

Artigo Original de Pesquisa
Original Research Article

Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo experimental em coelhos

Analysis of efficiency of the double-centrifugation protocol to prepare platelet rich plasma (PRP) – an experimental study in rabbits

Michel Reis MESSORA*
Maria José Hitomi NAGATA**
Flávia Aparecida Chaves FURLANETO***
Tatiana Miranda DELIBERADOR****
Luiz Gustavo Nascimento de MELO***
Valdir Gouveia GARCIA*****
Alvaro Francisco BOSCO**

Endereço para correspondência:
Address for correspondence:

Michel Reis Messoria
Centro Universitário de Lavras – Unilavras
Rua Padre José Poggel, 506
CEP 37200-000 – Lavras – MG
E-mail: michel_messoria@terra.com.br

* Professor da disciplina de Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário de Lavras (Unilavras – MG).
** Professores Adjuntos do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (disciplina de Periodontia) da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Araçatuba.
*** Doutores em Periodontia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia da Unesp, Campus de Araçatuba.
**** Professora do Mestrado Profissional em Odontologia Clínica da Universidade Positivo – Curitiba (PR). Doutora em Periodontia, Faculdade de Odontologia da Unesp, Campus de Araçatuba.
***** Professor Titular do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (disciplina de Periodontia) da Faculdade de Odontologia da Unesp, Campus de Araçatuba.

Recebido em 6/5/09. Aceito em 1.º/6/2009.
Received on May 6, 2009. Accepted on June 1, 2009.

Palavras-chave: plasma rico em plaquetas; contagem de plaquetas; centrifugação.

Resumo

Introdução e objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de plaquetas obtidas de plasma rico em plaquetas (PRP) preparado de acordo com um protocolo de dupla centrifugação.
Material e métodos: Foram utilizados 8 coelhos (White New Zealand)

machos, adultos, com pesos entre 2,8 e 4 kg. Após anestesia geral, realizou-se punção cardíaca, obtendo-se 10 mL de sangue de cada animal. Cada amostra de sangue foi centrifugada de acordo com o protocolo de Sonnleitner et al. (2000). Fez-se, então, a contagem manual de plaquetas do sangue periférico (total) coletado de cada animal e das amostras de PRP. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística. A normalidade dos dados foi comprovada e o teste t de Student foi utilizado ($p < 0,05$). **Resultados:** As amostras de PRP apresentaram uma quantidade média de plaquetas significativamente maior que a do sangue periférico. **Conclusão:** Dentro dos limites deste estudo, concluiu-se que o protocolo de dupla centrifugação foi apropriado para a produção do PRP.

Keywords:

platelet rich plasma;
platelet count;
centrifugation.

Abstract

Introduction and objective: The purpose of this study was to evaluate the concentrations of platelets obtained from platelet rich plasma (PRP) prepared according to the double-centrifugation protocol. **Material and methods:** Eight adult male rabbits (White New Zealand) weighing 2.8 to 4 kg were used. After general anesthesia, 10 ml of blood were drawn from each animal via cardiac puncture. Each blood sample was centrifuged according to the protocol of Sonnleitner et al. (2000). The peripheral blood (total) from each animal and the PRP samples platelets were counted manually. Data were submitted to statistical analysis. The normality of the data was confirmed and the Student's t test was applied ($p < 0.05$). **Results:** PRP samples presented an average platelet count significantly higher than that of peripheral blood. **Conclusion:** Within the limits of this study, it was concluded that the double-centrifugation protocol was adequate to prepare PRP.

Introdução

Os fatores de crescimento representam uma classe de mediadores biológicos que regulam a proliferação, a quimiotaxia e a diferenciação celular [5]. A aplicação terapêutica desses fatores com o intuito de regenerar um determinado tecido fundamenta-se na tentativa de mimetizar os eventos biológicos responsáveis pela formação (estágio embrionário) e pela manutenção (estágio pós-natal) dele [18].

Embora seja evidente o papel fundamental dos fatores de crescimento nos eventos envolvidos no processo de cicatrização dos tecidos [13], a utilização deles isoladamente é uma realidade distante da prática clínica, pois de uma forma geral não estão disponíveis comercialmente para uso cotidiano.

