



Artigo original

Quantificação do número de plaquetas a partir de diferentes métodos de centrifugação em ratos da linhagem SHR[☆]



João Alberto Yazigi Junior*, João Baptista Gomes dos Santos, Bruno Rodrigues Xavier, Marcela Fernandes, Sandra Gomes Valente e Vilnei Mattioli Leite

Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 28 de setembro de 2014

Aceito em 16 de dezembro de 2014

On-line em 22 de julho de 2015

Palavras-chave:

Contagem de plaquetas

Centrifugação

Plasma rico em plaquetas

R E S U M O

Objetivo: Quantificar a concentração de plaquetas do sangue de ratos SHR, por meio de diferentes protocolos de centrifugação, e avaliar qual o método mais eficaz de obtenção de plaquetas.

Métodos: Usamos 40 ratos machos da linhagem isogênica SHR. Os animais foram divididos em três grupos: Controle (GCT) - sangue total sem centrifugação; Única Centrifugação (GUC) - sangue total submetido a uma única centrifugação: 200 g e 400 g; Dupla Centrifugação (GDC) - sangue total submetido a uma centrifugação, seguido de coleta do plasma total, e realizado uma centrifugação, em diferentes rotações: 200 g + 200 g; 200 g + 400 g; 200 g + 800 g; 400 g + 400 g; 400 g + 800 g. Foram retirados 3 ml de sangue de cada animal por meio de punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em tubo de coleta vacutainer com citrato de sódio 3,2%. O sangue dos animais do grupo controle não foi submetido à centrifugação e foi analisado. Após a centrifugação do sangue dos animais, submetido à centrifugação, o plasma total foi coletado e submetido à contagem de plaquetas no terço inferior da amostra.

Resultados: Obtivemos maior enriquecimento de plaquetas no subgrupo de duas centrifugações (400 g por 10 minutos + 400 g por 10 minutos), no qual ocorreu uma concentração média de plaquetas 11,30 vezes superior em relação ao grupo controle.

Conclusão: Foi possível obter uma alta concentração plaquetária, com técnica simples e viável, por meio de centrifugação do sangue total e uso de materiais de uso corriqueiro; e método mais eficaz de obtenção de concentrado de plaquetas ocorreu nas amostras submetidas a duas centrifugações.

© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

[☆] Trabalho feito no Laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior do Departamento de Ortopedia e Traumatologia (Unifesp), São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: junioryazigi73@yahoo.com.br (J.A. Yazigi Junior).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2015.04.018>

0102-3616/© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Quantification of platelets obtained by different centrifugation protocols in SHR rats

A B S T R A C T

Keywords:

Platelet count
Centrifugation
Platelet-rich plasma

Objective: To quantify the platelet concentration in the blood of SHR rats, by means of different centrifugation protocols, and to evaluate what the most effective method for obtaining platelets is.

Methods: We used 40 male rats of the isogenic SHR lineage. The animals were divided into three groups: control, using whole blood without centrifugation; single centrifugation, using whole blood subjected to a single centrifugation at 200 g and 400 g; and double centrifugation, using whole blood subjected one centrifugation at different rotations, followed by collection of whole plasma subjected to another centrifugation at different rotations: 200 g + 200 g; 200 g + 400 g; 200 g + 800 g; 400 g + 400 g; 400 g + 800 g. Samples of 3 ml of blood were drawn from each animal by means of cardiac puncture. The blood was stored in Vacutainer collection tubes containing 3.2% sodium citrate. The blood from the control group animals was analyzed without being subjected to centrifugation. After the blood from the other groups of animals had been subjected to centrifugation, the whole plasma was collected and subjected to platelet counting in the lower third of the sample.

Results: We obtained greatest platelet enrichment in the subgroup with two centrifugations comprising 400 g for 10 minutes + 400 g for 10 minutes, in which the mean platelet concentration was 11.30 times higher than that of the control group.

Conclusion: It was possible to obtain a high platelet concentration using viable simple techniques, by means of centrifugation of whole blood and use of commonly used materials. The most effective method for obtaining platelet concentrate was found in samples subjected to two centrifugations.

© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea.^{1,2} Do total das plaquetas presentes no organismo, 70% estão presentes na circulação e 30% no baço, permanecem na circulação durante uma média de dez dias, quando são retiradas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado.¹⁻³ As plaquetas estão diretamente envolvidas em diversas patologias importantes, sejam em síndromes ou quadros trombóticos graves como a trombose arterial.^{4,5}

O sistema hemostático é intrinsecamente responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade vascular, visto que é capaz de formar um tampão sobre uma superfície danificada do endotélio vascular quando esse sofre uma injúria. Dessa forma, a hemostasia minimiza a perda sanguínea e promove a restauração da arquitetura vascular normal.⁶⁻⁸

O plasma rico em plaquetas (PRP) é a concentração autóloga de plaquetas em pequeno volume de plasma, obtido por centrifugação do sangue total, considerada importante fonte de fatores de crescimento. Sua constituição básica se dá por três componentes: plasma, leucócitos e plaquetas. A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um concentrado de plaquetas, obtido de uma membrana de fibrina, com alto potencial de regeneração tecidual. Assim como no PRP, os concentrados de plaquetas contidos na PRF liberam fatores de crescimento (FC) que aprimoram o processo de regeneração. Além disso, a matriz de

fibrina promove angiogênese, facilita o acesso ao local lesionado, com importante papel na cicatrização tecidual.⁹

Descrita pela primeira vez na França em 2000⁹ a plaqueta rica em fibrina (PRF), conceito novo e ainda pouco descrito na terapêutica com o uso de gel de fibrina, é um concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com um altíssimo potencial de reparação de feridas. A membrana é obtida a partir de sangue autólogo sem adição de fatores externos.¹⁰

Sabe-se que as plaquetas atuam no processo de hemostasia, na cicatrização de feridas e na reepitelização, liberam diversos fatores de crescimento e que pelo menos sete diferentes FC foram identificados na fase inicial da cicatrização. Por isso, a liberação desses FC pelos grânulos- α das plaquetas tem um aspecto importante no controle e na proliferação de células mesenquimais, incluindo os fibroblastos. O PRP é ativado pela adição de íons de cálcio, com liberação de FC e a exocitose dos grânulos- α , e transforma o fibrinogênio em fibrina. Por meio desse processo, obtém-se, também, cola de fibrina autóloga, denominada também de gel de plaquetas ou gel de PRP. A apresentação do PRP em forma de gel facilita sua aplicação e seu manuseio em diversas áreas cirúrgicas e favorece a integração de retalhos e enxertos, sejam ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura. O uso resulta em cicatrização mais rápida e eficiente, pelo efeito de aderência do gel, que é proporcional ao fibrinogênio presente.¹¹⁻¹³

A obtenção do PRP e da PRF é relativamente simples e de baixo custo. Esses concentrados plaquetários proporcionam tratamentos autólogos com potencial para estimular

o processo biológico natural da cicatrização e auxiliar na regeneração de diversos tecidos. A diferença básica na obtenção do PRP e do PRF é que para se obter plasma rico em plaquetas é usado tubo com anticoagulante (citrato de sódio 3,2% ou EDTA), enquanto que para se obter plaqueta rica em fibrina o sangue deve ser coletado em tubo seco.

Existem vários sistemas de preparo de PRP disponíveis, por meio de centrífugas de bancada, mas em estudos pré-clínicos e clínicos os resultados apresentados parecem contraditórios. Há uma lacuna de estudos mais sistemáticos e consistentes sobre o assunto, o que faz com que o preparo do PRP permaneça, ainda, um procedimento experimental, apesar de sua promissora aplicação na regeneração tecidual.

Calixto,¹⁴ ao estudar o sangue de humanos, pôde verificar que o melhor método de obtenção de PRP é aquele no qual é feita uma única centrifugação, de 200 g por 10 minutos. Já Pereira,¹⁵ com sete protocolos para a obtenção de PRP em equinos, pôde verificar que quanto maior a força g e maior o tempo de centrifugação, maior é a concentração plaquetária total.

Uma vez que os animais usados em grande escala, em laboratórios de pesquisa, são os ratos e devido à escassez de estudos nesse modelo animal, optamos por fazer este trabalho para avaliar qual o melhor método para a obtenção da melhor concentração de plaquetas, em diferentes protocolos, quantificar a concentração de plaquetas do sangue de ratos SHR, por meio de diferentes protocolos de centrifugação, e avaliar qual o método mais eficaz de obtenção de concentrado de plaquetas.

Materiais e métodos

O trabalho foi feito no laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior do Departamento de Ortopedia e Traumatologia e no laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas de nossa instituição. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP n° 0312/12).

Usamos 40 ratos machos da linhagem isogênica SHR, entre 280-300 g, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com cinco ratos em cada, em biotério com condições controladas com ciclo claro/escuro (12/12 h), temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, livre acesso à água e ração por todo o período do experimento.

Os animais foram divididos em três grupos:

Grupo Controle (GCT) - sangue total sem centrifugação (n = 5).

