaliar o efeito do PRP na regeneração do ligamento. O processo de regeneração do defeito criado no ligamento da patela após retirada do seu terço central é bem documentado em vários estudos na literatura, com ultrassonografia⁽³⁷⁾, histopatologia⁽⁴²⁾ e ressonância magnética^(35, 36, 38-42). Consideramos, a partir desses estudos, a ressonância magnética como um método de imagem apropriado para comparar a regeneração do ligamento da patela nos casos em que adicionamos o PRP com um grupo controle, em que nada foi acrescentado.

Os trabalhos existentes mostram que há a presença de um processo natural de regeneração do ligamento da patela após a retirada de enxerto, sem a adição de PRP ou fatores de crescimento^(35, 36, 38-42). Os estudos com ressonância magnética seriada mostram que aos seis meses de pós-operatório a largura desse defeito, inicialmente de 10 mm, situa-se entre 6 mm⁽³⁸⁾ e 9 mm⁽³⁹⁾, em média. Essa regeneração progride até cerca de 24 meses, atingindo um platô após esse período. Porém mesmo com o passar

de vários anos persiste um defeito com cerca de 2 mm de largura na maior parte dos casos^(40, 41).

O presente trabalho é o primeiro ensaio clínico, pelo que sabemos, utilizando o PRP no ligamento da patela em seres humanos. Nossa hipótese inicial foi a de que nos casos do grupo PRP haveria maior regeneração tecidual, e portanto a área não regenerada do ligamento da patela seria menor. Observamos nos casos do grupo PRP uma área não regenerada do ligamento da patela de 4,95 mm², comparada a 9,38 mm² no grupo controle, em média. Esta diferença foi significativa do ponto de vista estatístico (p=0,046). Observamos em três casos do grupo PRP o fechamento completo do defeito aos seis meses, o que não ocorreu em nenhum caso do grupo controle. Portanto nos ligamentos em que foi adicionado o PRP houve maior regeneração tecidual do que nos casos em que nada foi acrescentado, corroborando a hipótese inicial.

Optamos por realizar a ressonância magnética aos seis meses para poder avaliar a regeneração em uma fase mais aguda, pois na fase de platô as diferenças entre os grupos poderiam tender a desaparecer. Estudos experimentais mostram que o maior efeito do PRP ocorre nas fases iniciais da cicatrização e regeneração tecidual^(30-32, 45, 62).

Apesar de termos proposto realizar a ressonância seis meses após a cirurgia, frequentemente houve um atraso na execução do exame em ambos

os grupos. Isto ocorreu devido ao não comparecimento de alguns pacientes (cinco casos de 27 pacientes, ou 18,5%) e a características do serviço, que é um hospital terciário com grande volume de urgências e emergências. Dessa forma para os pacientes do grupo PRP a média de tempo pós-operatório para execução da ressonância foi de 208 dias e para o grupo controle foi de 212 dias, o que não foi estatisticamente significativo.

Outros parâmetros avaliados na ressonância foram a altura da patela, com o índice de Insall-Salvati, e a área total de secção transversa, medida no ponto médio do ligamento. Nosso intuito foi avaliar a presença de hipertrofia ou encurtamento do ligamento da patela. Uma cicatrização com formação de fibrose excessiva poderia ocasionar um quadro de *patela baja*⁽⁶⁰⁾. Meisterling *et al*⁽³⁶⁾ compararam a espessura do ligamento da patela após retirada do enxerto com o lado não envolvido, e não observaram diferença significativa. Em nosso estudo as médias do índice de Insall-Salvati e da área de secção transversa do ligamento da patela foram semelhantes em ambos os grupos, e não observamos nenhum caso de *patela baja*.