Uma técnica viável para obter uma alta concentração de fatores de crescimento foi proposta por Marx et al. (1998) [14], por meio da preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo. Segundo Marx (2001) [16], o PRP representa um volume de plasma autólogo que possui uma concentração de plaquetas acima da normalmente encontrada no sangue. O número aumentado de

plaquetas concentra, em seus grânulos α , uma grande quantidade de fatores de crescimento, principalmente o fator de crescimento derivado da plaqueta (platelet derived growth factor – PDGF) e o fator de crescimento transformador- β (transforming growth factor beta – TGF- β).

A técnica para obtenção do PRP já foi descrita na literatura [14, 26] e envolve, basicamente, o sequestro e a concentração das plaquetas no plasma sanguíneo, com sua subsequente aplicação na área da ferida em cicatrização. Foi observado, em humanos, que a cicatrização do osso e dos tecidos moles pode ser potencializada pela aplicação do PRP [2, 12, 14, 26] em uma concentração de 1.000.000 plaquetas/ μ L, ou seja, em uma concentração 338% maior que as encontradas habitualmente no sangue [14].

Entretanto o uso clínico do PRP foi proposto inicialmente por meio do método de separação celular descontínua, que normalmente utiliza uma grande quantidade de sangue (450 mL) [14, 26]. Esse método, porém, é limitado pela tecnologia empregada e pelo volume de sangue necessário, ficando restrito a institutos de transfusão de sangue ou a ambiente hospitalar [21, 23].

Recentemente alguns protocolos simplificados têm sido propostos para a produção de pequenas quantidades de PRP com o uso de centrífugas de bancada [1, 19, 10]. Tais protocolos representam uma evolução da técnica inicialmente apresentada, em função do baixo custo de produção e da possibilidade de execução em ambiente ambulatorial [25]. Além disso, esses métodos são mais bem-aceitos pelo paciente porque produzem menor estresse no sistema cardiovascular e podem ser realizados em poucos minutos.

O emprego desses protocolos, no entanto, deve ser feito com cautela, e muitos detalhes precisam ser levados em consideração. Basicamente, o processo de centrifugação para o preparo do PRP deve ser estéril, capaz de separar as plaquetas das células vermelhas do sangue e promover o sequestro delas sem nenhum tipo de dano ou lise que possa ativar a secreção antecipada dos fatores de crescimento [16]. Além disso, a quantidade de plaquetas obtida é estritamente dependente do tipo de protocolo utilizado [24].

O objetivo deste estudo foi avaliar um protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP).

Material e métodos

Modelo experimental

Foram utilizados 8 coelhos (White New Zealand) machos, adultos, com peso entre 2,8 e 4 kg, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo). Os animais foram mantidos em gaiolas unitárias sob temperatura ambiente, alimentados com ração sólida e água ad libitum, durante todo o procedimento experimental. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Unesp, Campus de Araçatuba.

Anestesia

Para a realização de todos os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (0,25 mL/kg de peso corporal) associada a quetamina (0,35 mL/kg de peso corporal).

Preparo do PRP

1. Punção cardíaca e coleta do sangue

Por meio de punção cardíaca, 10 mL de sangue foram coletados de cada animal, com auxílio de

agulha e seringa. O volume sanguíneo retirado de cada animal foi distribuído e armazenado em tubos de vácuo de 4,5 mL contendo citrato de sódio como anticoagulante. Cerca de 1 mL do sangue coletado foi separado para contagem de plaquetas. Os 9 mL restantes, distribuídos em tubos de 4,5 mL, foram submetidos ao processo de homogeneização por 5 minutos e posteriormente foram centrifugados.

2. Centrifugação do sangue – protocolo de Sonnleitner et al. (2000) [19]

Primeira centrifugação: A separação celular dos elementos do sangue coletado foi feita por centrifugação, utilizando-se uma centrífuga laboratorial refrigerada (Beckman J-6M Induction Drive Centrifuge, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EUA). Os tubos foram centrifugados a 160 g (760 rpm) por 20 minutos, à temperatura de 22°C, resultando em três componentes básicos: células vermelhas do sangue (CV) (fundo do tubo), PRP (meio do tubo) e plasma pobre em plaquetas (PPP) (parte superior do tubo).

