

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS CANINO

COMPARISON OF DIFFERENT PROTOCOLS TO OBTAIN CANINE PLATELETS RICH PLASMA

T. K. G. SILVA¹, J. L. S. ROCHA², A. C. G. O. LIRA JUNIOR³, K. P. OLIVEIRA⁴,
P. B. ESCODRO⁵, M. K. NOTOMI⁶

RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um hemocomponente produzindo a partir do plasma, visando a obtenção de citocinas e fatores do crescimento com fins terapêuticos, como a cicatrização e reparação de diferentes tecidos. Esse estudo quantificou a concentração plaquetária obtida utilizando-se de três diferentes protocolos de obtenção do PRP de 13 amostras de sangue de 7 cães hígidos. As velocidades de centrifugação utilizadas no protocolo I foram de 1ª centrifugação de 1.500 rpm e 2ª centrifugação de 3.000 rpm; no protocolo II, de 2.000 rpm e 3.000 rpm; e o protocolo III com 3.000 rpm e 4.000 rpm, respectivamente. O melhor resultado para a produção de PRP autólogo foi obtido no protocolo 1, seguido do protocolo 2, com aumentos de 116% e 83,05% após a 2ª centrifugação, respectivamente. Entretanto, os resultados obtidos na 1ª centrifugação foram superiores aos apresentados após a 2ª. centrifugação, observando elevações de 203,66% e 210,20% comparados aos valores basais.

PALAVRAS-CHAVE: Hemoderivado. Hemoterapia. Sangue. Trombócitos.

SUMMARY

Platelet-rich plasma (PRP) is a blood component produced from plasma, aiming at obtaining cytokines and growth factors for therapeutic purposes, such as healing and repair of different tissues. This study quantified the platelet concentration resulting from three different protocols for obtaining PRP from 13 blood samples from 8 healthy dogs. The centrifugation speeds used in protocol I was 1,500 rpm in the first centrifugation and 3,000 rpm in the second centrifugation; in protocol II, 2,000 rpm and 3,000 rpm; and protocol III with 3,000 rpm and 4,000 rpm, respectively. The best result for autologous PRP production was obtained in protocol 1, followed by protocol 2, with increases of 116% and 83.05% after the 2nd centrifugation, respectively. However, the results obtained in the 1st centrifugation were superior to those presented after the 2nd. centrifugation, observing increases of 203.66% in protocol 1 and 210.20% in protocol 2, when compared to baseline.

KEY-WORDS: Blood products. Hemotherapy. Blood. Thrombocytes.

¹ Aluno do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, Viçosa-AL, Brasil;

² Aluno do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, Viçosa-AL, Brasil;

³ Aluno do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, Viçosa-AL, Brasil;

⁴ Técnico do Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Alagoas, Viçosa-AL, Brasil;

⁵ Professor do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, Viçosa-AL, Brasil.

⁶ Professor do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, Viçosa-AL, Brasil. Fazenda São Luiz, s/n, Zona Rural, Viçosa, Alagoas, Brasil, 57.700-000. E-mail: marcia.notomi@vicosa.ufal.br

INTRODUÇÃO

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas em um baixo volume de plasma obtido por meio da centrifugação do sangue (ANITUA et al., 2006). Fatores de crescimento contidos nos alfa-grânulos plaquetários são implicados pelos benefícios observados do seu uso em muitos processos de cicatrização (OUDELAAR et al., 2019, KORNSUTHISOPON et al, 2020).

Na medicina humana, estão disponíveis vários sistemas de separação comercial para a preparação do PRP, porém as concentrações de componentes sanguíneos sofrem variações substanciais entre esses sistemas (OUDELAAR et al., 2019). Na veterinária, não há uma padronização da técnica para a produção de PRP em cães e diferentes métodos têm sido utilizados visando encontrar uma melhor concentração com a preservação das propriedades plaquetárias (FERRAZ et al., 2007; ALEIXO et al., 2011; VANAT et al., 2012, PENHA et al., 2014).

A aplicação terapêutica do PRP é explorada no tratamento de diversas alterações musculoesqueléticas, na regeneração e reparação de vários tecidos, e auxiliando, principalmente, na recuperação óssea e reparos odontológicos (VIEGAS, 2006; VENDRAMIN et al., 2009; KORNSUTHISOPON et al, 2020). A aplicabilidade terapêutica do PRP justifica a padronização de uma técnica que utilize um pequeno volume de sangue, com fácil execução e mantendo a esterilidade e propriedades do PRP (VANAT et al., 2012).