A concentração ideal de plaquetas no PRP ainda não é bem definida, porém é citada a concentração em torno de $1\ 000\ 000/\text{mm}^3$ ^(28, 74). No presente estudo a concentração média de plaquetas foi de $1\ 185\ 166/\text{mm}^3$, o que representou um aumento médio de 7,65 vezes a concentração de plaquetas no sangue periférico, e esteve dentro do preconizado como satisfatório pela maior parte dos estudos que abordam

este assunto^(1,2,12,24). A presença de leucócitos pode influenciar as propriedades do PRP, devido à presença de mieloperoxidase, que tem atividade pró-inflamatória⁽⁵¹⁾, e variações nas quantidades de fatores de crescimento, alguns presentes nos leucócitos. A concentração de leucócitos mostrou ser residual no PRP obtido neste estudo (média de 0,91/mm³).

Correlacionamos a área não regenerada do ligamento da patela e a concentração de plaquetas do PRP e observamos uma correlação positiva moderada entre estes parâmetros ($\rho=0,609$). Ou seja, os casos que tiveram concentração de plaquetas mais elevadas foram os casos que apresentaram a persistência de maior área não regenerada. Este dado, a princípio paradoxal, sugere haver uma concentração ideal de plaquetas e que concentrações muito elevadas podem ter um efeito de inibição da cicatrização. Estudos sobre PRP e regeneração óssea já sugeriram que uma concentração de plaquetas excessivamente alta pode ter um efeito inibitório⁽⁴⁹⁾.

Como objetivo secundário avaliamos os casos com relação a parâmetros clínicos e funcionais. A avaliação por imagem não traduz o resultado clínico, ou seja, melhor resultado funcional, melhor reabilitação, menor intensidade de dor. Utilizamos questionários específicos de função do joelho e escala visual analógica de dor, e empregamos teste isocinético para avaliação funcional.

Comparamos os grupos com relação a idade, gênero e presença de lesões meniscais e condrais associadas e não observamos diferença significativa. Consideramos importante esta avaliação porque a heterogeneidade nestes parâmetros poderia causar diferenças no resultado do procedimento cirúrgico. Além disso, em estudos experimentais observou-se que o efeito do PRP sobre a migração e proliferação de fibroblastos parece ser maior em indivíduos mais jovens, caracterizando um efeito idade-dependente⁽⁶⁵⁾.

A EVA foi empregada em todos os pacientes no primeiro dia de pós-operatório para avaliar a dor. Observamos nos pacientes do grupo PRP a média da EVA de 3,8, e no grupo controle de 5,1. Houve diferença significativa entre os grupos do ponto de vista estatístico ($p=0,02$). Portanto os pacientes do grupo PRP apresentaram menor intensidade de dor pós-operatória do que os pacientes do grupo controle.

O efeito analgésico do PRP no período pós-operatório foi observado por Gardner *et al*⁽⁷⁾ em pacientes submetidos a artroplastia total do joelho, que tiveram menor intensidade de dor e necessitaram de menor quantidade de analgésicos. O mesmo foi observado no pós-operatório imediato de cirurgias odontológicas⁽⁷⁵⁾. As plaquetas contém, além dos fatores de crescimento situados nos alfa-grânulos, outras substâncias armazenadas nos grânulos densos, como serotonina, histamina e dopamina, que podem ter efeito analgésico⁽²⁸⁾.

A avaliação clínica foi realizada com os questionários de Tegner, Lysholm, IKDC e Kujala, no pré-operatório e ao seis meses de pós-operatório. Estes questionários foram desenvolvidos para avaliar a função do joelho, e representam, neste caso, principalmente os resultados do procedimento cirúrgico de reconstrução do LCA com enxerto do ligamento da patela. Nosso intuito foi avaliar de forma objetiva se a utilização do PRP afeta os resultados do procedimento, porém sabemos que estes instrumentos de avaliação não são específicos para sintomas referentes ao ligamento da patela.

