

1 **COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DE**
2 **PLASMA RICO EM PLAQUETAS CANINO**

3 *(COMPARISON OF DIFFERENT PROTOCOLS TO OBTAIN CANINE PLATELETS RICH*
4 *PLASMA)*

5
6 **RESUMO**

7 O plasma rico em plaquetas (PRP) é um hemocomponente produzindo a partir do plasma,
8 visando a obtenção de citocinas e fatores do crescimento com fins terapêuticos, como a
9 cicatrização e reparação de diferentes tecidos. Esse estudo quantificou a concentração
10 plaquetária obtida utilizando-se de três diferentes protocolos de obtenção do PRP de 13
11 amostras de sangue de 8 cães hígidos. As velocidades de centrifugação utilizadas no protocolo
12 I foram de 1ª centrifugação de 1.500 rpm e 2ª centrifugação de 3.000 rpm; no protocolo II, de
13 2.000 rpm e 3.000 rpm; e o protocolo III com 3.000 rpm e 4.000 rpm, respectivamente. O
14 melhor resultado para a produção de PRP autólogo foi obtido no protocolo 1, seguido do
15 protocolo 2, com aumentos de 116% e 83,05% após a 2ª centrifugação, respectivamente.
16 Entretanto, os resultados obtidos na 1ª centrifugação foram superiores aos apresentados após a
17 2ª. centrifugação, observando elevações de 203,66% e 210,20% comparados aos valores basais.

18 **Palavras-chave:** hemoderivado; hemoterapia; sangue; trombócitos

19
20 **SUMMARY**

21 Platelet-rich plasma (PRP) is a blood component produced from plasma, aiming at obtaining
22 cytokines and growth factors for therapeutic purposes, such as healing and repair of different
23 tissues. This study quantified the platelet concentration resulting from three different protocols
24 for obtaining PRP from 13 blood samples from 8 healthy dogs. The centrifugation speeds used
25 in protocol I was 1,500 rpm in the first centrifugation and 3,000 rpm in the second
26 centrifugation; in protocol II, 2,000 rpm and 3,000 rpm; and protocol III with 3,000 rpm and
27 4,000 rpm, respectively. The best result for autologous PRP production was obtained in
28 protocol 1, followed by protocol 2, with increases of 116% and 83.05% after the 2nd
29 centrifugation, respectively. However, the results obtained in the 1st centrifugation were
30 superior to those presented after the 2nd. centrifugation, observing increases of 203.66% in
31 protocol 1 and 210.20% in protocol 2, when compared to baseline.

32 **Keywords:** blood products; hemotherapy; blood; thrombocytes

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

INTRODUÇÃO

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado autólogo 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

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

64 Para a produção do PRP preconizou-se 3 diferentes protocolos que se diferenciavam na
65 velocidade da 1ª e 2ª centrifugação, mas o tempo constante de 10 minutos em cada uma delas.
66 O protocolo I (n=4) a velocidade da 1ª centrifugação foi de 1.500 rpm e 2ª de 3.000 rpm; o
67 protocolo II (n=5), com 2.000 rpm e 3.000 rpm; e o protocolo III (n=4) com 3.000 rpm e 4.000
68 rpm, respectivamente.

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

82 A análise estatística descritiva e o cálculo da porcentagem de incremento foram
83 mensurados a partir dos dados obtidos, a fim de determinar dentre as técnicas estudadas a mais
84 indicada para a produção do PRP.

85 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

86 Entre os protocolos avaliados, o protocolo 1 que utilizou menores velocidades de
87 centrifugação (1.500 e 3.000 rpm) foi a que apresentou o maior aumento final (116%) na
88 concentração de plaquetas, em comparação com seu valor inicial. Já o protocolo 3, na qual
89 possuía maior velocidade de centrifugação (3.000 e 4.000 rpm), apresentou o incremento de
90 apenas 18,71% na concentração plaquetária (figura 1). Porém, nas três técnicas utilizadas a
91 segunda centrifugação reduziu o número de plaquetas totais quando comparados a primeira
92 centrifugação (tabela 1).