Grupo Única Centrifugação (GUC) - sangue total submetido a uma única centrifugação. Esse grupo foi dividido em dois subgrupos:

GUC - I: centrifugação a 200 g por 10 minutos (n = 5)

GUC - II: centrifugação a 400 g por 10 minutos (n = 5)

Grupo Dupla Centrifugação (GDC) - sangue total submetido a uma centrifugação, seguido de coleta do plasma total e

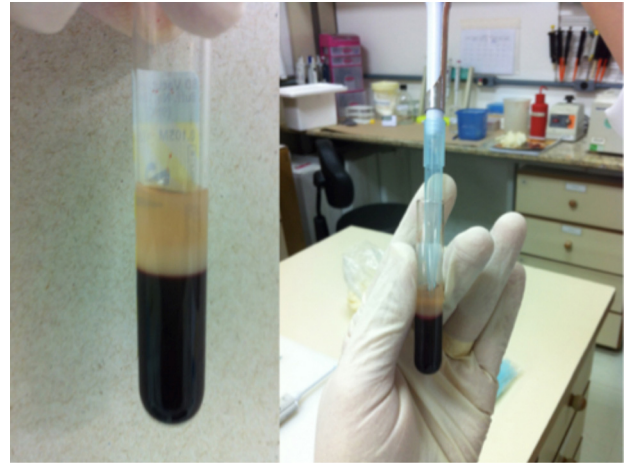


Figura 1 – Coleta de plasma no tubo tipo eppendorf de 1,5 mL.

realizado uma segunda centrifugação, em diferentes rotações. Esse grupo foi dividido em cinco subgrupos:

GDC-I: centrifugação a 200 g por 10 minutos, seguida de segunda centrifugação de 200 g por 10 minutos (n = 5)

GDC-II: centrifugação a 200 g por 10 minutos, seguida de segunda centrifugação de 400 g por 10 minutos (n = 5)

GDC-III: centrifugação a 200 g por 10 minutos, seguida de segunda centrifugação de 800 g por 10 minutos (n = 5)

GDC-IV: centrifugação a 400 g por 10 minutos, seguida de segunda centrifugação de 400 g por 10 minutos (n = 5)

GDC-V: centrifugação a 400 g por 10 minutos, seguida de segunda centrifugação de 800 g por 10 minutos (n = 5)

Obtenção das amostras de plasma e sangue

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal, com solução anestésica composta por xilasina 1U/100 g e ketamina 1U/100 g.

Após serem anestesiados, foram retirados 3 ml de sangue de cada animal através de punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em tubo de coleta vacutainer com citrato de sódio 3,2%.

O sangue dos animais do grupo controle não foi submetido à centrifugação e foi analisado após agitação do tubo por dois minutos a 4°C , para homogeneização.

As amostras de sangue total dos animais foram centrifugadas de acordo com o protocolo para cada grupo descrito acima, em centrífuga de bancada (Eppendorf 5810 R) a 4°C .

Após a centrifugação do sangue dos animais, submetido a uma única centrifugação, o plasma total foi coletado em tubo tipo eppendorf de 1,5 ml e submetido à contagem de plaquetas no terço inferior da amostra.

Para o sangue dos animais, submetido a duas centrifugações, após a primeira centrifugação o plasma total foi coletado em tubo tipo eppendorf de 1,5 ml e submetido a nova centrifugação. A contagem de plaquetas foi feita no terço inferior da amostra (fig. 1).