O questionário de Lysholm⁽⁷⁰⁾ foi desenvolvido para avaliar resultados de cirurgias no joelho, enfatizando os sintomas de instabilidade. Foi validado para a língua portuguesa em 2006⁽⁷¹⁾. Tegner e Lysholm⁽⁷²⁾ propuseram uma modificação do questionário de Lysholm, sendo útil para comparar o nível de atividade física em diferentes momentos. O questionário IKDC avalia não apenas sintomas mas também a função do joelho e o comprometimento na execução de tarefas ou atividades habituais, não apenas esportivas⁽⁶⁹⁾. O questionário proposto por Kujala⁽⁷³⁾ é mais específico para sintomas da região patelofemoral, mas enfatiza bastante sintomas de instabilidade da patela.

Os pacientes de ambos os grupos apresentaram melhora significativa na pontuação dos questionários de Lysholm, IKDC e Kujala com relação aos resultados pré-operatórios, demonstrando o resultado satisfatório da

reconstrução do LCA nesses pacientes. Observamos que não houve diferença entre os grupos nos resultados desses questionários.

Com relação ao questionário de Tegner, os resultados aos seis meses de pós-operatório foram inferiores aos níveis pré-operatórios, o que de certa forma já era esperado, uma vez que na cirurgia de reconstrução do LCA o paciente está iniciando o retorno às atividades esportivas plenas aos seis meses. Comparando os grupos a análise estatística observou um valor de $p=0,064$, o que não foi significativo mas caracterizou uma tendência a favor do grupo PRP.

Utilizamos o teste isocinético para avaliar o déficit de força muscular do membro operado. Os testes isocinéticos não reproduzem perfeitamente os movimentos e contrações musculares das atividades cotidianas, porém são úteis por permitirem quantificar déficits musculares, possibilitarem distinguir os pacientes aptos a retornar de forma mais segura às atividades esportivas, e correlacionarem-se, ao menos de forma moderada, a avaliações subjetivas de função do joelho⁽⁶⁶⁾.

Em ambos os grupos houve um maior déficit de pico de torque no pós-operatório comparado ao pré-operatório, o que está de acordo com o esperado segundo a literatura para este tipo de procedimento^(67, 68). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Os instrumentos de avaliação clínica e funcional utilizados em nosso estudo referem-se aos resultados da reconstrução do LCA, em que a regeneração da área doadora do enxerto é apenas uma parte do resultado final. Um dos pontos fracos desse estudo é não avaliar especificamente os resultados do tratamento da lesão do ligamento da patela. Complicações graves decorrentes da retirada de enxerto do ligamento da patela, incluindo rupturas deste ligamento, são raras, estimadas em 0,2%^(58, 59). Por este motivo não foi nossa intenção avaliar esse desfecho no presente estudo, o que necessitaria de uma casuística muito grande e um longo tempo de observação para estudar uma ocorrência tão pouco frequente.

Um estudo histológico e biomecânico do tecido regenerado poderia acrescentar valiosas informações. Foram publicados estudos experimentais avaliando o efeito de fatores de crescimento isolados, e mais recentemente do PRP, na regeneração do ligamento da patela em ratos e coelhos. Esses estudos demonstraram aumento da resistência, rigidez e regeneração tecidual do ligamento com o uso dessas substâncias^(31, 33, 45, 46, 64). A falta de um estudo histológico e biomecânico é outro ponto fraco desse trabalho, porém há limitações de se realizar esse tipo de estudo em *anima nobile*.

O número de pacientes nesse estudo pode ser considerado pequeno, mas observamos que o número de indivíduos incluídos está de acordo com a média dos ensaios clínicos sobre o PRP em medicina esportiva^(14-21, 54, 55). Por ser um estudo inédito não houve um parâmetro na literatura para nos

orientar qual seria a casuística apropriada, pois necessitaríamos de uma estimativa do efeito esperado para calcularmos o tamanho da amostra. Utilizamos os dados dos primeiros casos como um estudo piloto para este cálculo, com um nível de significância de 5% e poder de 80%. Com os resultados iniciais estimamos 65 pacientes em cada grupo, o que seria impraticável com o tempo e recursos disponíveis.