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

103 Os valores obtidos após a 2ª centrifugação foram inferiores aos observados por outros
104 estudos com cães, onde foram encontrados aumentos de duas a seis vezes (Vanat et al., 2012)
105 e de 210% (Ferraz et al., 2007). Entretanto, os valores alcançados na primeira centrifugação do

106 protocolo 1 (203,665%) e 2 (210,20%) apresentaram concentrações que se enquadram a estes
107 estudos.

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

114 As elevadas velocidades de centrifugação e o volume de 4,0 mL utilizado para o preparo
115 do PRP resultou em uma camada de névoa estreita, o que dificultou a sua separação sem
116 interferir na camada celular, leucócitos e hemácias, principalmente após a segunda
117 centrifugação, onde se trabalhava com um volume aproximado de 2 mL. Esta é a provável causa
118 da ampla variação individual observada, além da necessidade de uma amostragem maior,
119 podem ter comprometido o resultado médio final da concentração plaquetária.

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

126

127

CONCLUSÃO

128 O melhor resultado para a produção de PRP autólogo foi obtido no protocolo 1, seguido
129 do protocolo 2, com aumentos de 116% e 83,05% após a 2ª centrifugação, respectivamente.
130 Entretanto, os resultados obtidos na 1ª centrifugação foram superiores aos apresentados após a

131 2ª. centrifugação, observando elevações de 203,66% no protocolo 1 e 210,20% no protocolo 2
132 quando comparados ao valor basal.

133

AGRADECIMENTOS

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

136

137

REFERÊNCIAS

138 ALEIXO, G.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N. et al. [2011] Comparação entre dois
139 protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. **Arquivo Brasileiro de**
140 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.567-573, 2011. Available in:
141 <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n3/v63n3a05.pdf>. Accessed on: 20/10/2020

142 ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A.T. et al. I. [2006] New insights into and novel
143 applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.5, p.227-234,
144 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).
145 Accessed on 20/10/2020.

146 FERRAZ, V.C.M.; FERRIGNO, C.R.A.; SCHMAEDECKE, A. [2007] Platelet concentration
147 of platelet rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Brazilian**
148 **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.6, p.435-440, 2007. Available
149 in: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26609>. Accessed on 20/10/2020.

150 KORNSUTHISOPON, C.; PIRARAT, N; OSATHANON, T. et al. [2020] Autologous platelet-
151 rich fibrin stimulates canine periodontal regeneration, **Scientific Reports**, v.10, p.1850, 2020.
152 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7002419/>. Accessed on
153 20/10/2020.

- 154 OUDELAAR, B.W.; PEERBOOMS, J.C. [2019] Concentrations of Blood Components in
155 Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems A Review of the Literature. The
156 **American Journal of Sports Medicine**, v.47, n.2, p.479–487, 2019. Available in:
157 [https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0363546517746112?casa_token=J6BExsYSrN](https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0363546517746112?casa_token=J6BExsYSrNEAAAAA:GtJTGUy0AxTiQRhs2kOjl2rzDi6W9hcV310MrAfnbisZzblko8s_Wdnc-L12aVo9lQ2InhIoCZTuRA)
158 [EAAAAA:GtJTGUy0AxTiQRhs2kOjl2rzDi6W9hcV310MrAfnbisZzblko8s_Wdnc-](https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0363546517746112?casa_token=J6BExsYSrNEAAAAA:GtJTGUy0AxTiQRhs2kOjl2rzDi6W9hcV310MrAfnbisZzblko8s_Wdnc-L12aVo9lQ2InhIoCZTuRA)
159 [L12aVo9lQ2InhIoCZTuRA](https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0363546517746112?casa_token=J6BExsYSrNEAAAAA:GtJTGUy0AxTiQRhs2kOjl2rzDi6W9hcV310MrAfnbisZzblko8s_Wdnc-L12aVo9lQ2InhIoCZTuRA). Accessed on: 20/10/2020.
- 160 PARDO, M.; SACCO, S.R.; SURIAN, C.R.S. et al. [2012] Principais usos do plasma rico em
161 plaquetas na medicina veterinária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**.
162 v.9, n.18, 2012. Available in:
163 [http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/mU8J9OaisiRuIg8_2013-6-25-](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/mU8J9OaisiRuIg8_2013-6-25-18-11-10.pdf)
164 [18-11-10.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/mU8J9OaisiRuIg8_2013-6-25-18-11-10.pdf). Accessed on: 20/10/2020.
- 165 PENHA, E.M.; JULIÃO, L.R.; CAVALCANTE, P.B. et al. [2014] Uso do plasma rico em
166 plaquetas no tratamento da doença articular degenerativa em cão: relato de caso. **Arquivo de**
167 **Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.17, n.2, p.137-142, 2014. Available in:
168 <https://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/4932>. Accessed on:
169 20/10/2020.
- 170 SHIN, H.S., WOO, H.M., KANG, B.J. [2017] Optimisation of a double-centrifugation method
171 for preparation of canine platelet rich plasma. **BCM Veterinary Research**, v.13, p.198, 2017.
172 Available in: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-017-1123-3>.
173 Accessed on: 20/10/2020.
- 174 VANAT, N.; MEDEIROS, T.N.S.; BALARIN, M.R.S. et al. Modificação de técnica de preparo
175 do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.1, p.313-322, 2012.
176 Available in:

177 <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/download/6488/10394>. Accessed
178 on: 20/10/2020.

179 VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; FRANCO T.R. Método de obtenção do gel de plasma rico
180 em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.24, n.2, p. 212-218, 2009.
181 Available in: [http://www.rbc.org.br/details/471/pt-BR/metodo-de-obtencao-do-gel-de-](http://www.rbc.org.br/details/471/pt-BR/metodo-de-obtencao-do-gel-de-plasma-rico-em-plaquetas-autologo)
182 [plasma-rico-em-plaquetas-autologo](http://www.rbc.org.br/details/471/pt-BR/metodo-de-obtencao-do-gel-de-plasma-rico-em-plaquetas-autologo). Accessed on: 20/10/2020.

183 VIEGAS, C.A.A.; DIAS, M.I.R.; AZEVEDO, J.M.T. et al. A utilização de Plasma Rico em
184 Plaquetas na regeneração do tecido ósseo alveolar e cortical. Estudos experimentais num
185 modelo de defeito ósseo periodontal em cão Beagle (*Canis familiaris*) e num modelo de defeito
186 ósseo cortical na ovelha (*Ovis aries*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101,
187 p.193-213, 2006. Available in: [http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/edicao/12_2006/559_560_193-](http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/edicao/12_2006/559_560_193-213.htm)
188 [213.htm](http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/edicao/12_2006/559_560_193-213.htm). Accessed on: 20/10/2020.

189

190

191

192

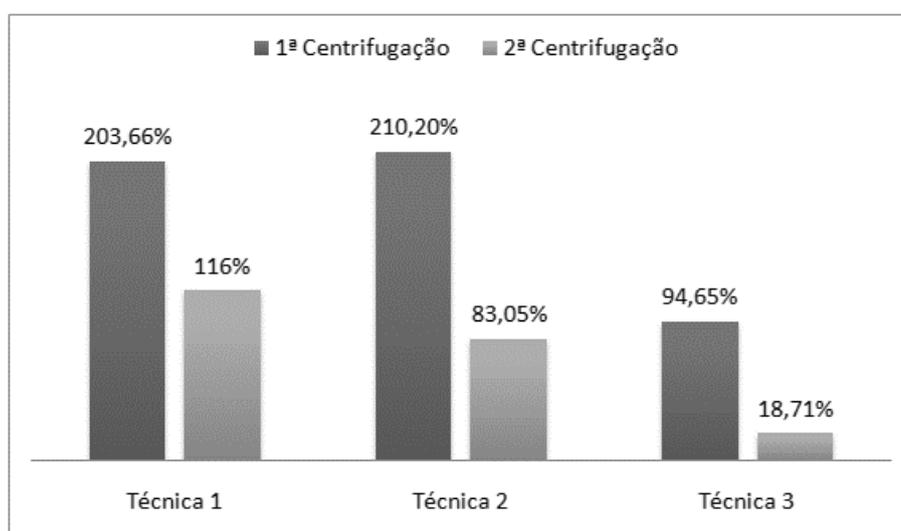
193

194

195

196

197



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

200

201 Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão (desvpad) da contagem plaquetária basal (tempo 0),
202 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

203