Tabela 1 – Descrição dos parâmetros hematológicos resultantes

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Leucócitos	CTRL	3.060	219,1	3.200	2.700	3.200	5	0,016
	200g-10 min	420	465,8	200	100	1200	5	
	400g-10 min	420	549,5	200	100	1400	5	
	200g-10min + 200g-10 min	1.160	2.260,1	100	100	5200	5	
	200g-10min + 400g-10 min	1.860	1.105,9	1.400	500	3100	5	
	200g-10min + 800g-10 min	2.700	3.755,7	700	300	9200	5	
	400g-10min + 400g-10 min	3.020	2.983,6	1500	400	7800	5	
	400g-10min + 800g-10 min	3.160	3.943,7	500	200	8700	5	
Eritrócitos	CTRL	7.120.000	358.956,8	7.020.000	6.640.000	7530000	5	<0,001
	200g-10 min	22000	16431,7	20000	10000	50000	5	
	400g-10 min	14000	11401,8	10000	0	30000	5	
	200g-10min + 200g-10 min	80000	134721,9	20000	10000	320000	5	
	200g-10min + 400g-10 min	262.000	89.554,5	240.000	150.000	380000	5	
	200g-10min + 800g-10 min	170.000	101.242,3	150.000	600.00	330000	5	
	400g-10min + 400g-10 min	120.000	86.313,4	150.000	20.000	220000	5	
	400g-10min + 800g-10 min	188.000	19.9549,5	70.000	100.00	420000	5	
Plaquetas	CTRL	648.800	30.094,9	648.000	614.000	695000	5	0,013
	200g-10 min	1.632.400	580.962,4	1.650.000	682.000	2122000	5	
	400g-10 min	939.600	687.417,1	863.000	110.000	1764000	5	
	200g-10min + 200g-10 min	3.826.000	4.920.808,4	456.000	29.000	970.0000	5	
	200g-10min + 400g-10 min	4.760.000	2.254.550,953	530.0000	130.0000	720.0000	5	
	200g-10min + 800g-10 min	4.080.000	1.685.823,241	310.0000	270.0000	6.500.000	5	
	400g-10min + 400g-10 min	7.320.000	2.819.929,077	73.00000	28.00000	97.00000	5	
	400g-10min + 800g-10 min	5.500.000	1.813.835,715	5.200.000	3.400.000	7.600.000	5	
Volume de plasma (mL)	CTRL	0	0	0	0	0	5	< 0,001
	200g-10 min	0,72	0,11	0,8	0,6	0,8	5	
	400g-10 min	1,10	0,10	1,1	1	1,2	5	
	200g-10min + 200g-10 min	1,46	0,11	1,5	1,3	1,6	5	
	200g-10min + 400g-10 min	1,60	0,10	1,6	1,5	1,7	5	
	200g-10min + 800g-10 min	1,62	0,04	1,6	1,6	1,7	5	
	400g-10min + 400g-10 min	1,62	0,08	1,6	1,5	1,7	5	
	400g-10min + 800g-10 min	1,72	0,08	1,7	1,6	1,8	5	

Resultado do teste Kruskal-Wallis.



Figura 2 – Contagem de plaquetas no analisador hematológico.

Contagem de plaquetas

As amostras obtidas foram submetidas à contagem de plaquetas, por meio de um analisador hematológico (Animal Blood Counter - ABC Vet) devidamente calibrado para os parâmetros sanguíneos de ratos (fig. 2).

Métodos estatísticos

Os parâmetros hematológicos resultantes segundo os subgrupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) foram comparados com os subgrupos com uso de testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas não paramétricas de Dunn quando necessárias para comparar os subgrupos dois a dois.

Resultados

Os resultados foram ilustrados com uso de tabelas e de gráficos de barras que representam os valores medianos de cada parâmetro segundo subgrupos e os testes foram feitos com nível de significância de 5%.

A [tabela 1](#) mostra que todos os parâmetros avaliados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

As [figuras 3 e 4](#) sugerem maiores valores de leucócitos e eritrócitos no grupo controle.

A [figura 5](#) mostra que o maior enriquecimento de plaquetas ocorreu no subgrupo de duas centrifugações 400 g + 400 g.

Os valores de volume de plasma obtido apresentados na [figura 6](#) são maiores com duas centrifugações (400 g por 10 minutos + 800 g por 10 minutos).

A [tabela 2](#) mostra que a quantidade de leucócitos resultante foi estatisticamente maior no controle em comparação com os subgrupos com apenas uma centrifugação ($p = 0,004$ e $p = 0,004$) e com relação ao subgrupo com duas centrifugações de 200 g e 10 minutos cada ($p = 0,007$). Já o subgrupo com duas centrifugações de 400 g e 10 minutos cada apresentou estatisticamente mais leucócitos do que os subgrupos com apenas uma centrifugação ($p < 0,05$) e do que o subgrupo com duas centrifugações de 200 g e 10 minutos cada ($p = 0,031$).

A [tabela 3](#) mostra que a quantidade de eritrócitos foi estatisticamente maior no controle do que nos demais subgrupos ($p < 0,05$), com exceção apenas dos subgrupos de duas centrifugações de 200 g - 10min + 400 g - 10 min e de 200 g - 10min + 800 g - 10 min ($p = 0,192$ e $p = 0,056$). Esses dois subgrupos apresentaram estatisticamente mais eritrócitos do que os subgrupos de uma centrifugação e os subgrupos de duas centrifugações de 200 g e 10 min cada ($p < 0,05$).