Um ponto forte desse estudo é tratar-se de um estudo prospectivo, randomizado, avaliador cego, em que todos os parâmetros foram avaliados independentemente. Outro ponto forte é o modelo experimental utilizado, em que uma lesão padronizada é realizada cirurgicamente. Com este modelo experimental, podemos avaliar e comparar os resultados de um procedimento bem estabelecido.

Demonstramos neste trabalho que o PRP aumentou a regeneração tecidual da área doadora de enxerto do ligamento da patela, sem ocasionar hipertrofia ou encurtamento do ligamento. Observamos ainda um efeito analgésico do PRP no pós-operatório imediato. Não observamos diferença nos resultados clínicos e funcionais do procedimento aos seis meses. Estudos avaliando clinicamente o uso do PRP em rupturas traumáticas do ligamento da patela poderão ajudar a demonstrar se este efeito pode se manifestar com um melhor resultado clínico ou funcional no tratamento das lesões tendíneas e ligamentares.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Concluimos, nessa amostra, que o uso do PRP no defeito do terço central do ligamento da patela na reconstrução do LCA, nos primeiros seis meses:

- 1- Determinou maior regeneração tecidual do defeito no terço médio do ligamento da patela;
- 2- Diminuiu a intensidade da dor pós-operatória imediata;
- 3- Não ocasionou hipertrofia ou encurtamento no ligamento da patela na avaliação por ressonância magnética;
- 4- Não modificou os resultados clínicos e funcionais da cirurgia.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo 1 - Relação dos pacientes estudados

PACIENTE	RGHC	GRUPO	IDADE	GÊNERO	DATA CIRURGIA
TDP	44113463B	B	29	M	26.11.08
WFV	44121831A	A	24	M	26.11.08
AAM	44122094G	A	27	F	03.12.08
AAM	44103540B	A	44	M	17.12.08
PJG	44122438E	A	37	M	31.01.09
WML	44122797I	B	23	M	11.02.09
NSFA	44122697B	A	19	M	25.04.09
HBM	44122369J	B	34	M	29.04.09
DLP	44119954I	B	19	M	03.06.09
MTG	44123226B	A	21	M	10.06.09
GHL	44123997G	B	16	M	17.06.09
NCV	44124034D	A	19	F	08.07.09
RNS	44123090F	A	27	M	15.07.09
SP	44124248K	B	18	M	05.08.09
RMB	44122964B	B	29	M	19.08.09
PHSC	44123994J	A	18	M	16.09.09
ASM	44122464K	B	15	F	23.09.09
LBFS	44125271D	B	30	M	18.11.09
DES	44124954F	B	26	M	25.11.09
RAFS	44123291H	B	26	M	02.12.09
FC	44125150D	B	18	M	09.12.09
MVSS	44125561F	B	18	M	12.12.09
WNAR	44125417H	B	20	M	12.12.09
TPS	44125433F	A	24	M	16.12.09
BGI	44125554F	A	24	M	23.12.09
JED	44100904I	B	26	M	30.12.09
TSM	44125907B	A	26	M	02.02.10