Segunda centrifugação: Para aumentar a concentração de plaquetas, foi marcado um ponto de 6 mm além da linha divisória existente entre o componente superior do tubo (PPP) e o componente inferior do tubo (CV). Toda a região acima da marcação foi pipetada e transferida para outros tubos a vácuo vazios, sem citrato de sódio, para nova centrifugação a 400 g (1200 rpm) por 15 minutos. Assim, separou-se todo o PPP, e a substância remanescente correspondia ao PRP. Ambos foram transferidos para placas de Petri distintas (figura 1).

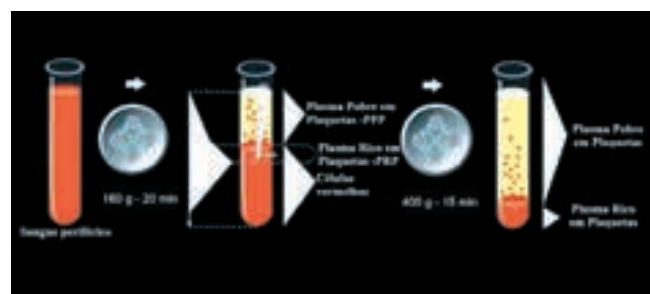


Figura 1 – Representação esquemática do protocolo de dupla centrifugação (Sonnleitner et al., 2000) utilizado para o preparo do PRP

Contagem de plaquetas

Cerca de 0,5 mL de cada fração de PRP obtido foi separado para contagem do número de plaquetas. As plaquetas presentes no sangue periférico dos animais e nas amostras de PRP foram contadas manualmente em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico binocular com objetiva de

40x. Para a realização desse método, cada amostra de sangue foi separada, diluída e homogeneizada em líquido de Brecher. Além disso, efetuaram-se esfregaços das amostras de sangue periférico e de PRP, corados com Panótico Rápido LB (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil).

Análise estatística

Os aumentos percentuais dos níveis de plaquetas do PRP, em relação ao número de plaquetas do sangue periférico de cada animal, foram calculados pela divisão do número de plaquetas do sangue periférico com o número de plaquetas do PRP. O valor resultante foi multiplicado por 100. Os dados percentuais foram transformados em arcosseno, e a significância das diferenças entre a quantidade de plaquetas presentes no sangue periférico e no PRP preparado de acordo com o protocolo de Sonnleitner et al. (2000) [19] foi analisada pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Resultados

Os esfregaços de PRP exibiram um maior número de plaquetas do que os de sangue periférico (figura 2). A contagem de plaquetas em Câmara de Neubauer mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a quantidade de plaquetas do PRP e a do sangue periférico (figura 3).

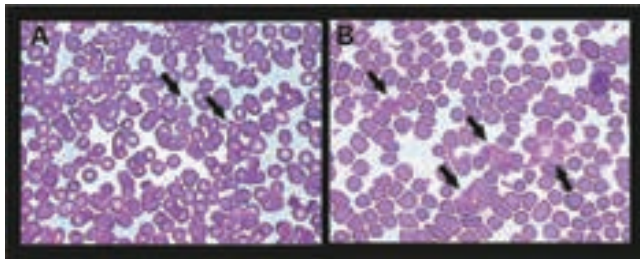
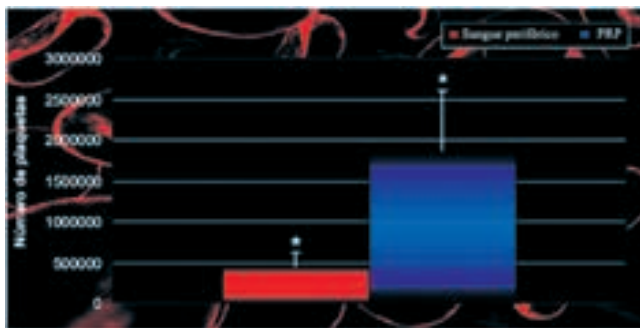


Figura 2 - Esfregaço das amostras de sangue periférico (A) e do PRP (B). As plaquetas estão indicadas pelas setas



*diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

Figura 3 - Desvio-padrão da quantidade média de plaquetas do sangue periférico e do PRP

Discussão

A precisão e a reprodutibilidade são características fundamentais do método científico. O desenvolvimento e a eventual aplicação clínica de dispositivos e materiais biomédicos requerem uma aderência estrita à metodologia científica. O desenvolvimento de novos biomateriais para uso na reconstrução de tecidos perdidos não é uma exceção a essa regra [6]. Desse modo, a escolha de um modelo animal adequado é fundamental para que as avaliações obtidas sejam confiáveis e possam mimetizar, com profundidade científica, o seu uso em seres humanos e, em um espectro maior, em uma população específica.