Pela [tabela 4](#), tem-se que a quantidade de plaquetas com duas centrifugações foi estatisticamente maior do que o

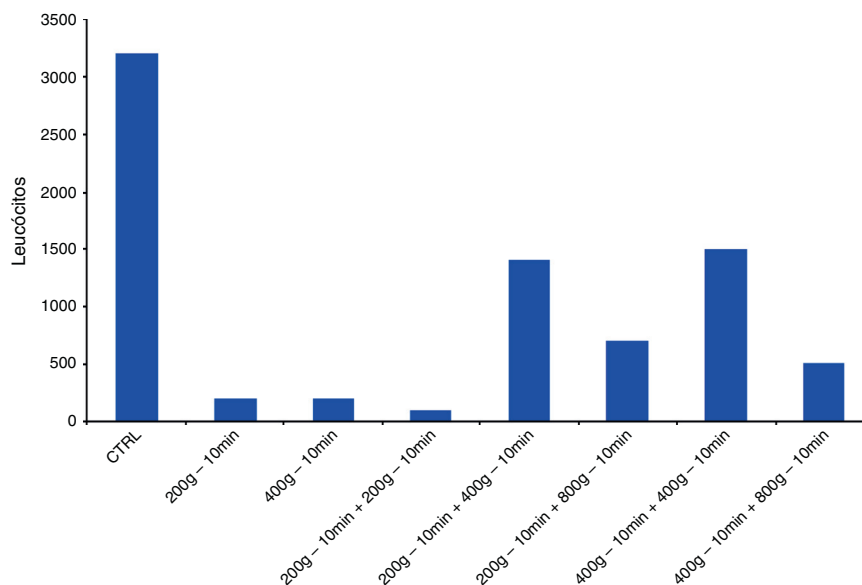


Figura 3 – Valores medianos de leucócitos segundo subgrupos.

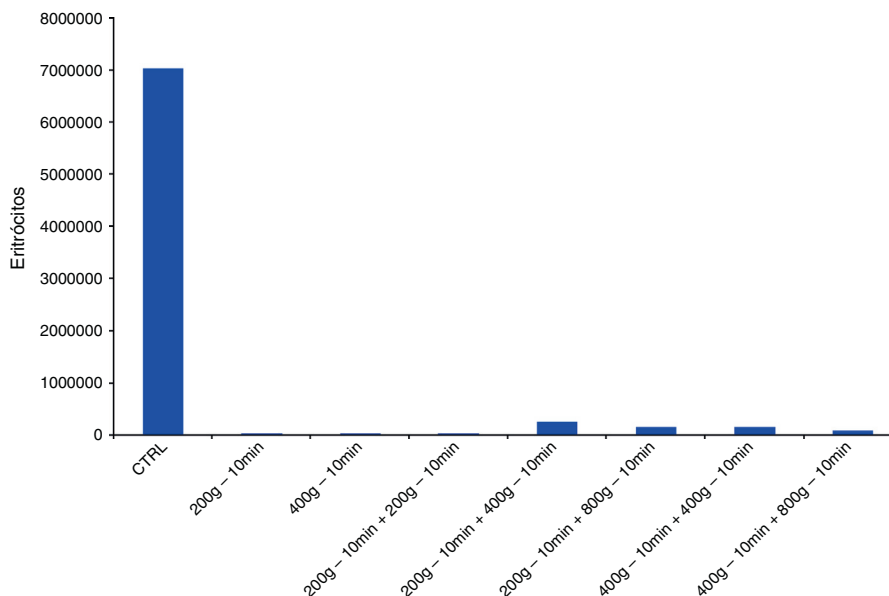


Figura 4 – Valores medianos de eritrócitos segundo subgrupos.

controle, com apenas uma centrifugação, e do que o subgrupo com duas centrifugações, com 200 g e 10 min cada ($p < 0,05$).

A [tabela 5](#) mostra que o volume de plasma obtido se assemelha estatisticamente ao comportamento das plaquetas. Os subgrupos com duas centrifugações têm maior volume do que os demais subgrupos, com exceção do subgrupo com duas centrifugações, com 200 g e 10 min cada.

Pelas tabelas e figuras, tem-se que a quantidade de plaquetas com duas centrifugações (subgrupo 400 g + 400 g) foi estatisticamente maior do que o controle, com apenas uma centrifugação, e do que o subgrupo com duas centrifugações, com 200 g e 10 min cada ($p < 0,05$); ocorreu concentração média de plaquetas nesse subgrupo (400 g + 400 g) 11,30 vezes superior em relação ao grupo controle.

Discussão

Na literatura encontramos técnicas de obtenção de plasma rico em plaquetas, como a primeira usada, que só era aplicável em uma estrutura hospitalar com máquinas de plasmaferese e necessitava de um técnico especializado para manipulá-la.¹⁶ O procedimento apresentava maior morbidade e necessitava de tecnologia sofisticada.