Anexo 2 - Resultados dos questionários

Grupo A	QUESTIONÁRIOS PRÉ				QUESTIONÁRIOS PÓS			
	IKDC PRÉ	LYSHOLM PRÉ	KUJALA PRÉ	TEGNER PRÉ	IKDC PÓS	LYSHOLM PÓS	KUJALA PÓS	TEGNER PÓS
WFV	73,56	87,00	96,00	9,00	70,11	94,00	84,00	5,00
AAM	40,23	50,00	50,00	10,00	62,07	80,00	82,00	4,00
AA	54,02	85,00	96,00	9,00	50,57	64,00	70,00	5,00
PJG	83,91	88,00	98,00	9,00	83,91	91,00	96,00	5,00
BGI	47,12	53,00	56,00	7,00	96,55	100,00	95,00	4,00
NSFA	72,41	78,00	73,00	-	81,61	90,00	89,00	-
MTG	31,03	46,00	32,00	-	-	-	-	-
PHSC	81,61	71,00	92,00	9,00	77,01	83,00	76,00	5,00
NCV	56,32	65,00	53,00	7,00	70,11	95,00	95,00	6,00
RNS	54,54	62,00	62,00	7,00	87,35	92,00	88,00	6,00
TPS	25,28	45,00	50,00	9,00	82,76	96,00	98,00	7,00
TSM	54,02	59,00	63,00	10,00				
GRUPO B	IKDC PRÉ	LYSHOLM PRÉ	KUJALA PRÉ	TEGNER PRÉ	IKDC PÓS	LYSHOLM PÓS	KUJALA PÓS	TEGNER PÓS
TDP	68,96	75,00	72,00	7,00	77,01	94,00	89,00	4,00
WML	25,29	50,00	55,00	-	65,00	84,00	87,00	-
HBM	37,93	56,00	56,00	6,00	74,71	90,00	88,00	4,00
DLP	58,62	69,00	87,00	7,00	71,26	89,00	84,00	6,00
GHL	37,93	25,00	54,00	7,00	72,41	89,00	80,00	6,00
SP	59,77	70,00	91,00	7,00	85,05	85,00	86,00	4,00
RMB	75,86	65,00	82,00	7,00	73,56	96,00	88,00	4,00
ASM	58,62	58,00	56,00	7,00	80,46	100,00	91,00	6,00
LBFS	93,10	75,00	89,00	9,00	98,85	90,00	95,00	9,00
DES	44,83	29,00	64,00	10,00	52,87	84,00	73,00	4,00
RAFS	43,68	63,00	64,00	5,00	83,91	100,00	95,00	4,00
FC	48,27	57,00	69,00	7,00	80,46	77,00	72,00	5,00
MVSS	56,32	46,00	72,00	7,00	73,56	89,00	83,00	4,00
WNAR	55,17	60,00	77,00	9,00	66,67	69,00	76,00	4,00
JED	37,93	39,00	51,00	9,00	60,91	85,00	83,00	4,00

Anexo 3. Resultados dos testes isocinéticos

GRUPO A	DÉFICIT DE TORQUE (%) PRÉ		DÉFICIT DE TORQUE (%) PÓS	
	60°/s	240°/s	60°/s	240°/s
WFV	12,80	7,70	36,50	23,30
AAM	89,60	77,10	79,30	71,50
AA	(3,60)	(5,80)	37,30	23,20
PJG	(12,70)	(21,80)	38,00	22,30
BGI	-	-	26,80	18,00
NSFA	5,80	10,30	18,20	14,90
MTG	36,40	22,10	71,40	46,60
PHSC	-	-	45,80	40,50
NCV	60,30	50,00	53,60	46,60
RNS	(11,90)	(4,40)	46,70	41,80
TPS	50,40	22,20	38,00	(11,80)
TSM	45,40	10,20	45,40	10,20
GRUPO B	60°/s	240°/s	60°/seg	240°/seg
TDP	25,20	32,20	34,60	29,20
WML	9,70	9,50	28,80	29,10
HBM	0,10	(18,00)	52,70	29,80
DLP	1,60	8,70	-	-
GHL	47,10	24,80	51,60	41,30
SP	14,70	13,40	27,80	16,30
RMB	4,40	6,30	37,30	37,20
ASM	9,10	(14,40)	51,10	34,20
LBFS	-	-	45,50	50,10
DES	28,20	19,10	46,40	20,90
RAFS	9,20	-3,00	54,70	47,80
FC	-	-	16,60	12,20
MVSS	25,30	30,70	40,20	26,20
WNAR	32,00	23,30	27,10	29,50
JED	30,40	15,60	56,10	28,40