Tais argumentos reforçam a escolha do modelo animal para este trabalho: um roedor, o coelho (White New Zealand). Os coelhos, embora sejam animais pertencentes a uma escala filogenética distante à do homem, apresentam algumas vantagens como modelo experimental para estudos do PRP. Por serem de médio porte, tornam possível a coleta de um volume de sangue suficiente para o preparo de um PRP autógeno, mantendo o animal com todos os seus sinais vitais preservados e sem nenhum tipo de comprometimento sistêmico [4]. Entre outras vantagens apresentadas pelo coelho como modelo experimental, destacam-se também o baixo custo e a facilidade de obtenção, manuseio e manutenção [4].

Atualmente os estudos relacionados ao PRP e à sua aplicação na Odontologia dedicam atenção especial a vários detalhes técnicos envolvidos no preparo dessa biotecnologia, tais como: o tipo de centrifuga, o tipo de anticoagulante dos sistemas de coleta de sangue, a velocidade de centrifugação selecionada, a quantidade e o tipo de fatores de crescimento existentes no PRP e o número de plaquetas presente nas amostras de sangue do indivíduo antes e após o preparo do PRP [4].

Em relação à quantidade de plaquetas, o aumento médio percentual de plaquetas do PRP encontrado neste estudo foi numericamente semelhante ao valor proposto por Marx (2004) [15] em humanos. Segundo Marx (2004) [15], para que o PRP seja considerado “terapêutico” e tenha potencial de influenciar biologicamente as células de um leito receptor, a quantidade de plaquetas precisa ser 5 vezes maior que a de plaquetas do sangue periférico, em humanos.

A validade da comparação direta do valor proposto para obter um PRP “terapêutico” em humanos e a simples adoção desse valor para uma outra espécie animal, como os coelhos, poderiam, entretanto, ser questionadas. Embora se tenha observado um aumento percentual médio de plaquetas no PRP de coelhos semelhante ao proposto como ideal para o PRP em humanos, existem diferenças fundamentais na morfologia dos elementos figurados do sangue entre coelhos e humanos, sendo a principal delas o

tamanho das plaquetas ($5,17 \pm 0,46 \mu\text{m}^3$ para humanos e $4,78 \pm 0,26 \mu\text{m}^3$ para coelhos) [7]. Tais diferenças, por si sós, fazem com que qualquer comparação entre PRPs obtidos de diferentes espécies animais, feita simplesmente pela coincidência de valores, seja empírica e superficial. Como o objetivo deste trabalho se limitou à verificação quantitativa da concentração de plaquetas de um protocolo específico, sem a avaliação de seus efeitos biológicos, é necessário comparar os valores encontrados no protocolo adotado tendo como referência os estudos conduzidos por Marx et al. (1998) [14], Kim et al. (2002) [8], Zechner et al. (2003) [27] e Weibrich et al. (2004) [22]. Esses autores observaram que as concentrações de plaquetas de aproximadamente 400 a 500% em relação ao sangue periférico tinham um efeito positivo na cicatrização óssea em quatro espécies animais diferentes (miniporco, cão, humano e coelho).