A busca de técnicas para a obtenção de PRP com custos menores fez surgir alguns métodos mais simples, com tubos de ensaio e uma centrífuga comum, que permitem a preparação do plasma rico em plaquetas com custo muito menor e em ambiente ambulatorial. Porém, esses métodos são

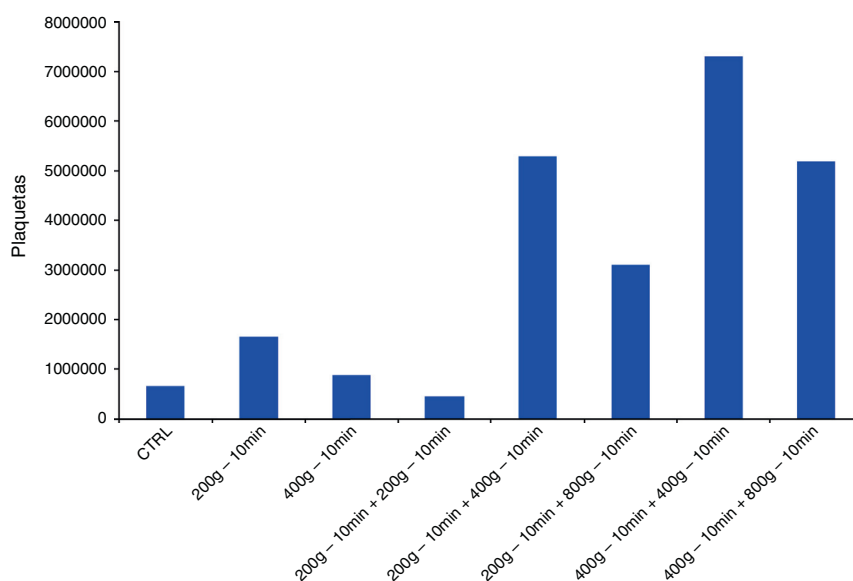


Figura 5 – Valores medianos de plaquetas segundo subgrupos.

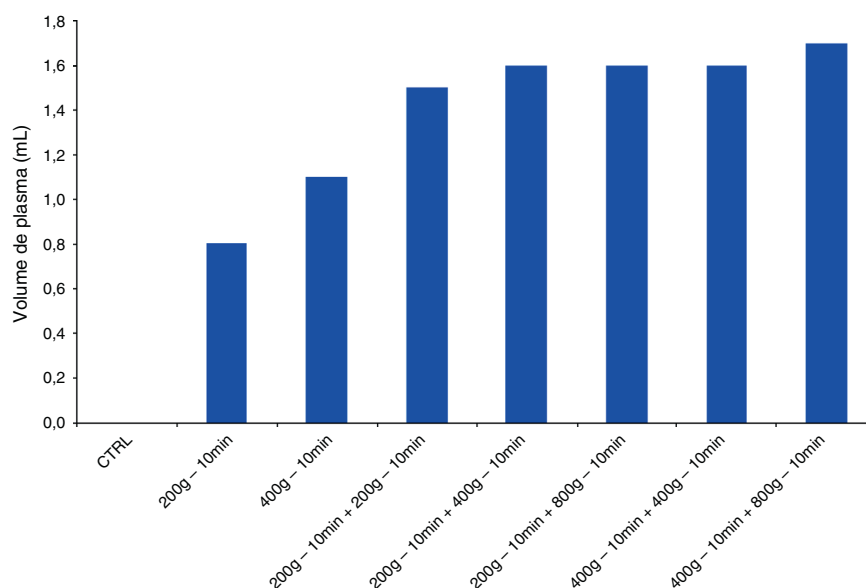


Figura 6 – Valores medianos de volume de plasma.

Tabela 2 – Resultado das comparações múltiplas dos leucócitos

Leucócitos		Valor Z	p
Comparação			
CTRL VS	200g-10 min	2,84	0,004
CTRL VS	400g-10 min	2,84	0,004
CTRL VS	200g-10min + 200g-10 min	2,70	0,007
CTRL VS	200g-10min + 400g-10 min	0,90	0,367
CTRL VS	200g-10min + 800g-10 min	1,04	0,298
CTRL VS	400g-10min + 400g-10 min	0,54	0,589
CTRL VS	400g-10min + 800g-10 min	1,11	0,267
200g-10 min VS	400g-10 min	0,00	>0,999
200g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-0,14	0,890
200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-1,94	0,052
200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,80	0,071
200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-2,30	0,021
200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,73	0,083
400g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-0,14	0,890
400g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-1,94	0,052
400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,80	0,071
400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-2,30	0,021
400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,73	0,083
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-1,80	0,071
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,66	0,096
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-2,16	0,031
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,59	0,111
200g-10min + 400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	0,14	0,890
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-0,36	0,718
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	0,21	0,835
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-0,50	0,618
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	0,07	0,945
400g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	0,57	0,570

Resultado das comparações múltiplas de Dunn.

trabalhosos e necessitam de aprendizagem por parte de quem irá fazer o procedimento.

Os métodos existentes na literatura não alcançam as mesmas concentrações plaquetárias. Algumas são insuficientes para melhorar a regeneração tecidual. Esses fatores podem

justificar muito do criticismo a respeito da eficácia e da aplicabilidade do plasma rico em plaquetas.