Anexo 4. Medidas da ressonância magnética

GRUPO A	ÁREA	ÁREA LIGAMENTO (MM ²)	INSALL-SALVATI
WFV	2,20	149,40	1,00
AAM	2,64	151,10	0,82
AA	6,90	197,30	0,94
PJG	12,30	167,10	0,93
BGI	0,00	172,39	1,03
NSFA	6,67	195,36	0,95
MTG	-	-	-
PHSC	0,00	164,84	1,13
NCV	15,43	131,25	1,32
RNS	3,42	238,57	1,27
TPS	-	-	-
TSM	0,00	163,18	1,05
GRUPO B	ÁREA	ÁREA LIGAMENTO (MM ²)	INSALL-SALVATI
TDP	17,10	191,20	0,82
WML	-	-	-
HBM	7,75	128,71	1,59
DLP	-	-	-
GHL	4,55	154,87	1,01
SP	4,30	192,38	1,18
RMB	9,38	213,67	1,01
ASM	3,71	85,06	0,97
LBFS	10,51	248,60	0,82
DES	12,70	250,00	1,08
RAFS	5,47	185,25	1,10
FC	13,09	178,03	1,04
MVSS	-	-	-
WNAR	14,60	154,10	1,09
JED	9,38	133,69	1,05

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Mar;58(3):297-300; discussion -1.
2. Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Nov;62(11):1403-7.
3. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Jan;107(1):229-37; discussion 38-9.
4. Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Kluter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion.* 1999 Feb;39(2):144-8.
5. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc.* 2003 Oct;35(10):1648-52.
6. Carreon LY, Glassman SD, Anekstein Y, Puno RM. Platelet gel (AGF) fails to increase fusion rates in instrumented posterolateral fusions. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005 May 1;30(9):E243-6; discussion E7.

7. Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. An analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range of motion. *Int Orthop*. 2007 Jun;31(3):309-13.
8. Galasso O, Mariconda M, Romano G, Capuano N, Romano L, Ianno B, et al. Expandable intramedullary nailing and platelet rich plasma to treat long bone non-unions. *J Orthop Traumatol*. 2008 Sep;9(3):129-34.
9. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jun;85(6):638-46.
10. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002 Apr;30(2):97-102.
11. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Jun;14(3):357-62.
12. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Nov;114(6):1502-8.
13. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*. 2005 Mar;23(2):281-6.

14. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006 Nov;34(11):1774-8.
15. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 2007 Feb;35(2):245-51.
16. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Presti ML, Russo A, Bondi A, et al. Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury.* 2009 Jun;40(6):598-603.
17. Filardo G, Kon E, Della Villa S, Vincentelli F, Fornasari PM, Marcacci M. Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee. *Int Orthop.* 2009 Jul 31.
18. de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010 Jan 13;303(2):144-9.
19. Silva A, Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Jun;17(6):676-82.
20. Nin JR, Gasque GM, Azcarate AV, Beola JD, Gonzalez MH. Has platelet-rich plasma any role in anterior cruciate ligament allograft healing? *Arthroscopy.* 2009 Nov;25(11):1206-13.
21. Radice F, Yanez R, Gutierrez V, Rosales J, Pinedo M, Coda S. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligament grafts with and without autologous platelet-derived growth factors. *Arthroscopy.* 2010 Jan;26(1):50-7.

22. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Prado R, Muruzabal F, Andia I. Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology. *Arthroscopy*. 2010 Apr;26(4):470-80.
23. Wright-Carpenter T, Klein P, Schaferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med*. 2004 Nov;25(8):588-93.
24. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997 Nov;55(11):1294-9.
25. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009 Feb;27(1):63-9.
26. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*. 2003;33(5):381-94.
27. Borzini P, Mazzucco L. Platelet gels and releasates. *Curr Opin Hematol*. 2005 Nov;12(6):473-9.
28. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009 Nov;37(11):2259-72.

29. Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Long-term explant culture of rabbit flexor tendon: effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and serum on matrix metabolism. *J Orthop Res*. 1991 Jul;9(4):503-15.
30. Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med*. 1999 May-Jun;27(3):363-9.
31. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand*. 2000 Oct;71(5):513-8.
32. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand*. 2004 Feb;75(1):93-9.
33. Anaguchi Y, Yasuda K, Majima T, Tohyama H, Minami A, Hayashi K. The effect of transforming growth factor-beta on mechanical properties of the fibrous tissue regenerated in the patellar tendon after resecting the central portion. *Clin Biomech* (Bristol, Avon). 2005 Nov;20(9):959-65.
34. Landesberg R, Moses M, Karpatkin M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Sep;56(9):1116-7.
35. Berg EE. Intrinsic healing of a patellar tendon donor site defect after anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res*. 1992 May(278):160-3.
36. Meisterling RC, Wadsworth T, Ardill R, Griffiths H, Lane-Larsen CL. Morphologic changes in the human patellar tendon after bone-tendon-bone anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res*. 1993 Apr(289):208-12.

37. Hernandez A, Saad M, Tanaka M, Itaya R, Homsy C, Amatuzzi M. Estudo ultrassonográfico de tendões patelares submetidos à retirada do terço central em reconstruções ligamentares do joelho. *Rev Bras Ortop.* 1993;28(1/2):64-8.
38. Bernicker JP, Haddad JL, Lintner DM, DiLiberti TC, Bocell JR. Patellar tendon defect during the first year after anterior cruciate ligament reconstruction: appearance on serial magnetic resonance imaging. *Arthroscopy.* 1998 Nov-Dec;14(8):804-9.
39. Kartus J, Lindahl S, Kohler K, Sernert N, Eriksson BI, Karlsson J. Serial magnetic resonance imaging of the donor site after harvesting the central third of the patellar tendon. A prospective study of 37 patients after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1999;7(1):20-4.
40. Koseoglu K, Memis A, Argin M, Arkun R. MRI evaluation of patellar tendon defect after harvesting its central third. *Eur J Radiol.* 2004 Jun;50(3):292-5.
41. Svensson M, Kartus J, Ejerhed L, Lindahl S, Karlsson J. Does the patellar tendon normalize after harvesting its central third?: a prospective long-term MRI study. *Am J Sports Med.* 2004 Jan-Feb;32(1):34-8.
42. Kartus J, Movin T, Papadogiannakis N, Christensen LR, Lindahl S, Karlsson J. A radiographic and histologic evaluation of the patellar tendon after harvesting its central third. *Am J Sports Med.* 2000 Mar-Apr;28(2):218-26.

43. Svensson M, Movin T, Rostgard-Christensen L, Blomen E, Hultenby K, Kartus J. Ultrastructural collagen fibril alterations in the patellar tendon 6 years after harvesting its central third. *Am J Sports Med.* 2007 Feb;35(2):301-6.
44. Liden M, Ejerhed L, Sernert N, Bovaller A, Karlsson J, Kartus J. The course of the patellar tendon after reharvesting its central third for ACL revision surgery: a long-term clinical and radiographic study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Nov;14(11):1130-8.
45. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, et al. The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009 Nov;129(11):1577-82.
46. Chan BP, Chan KM, Maffulli N, Webb S, Lee KK. Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Sep(342):239-47.
47. Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med.* 2008 May;42(5):314-20.
48. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Feb;84(2):415-21.
49. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004 Apr;34(4):665-71.