Para alguns autores, um aumento no número de plaquetas acima de 400% em relação à quantidade de plaquetas do sangue periférico e os resultados biológicos obtidos por meio desse aumento são diretamente dependentes do método de centrifugação [16, 23, 24, 25]. De acordo com Marx (2001) [16], para que se possa verdadeiramente concentrar plaquetas do sangue autólogo, o protocolo adotado deve utilizar uma técnica de dupla centrifugação, como o protocolo de Sonnleitner et al. (2000) [19]. A primeira centrifugação (chamada também de centrifugação pesada) separará as células vermelhas do plasma, o qual contém plaquetas, leucócitos e fatores da coagulação. A segunda centrifugação (chamada de centrifugação leve) refina a amostra, separando as plaquetas do plasma, juntamente com leucócitos e uma pequena quantidade de células vermelhas. Essa centrifugação, livre da obstrução ocasionada por um grande número de células vermelhas no momento da primeira centrifugação, produz o PRP e o separa do plasma pobre em plaquetas (PPP). Então, conforme afirma Marx (2001) [16], protocolos de única centrifugação não produzem PRP, mas sim uma mistura de PPP e PRP que tem revelado baixas concentrações plaquetárias.

Não só o número de centrifugações é importante no preparo do PRP, mas também a força de rotação selecionada. Um aumento na força de rotação pode garantir maior concentração de plaquetas [3]. No presente estudo, a centrifugação do sangue a 400 g, no protocolo de Sonnleitner et al. (2000) [19], proporcionou uma concentração adequada de plaquetas. Entretanto é preciso considerar que as forças mecânicas demasiadamente elevadas para o preparo do PRP podem, também, ativar precocemente as plaquetas, levando à liberação dos fatores de crescimento e conseqüentemente à perda deles no plasma sobrenadante durante o processo de centrifugação, comprometendo a eficiência terapêutica do PRP [3].

Consideração especial também deve ser dada ao método manual de contagem de células empregado neste trabalho. A contagem de plaquetas constitui um parâmetro hematológico passível de erro, e não há um método ideal para quantificar esse elemento. Questionamentos têm sido feitos não apenas em relação à metodologia em si, mas também quanto ao grau de concordância entre os métodos manual e automatizado [9, 11, 17, 20]. Apesar de alguns estudos mostrarem vantagens da contagem automática de plaquetas, os autores concordam que esse método reflete menor confiabilidade do que a contagem manual, principalmente em casos de trombocitopenia.

Em vista da literatura discutida, conclui-se que todas as controvérsias existentes a respeito dos reais benefícios do PRP como potencializador dos processos cicatriciais devem ser analisadas, principalmente, à luz do protocolo escolhido para o preparo do biomaterial.

Conclusão

Neste estudo, mostrou-se que a obtenção de um "PRP terapêutico", conforme defende Marx (2004) [15], foi possível com o protocolo de dupla centrifugação (Sonnleitner et al., 2000 [19]).

Referências

1. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-34.
2. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res.* 2002;37:300-6.
3. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31:615-9.
4. Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:1403-7.
5. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone.* 1996;19:23S-37S.
6. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990;1:60-8.

7. Jain NC. The platelets. In: Jain NC. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 105.
8. Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:86-94.
9. Kunz D. Possibilities and limitations of automated platelet counting procedures in the thrombocytopenic range. *Semin Thromb Hemost*. 2001;27:229-35.
10. 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;58:297-300.
11. Langianni U, Limberti A, Bottari G, Ignesti C, Innocenti V. Evaluation of interferences in electronic platelet count. *Quad Scavo Diagn*. 1988;24:197-202.
12. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol*. 2002;73:198-205.
13. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991;62:710-6.
14. 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*. 1998;85:638-46.
15. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:489-96.
16. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10:225-8.
17. Penev M, Kamenov V, Donkova O, Petkova D. Automatic and manual methods for counting the thrombocytes in the blood. *Vutr Boles*. 1987;26:109-12.
18. Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31:469-84.
19. Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15:879-82.
20. Sutor AH, Grohmann A, Kaufmehl K, Wundisch T. Problems with platelet counting in thrombocytopenia. A rapid manual method to measure low platelet counts. *Semin Thromb Hemost*. 2001;27:237-43.
21. Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc*. 2003;69:664.
22. 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;34:665-71.
23. Weibrich G, Kleis WK. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13:437-43.
24. 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;30:97-102.
25. 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;14:357-62.
26. 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;55:1294-9.
27. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:15-22.

Como citar este artigo:

Messora MR, Nagata MJH, Furlaneto FAC, Deliberador TM, Melo LGN, Garcia VG et al. Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo experimental em coelhos. *Rev Sul-Bras Odontol*. 2009 Sep;6(3):291-6.