Quando derivado de sangue autólogo, o PRP provou ser uma opção terapêutica muito segura e com raros relatos de complicações (OUDELAAR et al., 2019). Assim, o objetivo desse trabalho é comparar três diferentes técnicas de preparação do PRP em cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 13 amostras de sangue oriundas de 7 cães, sendo 3 fêmeas e 4 machos, com idade superior a 1 ano, peso médio variando entre 5 a 20 Kg. Os animais apresentavam-se hígidos, segundo o exame físico, hemograma e contagem de plaquetas. Foi realizada a colheita de 8,0 mL de sangue venoso de cada animal, via jugular, utilizando uma seringa contendo o anticoagulante citrato de sódio 3,2%, na proporção de 9:1; e posteriormente, o fracionamento em dois tubos estéreis à vácuo siliconado, com 4 mL de sangue cada.

Para a produção do PRP preconizou-se 3 diferentes protocolos que se diferenciavam na velocidade da 1ª e 2ª centrifugação (Centrífuga clínica, Evlab, EV 011) mas o tempo constante de 10 minutos em cada uma delas. O protocolo I (n=4) a velocidade da 1ª centrifugação foi de 1.500 rpm (378G) e 2ª de 3.000 rpm (1.512G); o protocolo II (n=5), com 2.000 rpm (672) e 3.000 rpm (1.512G) e o protocolo III (n=4) com 3.000 rpm (1.512G) e 4.000 rpm (2.688G), respectivamente.

As contagens do número de plaquetas foram realizadas utilizando o contador hematológico automatizado Mindray BC-2800Vet, em 3 diferentes tempos: antes da centrifugação e após a 1ª e 2ª centrifugações. O tubo com o sangue coletado passou pela 1ª centrifugação, onde verificou-se a presença de três camadas no tubo, a superior composta pelo plasma, a inferior de leucócitos e hemácias, e uma camada intermediária, denominada zona de névoa formada por plaquetas e alguns leucócitos. Cerca de 2,0 mL da zona de névoa foi aspirada com auxílio de uma micropipeta com ponteira autoclavadas, e acondicionada em outro tubo estéril para a realização de uma nova a contagem celular e plaquetária. Em seguida, as amostras passavam por uma segunda centrifugação com velocidade de acordo com o seu grupo e assim, foi possível observar uma parte líquida composta pelo Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) e pelo PRP, e uma parte sólida no fundo do tubo, representado por um botão eritrocítico plaquetário. Dois terços da camada superior, correspondente ao PPP, foi retirado realizando a última contagem celular no terço restante de plasma.

A análise estatística descritiva através do programa Bioestat 5.3 e o cálculo da porcentagem de incremento foram mensurados a partir dos dados obtidos, a fim de determinar dentre as técnicas estudadas a mais indicada para a produção do PRP. A amostragem reduzida comprometeu a realização de análise estatísticas comparativas entre os grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os protocolos avaliados, o protocolo 1 que utilizou menores velocidades de centrifugação (1.500 e 3.000 rpm) foi a que apresentou o maior aumento final (116%) na concentração de plaquetas, em comparação com seu valor inicial. Já o protocolo 3, na qual possuía maior velocidade de centrifugação (3.000 e 4.000 rpm), apresentou o incremento de apenas 18,71% na concentração plaquetária (Figura 1). Porém, nas três técnicas utilizadas a segunda centrifugação reduziu o número de plaquetas totais quando comparados a primeira centrifugação (Tabela 1). No PRP final foi observada a presença de hemácias e leucócitos, sendo no G1 de $1,46 \times 10^6$ e $4,75 \times 10^3$; G2 de $4,93 \times 10^6$ e $13,7 \times 10^3$; e G3 de $1,7 \times 10^6$ e $13,98 \times 10^3$, respectivamente.

O objetivo da segunda centrifugação é concentrar as plaquetas a partir do plasma, obtido pela precipitação das plaquetas e descarte da maior parte do sobrenadante, o PPP. Para maximizar a recuperação e o rendimento de plaquetas, é necessária uma maior força e um maior tempo de centrifugação do que a utilizada na primeira rotação, conforme realizado nos três protocolos estudados. Apesar do aumento da força de centrifugação poder garantir uma maior concentração de plaquetas (PARDO, 2012), em um tempo de centrifugação muito elevado, a recuperação e o rendimento podem reduzir devido à agregação plaquetária, resultando em redução substancial da contagem de plaquetas (SHIN et al, 2017), situação esta que pode ter ocorrido neste experimento, onde o grupo que utilizou maior velocidade apresentou menor concentração na quantidade de plaquetas.