50. van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng.* 2006 Nov;12(11):3067-73.
51. Everts PA, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schonberger JP, van Zundert A, et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006 Oct;16(5):363-8.
52. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Vox Sang.* 2008 Apr;94(3):202-8.
53. 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 Mar;27(3):158-67.
54. Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med.* 2011 Jan;39(1):38-47.
55. Maniscalco P, Gambera D, Lunati A, Vox G, Fossombroni V, Beretta R, et al. The "Cascade" membrane: a new PRP device for tendon ruptures. Description and case report on rotator cuff tendon. *Acta Biomed.* 2008 Dec;79(3):223-6.
56. de Vos RJ, van Veldhoven PL, Moen MH, Weir A, Tol JL, Maffulli N. Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy: a systematic review. *Br Med Bull.* 2010 Mar 2.

57. Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy*. 2010 Feb;26(2):269-78.
58. Mickelsen PL, Morgan SJ, Johnson WA, Ferrari JD. Patellar tendon rupture 3 years after anterior cruciate ligament reconstruction with a central one third bone-patellar tendon-bone graft. *Arthroscopy*. 2001 Jul;17(6):648-52.
59. Lee GH, McCulloch P, Cole BJ, Bush-Joseph CA, Bach BR, Jr. The incidence of acute patellar tendon harvest complications for anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2008 Feb;24(2):162-6.
60. Hantes ME, Zachos VC, Bargiotas KA, Basdekis GK, Karantanas AH, Malizos KN. Patellar tendon length after anterior cruciate ligament reconstruction: a comparative magnetic resonance imaging study between patellar and hamstring tendon autografts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2007 Jun;15(6):712-9.
61. Bagnaninchi PO, Yang Y, El Haj AJ, Maffulli N. Tissue engineering for tendon repair. *Br J Sports Med*. 2007 Aug;41(8):e10; discussion e.
62. Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop*. 2006 Oct;77(5):806-12.
63. Virchenko O, Grenegard M, Aspenberg P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop*. 2006 Dec;77(6):960-6.

64. Lyras DN, Kazakos K, Agrogiannis G, Verettas D, Kokka A, Kiziridis G, et al. Experimental study of tendon healing early phase: is IGF-1 expression influenced by platelet rich plasma gel? *Orthop Traumatol Surg Res.* 2010 Jun;96(4):381-7.
65. Magarian EM, Vavken P, Murray MM. Human anterior cruciate ligament fibroblasts from immature patients have a stronger in vitro response to platelet concentrates than those from mature individuals. *Knee.* 2010 Aug 19.
66. Pua YH, Bryant AL, Steele JR, Newton RU, Wrigley TV. Isokinetic dynamometry in anterior cruciate ligament injury and reconstruction. *Ann Acad Med Singapore.* 2008 Apr;37(4):330-40.
67. Kobayashi A, Higuchi H, Terauchi M, Kobayashi F, Kimura M, Takagishi K. Muscle performance after anterior cruciate ligament reconstruction. *Int Orthop.* 2004 Feb;28(1):48-51.
68. Dauty M, Tortellier L, Rochcongar P. Isokinetic and anterior cruciate ligament reconstruction with hamstrings or patella tendon graft: analysis of literature. *Int J Sports Med.* 2005 Sep;26(7):599-606.
69. Irrgang JJ, Anderson AF, Boland AL, Harner CD, Kurosaka M, Neyret P, et al. Development and validation of the international knee documentation committee subjective knee form. *Am J Sports Med.* 2001 Sep-Oct;29(5):600-13.
70. Lysholm J, Gillquist J. Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring scale. *Am J Sports Med.* 1982 May-Jun;10(3):150-4.

71. Peccin M CR, Cohen M. Specific questionnaire for knee symptoms - the "Lysholm Knee Scoring Scale" - Translation and validation into portuguese. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(5):268-72.
72. Tegner Y, Lysholm J. Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Sep(198):43-9.
73. Kujala UM, Jaakkola LH, Koskinen SK, Taimela S, Hurme M, Nelimarkka O. Scoring of patellofemoral disorders. *Arthroscopy.* 1993;9(2):159-63.
74. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
75. Alissa R, Esposito M, Horner K, Oliver R. The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomised clinical trial. *Eur J Oral Implantol.* 2010 Summer;3(2):121-34.