

Influência da centrifugação na agregação plaquetária durante processamento do plasma rico em plaquetas e sua relação com a concentração de TGF-beta final

Sarah Raphaela Torquato Seide^[a], Cynthia do Prado Vendrusculo^[a], Fernanda Rodrigues Agreste^[a], Joice Fülber^[a], Juliana Junqueira Moreira^[a], Yara Maria Michelacci^[b], Raquel Yvonne Arantes Baccarin^[a]

^[a] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

^[b] Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

*Autor correspondente
e-mail: sarahseidel@usp.br

Resumo

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um produto autólogo, hemoderivado, de fácil aquisição e baixo custo, apresentando em sua composição plaquetas, fatores de crescimento, proteínas plasmáticas, algumas hemácias e leucócitos; e tem se mostrado de ampla aplicabilidade no tratamento das afecções locomotoras em equinos, com resultados satisfatórios em uso intra-articular, intralesional em tendinites e no tratamento adjunto de laminite crônica. Objetivou-se avaliar o grau de ativação das plaquetas provocado pelas centrifugações durante o processamento do PRP, bem como o impacto desta ativação na concentração plaquetária obtida e sua correlação com a concentração de TGFβ1 final. Foram utilizados 12 equinos, Árabes, machos, de 3 a 5 anos, clinicamente sadios, sendo realizados dois protocolos de PRP, um com centrifugação única e outro com dupla centrifugação. No primeiro, foram coletados 10ml de sangue total de cada animal por meio de punção da veia jugular externa, com uso de agulha 21G e seringa de 10ml, sendo esse volume imediatamente transferido para tubos falcon contendo citrato de sódio a 3,8% na proporção 1:10, homogeneizado e centrifugado a 141g/12 minutos, à T^o ambiente, e seu sobrenadante denominado PRP0. Para o segundo, o sangue foi coletado com vacutainer em tubos com capacidade de 4,5ml contendo citrato de sódio a 3,8%, totalizando 20ml de sangue total por animal. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para 3 tubos falcon, permanecendo em repouso à T^o ambiente por 25 minutos, centrifugadas a 300g/5 minutos, seguido de novo repouso de 25 minutos. O sobrenadante do tubo 1 foi denominado plasma pobre em plaquetas 1 (PPP1). O sobrenadante dos tubos restantes foi transferido a dois novos tubos falcon, procedendo a nova centrifugação de 700g/15 minutos, com 45 minutos de repouso à T^o ambiente. Em seguida, o sobrenadante do tubo 2 em sua porção mais superior foi denominado PPP2, enquanto 70% do sobrenadante do tubo 3 foi descartado e sua porção remanescente homogeneizada e classificada como PRP1.



As amostras, previamente identificadas, foram submetidas à contagem plaquetária manual em câmara de Neubauer e à avaliação da agregação plaquetária em aparelho agregômetro Chrono-Log Corporation, pelo método turbidimétrico, com uso do agonista colágeno tipo 1 na proporção 2µl agonista:500µl amostra para induzir a mesma. Após avaliação, foram armazenadas a -80°C, sendo o fator de crescimento posteriormente quantificado por meio de kit ELISA Human TGFβ1 Quantikine, validado para a espécie equina. As maiores contagens plaquetárias alcançadas foram no PRP1 (duas centrifugações), concentrando em média 6,8x, e as demais frações com média de 4,1x para o PPP1, 2,6x no PRP0 e, por fim, o PPP2 com 0,33x. O PPP2 não foi submetido ao teste de agregação plaquetária. A média apresentada pelos demais foi: 100% para o PRP0, 90% para o PPP1 e 66,8% para o PRP1. A quantificação do TGFβ1 obtida foi: 5.537,3 pg/µl para PRP0, 5.539,4 pg/µl para PPP1, 2.942,4 pg/µl para PPP2 e 12.407,8 pg/µl para o PRP1. A concentração plaquetária alcançada no PPP1 e PRP1 é condizente com a necessária para classificar o produto como PRP, ou seja, no mínimo 4x acima da basal. A quantidade de TGFβ1 apresentou aumento à medida em que as concentrações plaquetárias aumentaram, evidenciando correlação positiva entre as mesmas. É possível observar que no mínimo 30% do PRP1 já havia sido ativado durante a centrifugação, o que pode explicar a quantidade de TGFβ1 encontrada no PPP2, que possuiu a menor contagem plaquetária, bem como a semelhança de valores de TGFβ1 demonstrada nas amostras de PRP0 e PPP1. Conclui-se que a dupla centrifugação com o intuito de obter maior concentração plaquetária é vantajosa em relação à centrifugação única, mesmo produzindo maior agregação plaquetária durante o processamento do PRP. Isto porque quanto maior a concentração plaquetária atingida, maior a concentração de TGFβ1 disponível.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas. Fator de crescimento. Agregação plaquetária.

Agradecimentos: à CAPES pela concessão de bolsa de estudo.