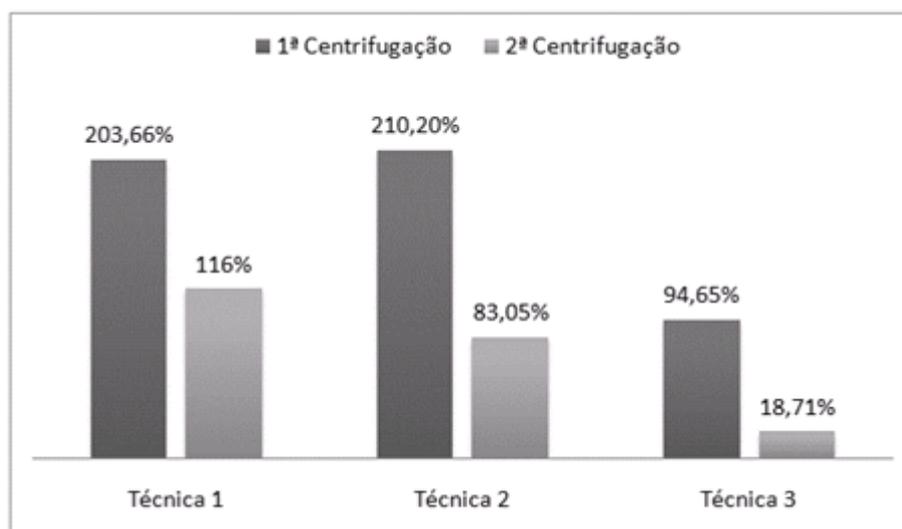


Figura 1 - Porcentagem do aumento no número de plaquetas com relação ao valor inicial, após a 1ª e 2ª centrifugação, resultantes de 3 diferentes técnicas para obtenção de PRP

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão (desvpad) da contagem plaquetária basal (tempo 0), após 1ª e 2ª centrifugação, resultantes de 3 diferentes técnicas para obtenção de PRP

| | Tempo 0 <i>Média±desvpad</i> | 1ª Centrifugação <i>Média±desvpad</i> | 2ª centrifugação <i>Média±desvpad</i> |
|---------|---------------------------------|--|--|
| Grupo 1 | 273.67±78.25 | 829.67±507.44 | 590.67±805.86 |
| Grupo 2 | 299.8±61.2 | 930.4±61.2 | 548.8±477.98 |
| Grupo 3 | 318±52.78 | 619±464.63 | 377.5±188.99 |

Os valores obtidos após a 2ª centrifugação foram inferiores aos observados por outros estudos com cães, onde foram encontrados aumentos de duas a seis vezes (Vanat et al., 2012) e de 210% (Ferraz et al., 2007). Entretanto, os valores alcançados na primeira centrifugação do protocolo 1 (203,66%) e 2 (210,20%) apresentaram concentrações que se enquadram a estes estudos.

Nos três grupos estudados foi observado uma maior concentração plaquetária apenas com uma centrifugação, concordando com Aleixo et al. (2011) que comparou dois protocolos para obtenção de PRP em cães, sendo um deles apenas com uma centrifugação e com Penha et al. (2014), que usou apenas uma centrifugação com velocidade de 1.800 rpm durante 10 minutos, com resultados apropriados para sua execução na rotina clínica e demonstrando a viabilidade da técnica com apenas uma centrifugação.

As velocidades de centrifugação utilizadas no volume de 4,0 mL para o preparo do PRP resultaram em uma camada de névoa estreita, o que dificultou a sua separação sem interferir na camada celular, leucócitos e hemácias, principalmente após a segunda centrifugação, onde se trabalhava com um volume aproximado de 2 mL. Esta é a provável causa da ampla

variação individual observada, além da necessidade de uma amostragem maior, podem ter comprometido o resultado médio final da concentração plaquetária.

Os protocolos utilizados no preparo e na administração do PRP se diferem amplamente causando variações na concentração de plaquetas, o que pode influenciar significativamente no efeito biológico do plasma (PARDO, 2012). Independentemente da quantidade plaquetária, as concentrações ideais de componentes sanguíneos e dos fatores de crescimento para os campos específicos devem ser avaliadas, afim de determinar sobre o tipo de PRP mais adequada para cada situação clínica (OUDELAAR et al., 2019).