Outro fator fundamental está relacionado com o anti-coagulante. Normalmente é usado o citrato de sódio 3,2%. O citrato de sódio capta os íons de cálcio do sangue e os

Tabela 3 – Resultado das comparações múltiplas dos eritrócitos

Eritrócitos			
Comparação		Valor Z	P
CTRL VS	200g-10 min	3,90	< 0,001
CTRL VS	400g-10 min	4,27	< 0,001
CTRL VS	200g-10min + 200g-10 min	3,41	0,001
CTRL VS	200g-10min + 400g-10 min	1,30	0,192
CTRL VS	200g-10min + 800g-10 min	1,91	0,056
CTRL VS	400g-10min + 400g-10 min	2,44	0,015
CTRL VS	400g-10min + 800g-10 min	2,18	0,029
200g-10 min VS	400g-10 min	0,37	0,708
200g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-0,49	0,627
200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-2,59	0,010
200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,98	0,047
200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-1,46	0,145
200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,72	0,086
400g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-0,86	0,390
400g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-2,97	0,003
400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-2,36	0,018
400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-1,83	0,067
400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-2,09	0,036
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-2,11	0,035
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,50	0,134
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-0,97	0,332
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,23	0,217
200g-10min + 400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	0,61	0,542
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	1,14	0,255
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	0,87	0,382
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	0,53	0,598
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	0,26	0,792
400g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-0,26	0,792

Resultado das comparações múltiplas de Dunn.

Tabela 4 – Resultado das comparações múltiplas das plaquetas

Plaquetas			
Comparação		Valor Z	p
CTRL VS	200g-10 min	-1,03	0,305
CTRL VS	400g-10 min	-0,25	0,803
CTRL VS	200g-10min + 200g-10 min	-1,19	0,233
CTRL VS	200g-10min + 400g-10 min	-2,50	0,013
CTRL VS	200g-10min + 800g-10 min	-2,29	0,022
CTRL VS	400g-10min + 400g-10 min	-3,48	0,001
CTRL VS	400g-10min + 800g-10 min	-2,91	0,004
200g-10 min VS	400g-10 min	0,78	0,437
200g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-0,17	0,868
200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-1,47	0,142
200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,26	0,207
200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-2,45	0,014
200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,89	0,059
400g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-0,94	0,346
400g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-2,25	0,025
400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-2,04	0,041
400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-3,23	0,001
400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-2,66	0,008
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-1,30	0,192
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,10	0,273
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-2,29	0,022

Tabela 4 – (Continuação)

Plaquetas		Valor Z	p
Comparação			
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,72	0,086
200g-10min + 400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	0,21	0,835
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-0,98	0,325
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-0,42	0,677
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-1,19	0,233
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-0,62	0,533
400g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	0,57	0,570
Resultado das comparações múltiplas de Dunn.			

neutraliza e forma um composto denominado quelato que impede a formação do coágulo. Além disso, o citrato de sódio não altera os receptores de membrana das plaquetas e consequentemente o processo de quelação pode ser revertido por meio da adição do cloreto de cálcio para formação do gel de plaquetas.¹⁷

A recente tecnologia permite o uso do PRP com pequenos volumes de sangue, minimiza a necessidade de reinfusão de células vermelhas e os riscos associados. Contudo há pouca informação sobre a quantidade ideal de plaquetas para um melhor reparo tecidual.

Na literatura encontramos diversos protocolos de obtenção do PRP. O número de centrifugações (uma ou duas) dependerá

do método a ser usado. Alguns autores sugerem com apenas uma centrifugação, enquanto outras referências indicam protocolo de dupla centrifugação.

Qualquer protocolo de obtenção do PRP deve concentrar plaquetas no seu nível máximo para que corresponda aos resultados clínicos relatados na literatura. Mas além de uma alta concentração plaquetária com grande liberação de fatores de crescimento, é muito importante que seja mantida a integridade da plaqueta. Os fatores de crescimento devem ser liberados de plaquetas viáveis, uma vez que no ato de exocitose granular a plaqueta complete a estrutura terciária das proteínas do fator de crescimento. As plaquetas fragmentadas podem desgranular grandes