CONCLUSÃO

O melhor resultado para a produção de PRP autólogo foi obtido no protocolo 1, seguido do protocolo 2, com aumentos de 116% e 83,05% após a 2ª centrifugação, respectivamente. Entretanto, os resultados obtidos na 1ª centrifugação foram superiores aos apresentados após a 2ª. centrifugação, observando elevações de 203,66% no protocolo 1 e 210,20% no protocolo 2 quando comparados ao valor basal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (Fapeal-AL) pelo financiamento da bolsista por meio do Programa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, G.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N.; Mesquita, F.F.; Oliveira, L.M.V.; Zubieta, T.L.C.; Almeida, A.L.N.; Guimarães, F.C. Maia, T.F.L.; Zacarias, S.M.L.G.; Santos, C.P.S. Lima [2011] Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.567-573, 2011. Available in: <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n3/v63n3a05.pdf>. Accessed on: 20/10/2020
- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; NURDEN, P.; ORIVE, G; ANDÍAET, I. [2006] New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.5, p.227-234, 2006. Available in: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167-7799\(06\)00056-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167-7799(06)00056-4). Accessed on 20/10/2020.
- FERRAZ, V.C.M.; FERRIGNO, C.R.A.; SCHMAEDECKE, A. [2007] Platelet concentration of platelet rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.6, p.435-440, 2007. Available in: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26609>. Accessed on 20/10/2020.
- KORNSUTHISOPON, C.; PIRARAT, N; OSATHANON, T.; KALPRAVIDH, C. [2020] Autologous platelet-rich fibrin stimulates canine periodontal regeneration, **Scientific Reports**, v.10, p.1850, 2020. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7002419/>. Accessed on 20/10/2020.
- OUDELAAR, B.W.; PEERBOOMS, J.C. [2019] Concentrations of Blood Components in Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems A Review of the Literature. The **American Journal of Sports Medicine**, v.47, n.2, p.479–487, 2019. Available in: https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0363546517746112?casa_token=J6BExsYSrNEAAAAA:GtJTGUy0AxTiQRhs2kOjl2rzDi6W9hcV310MrAfnbsisZzblko8s_Wdnc-L12aVo9lQ2InhIoCZTuRA. Accessed on: 20/10/2020.
- PARDO, M.; SACCO, S.R.; SURIAN, C.R.S.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. [2012] Principais usos do plasma rico em plaquetas na medicina veterinária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.9, n.18, 2012. Available in: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_de_staque/mU8J9OaisiRuIg8_2013-6-25-18-11-10.pdf. Accessed on: 20/10/2020.
- PENHA, E.M.; JULIÃO, L.R.; CAVALCANTE, P.B.; BARRETO, L.C.; LARANGEIRA, D.F.; SOARES, M.P.B.; BARROUIN-MELO, S.M. [2014] Uso do plasma rico em plaquetas no tratamento da doença articular degenerativa em cão: relato de caso. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.17, n.2, p.137-142, 2014. Available in: <https://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/4932>. Accessed on: 20/10/2020.
- SHIN, H.S., WOO, H.M., KANG, B.J. [2017] Optimisation of a double-centrifugation method for preparation of canine platelet rich plasma. **BCM Veterinary Research**, v.13, p.198, 2017. Available in: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-017-1123-3>. Accessed on: 20/10/2020.
- VANAT, N.; MEDEIROS, T.N.S.; BALARIN, M.R.S.; PEREIRA, P. M.; DE BIASI, F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.1, p.313-322, 2012. Available in: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/download/6488/10394>. Accessed on: 20/10/2020.
- VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; FRANCO T.R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.24, n.2, p. 212-218, 2009. Available in: <http://www.rbcv.org.br/details/471/pt-BR/metodo-de-obtencao-do-gel-de-plasma-rico-em-plaquetas-autologo>. Accessed on: 20/10/2020.
- VIEGAS, C.A.A.; DIAS, M.I.R.; AZEVEDO, J.M.T.; FERREIRA, A. J.; SAN ROMAN, F.; CABRITA, A. M. S. A utilização de Plasma Rico em Plaquetas na regeneração do tecido ósseo alveolar e cortical. Estudos experimentais num modelo de defeito ósseo periodontal em cão Beagle (*Canis familiaris*) e num modelo de defeito ósseo cortical na ovelha (*Ovis aries*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p.193-213, 2006. Available in: http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/edicao/12_2006/559_560_193-213.htm. Accessed on: 20/10/2020.