Tabela 5 – Resultado das comparações do volume de plasma

Volume de plasma		Valor Z	p
Comparação			
CTRL VS	200g-10 min	-0,69	0,488
CTRL VS	400g-10 min	-1,39	0,166
CTRL VS	200g-10min + 200g-10 min	-2,36	0,018
CTRL VS	200g-10min + 400g-10 min	-3,38	0,001
CTRL VS	200g-10min + 800g-10 min	-3,55	< 0,001
CTRL VS	400g-10min + 400g-10 min	-3,58	< 0,001
CTRL VS	400g-10min + 800g-10 min	-4,47	< 0,001
200g-10 min VS	400g-10 min	-0,69	0,488
200g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-1,66	0,096
200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-2,69	0,007
200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-2,86	0,004
200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-2,88	0,004
200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-3,77	< 0,001
400g-10 min VS	200g-10min + 200g-10 min	-0,97	0,332
400g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-2,00	0,046
400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-2,16	0,031
400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-2,19	0,028
400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-3,08	0,002
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 400g-10 min	-1,03	0,305
200g-10min + 200g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-1,19	0,233
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-1,22	0,222
200g-10min + 200g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-2,11	0,035
200g-10min + 400g-10 min VS	200g-10min + 800g-10 min	-0,17	0,868
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-0,19	0,846
200g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-1,08	0,279
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 400g-10 min	-0,03	0,978
200g-10min + 800g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-0,92	0,360
400g-10min + 400g-10 min VS	400g-10min + 800g-10 min	-0,89	0,375
Resultado das comparações múltiplas de Dunn.			

quantidade de fatores de crescimento, mas com efetividade diminuída.¹⁸

No presente estudo comparamos o número de plaquetas obtidos em sangue periférico submetidos a uma e duas centrifugações; o maior enriquecimento ocorreu no grupo de duas centrifugações. Os resultados se confrontam, confrontando os resultados com alguns trabalhos publicados na literatura, como o do Calixto.¹⁴

No estudo de Calixto,¹⁴ feito em seres humanos, foram usados tubos de ensaio com anticoagulante citrato de sódio a 3,2% e EDTA, que mostraram diferença na concentração de plaquetas, maior quando se usava o citrato. Com base nesse fato, escolhemos somente o citrato como anticoagulante dos tubos coletores.

Vendramin et al.¹⁹ obtiveram plasma rico em plaquetas de melhor qualidade por meio de duas centrifugações a 400 g por 10 min + 800 g por 10 min. No nosso estudo, obtivemos uma alta concentração plaquetária a 400 g + 800 g; no entanto, a maior quantidade de plaquetas foi obtida a 400 g por 10 min + 400 g por 10 min. Isso mostra que a partir dessa força pode ocorrer a lise de plaquetas, que influenciam sua concentração final.

Diversos estudos foram feitos em humanos, coelhos e equinos; no entanto, não encontramos protocolos de centrifugação em ratos. Com o estabelecimento de um protocolo de obtenção de PRP em ratos, que alcançou uma alta concentração plaquetária, proporcionamos estudos futuros para avaliar a eficácia clínica desse plasma rico em plaquetas. Novos estudos podem aparecer a partir desse protocolo que fizemos e expandir seu uso na regeneração nervosa, cicatricial e de enxertos ósseos e ligamentares.

Conclusão

Foi possível obter uma alta concentração plaquetária, com técnica simples e viável, por meio de centrifugação do sangue total e uso de materiais corriqueiros, como tubos de coleta, seringas e agulhas. O método mais eficaz de obtenção de concentrado de plaquetas ocorreu nas amostras submetidas a duas centrifugações (400 g por 10 minutos + 400 g por 10 minutos), nas quais ocorreu uma concentração média de plaquetas 11,30 vezes superior em relação ao grupo controle.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

À Dra. Primavera Borelli Garcia e ao técnico Edson do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo auxílio e apoio técnico à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Italiano JE, Hartwig JH. Megakaryocyte development and platelet formation. In: Michelson AD, editor. Platelets. California: Academic Press; 2002. p. 21–36.
2. Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1717–24.
3. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):447–53.
4. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. *Circulation*. 1999;99(1):E1–11.
5. Gregg D, Goldschmidt-Clermont PJ. Cardiology patient page. Platelets and cardiovascular disease. *Circulation*. 2003;108(13):e88–90.
6. Bates ER, Lau WC. Controversies in antiplatelet therapy for patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2005;111(17):e267–71.
7. Erhardtson E. To general haemostasis - The evidence-based route. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32 Suppl 1: 47–52.
8. Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. *Curr Med Chem*. 2004;11(17):2245–60.
9. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e56–60.
10. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*. 2008;19(1):42–6.
11. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(6): 1502–8.
12. Green DM, Klink B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(4):1161–2.
13. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol*. 2004;36(1):28–35.
14. Calixto CA. Plasma rico em plaquetas (PRP) por meio de centrifuga de bancada [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2011.
15. Pereira RCF. Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, RS; 2012.
16. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(6):638–46.
17. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(4):529–35.
18. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225–8.
19. Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cir Plást*. 2009;24(2):212–8.