

## PLASMA RICO EM PLAQUETAS TÉCNICA LABORATORIAL

FERNANDO DUARTE\*; CARINA RAMOS\*\*; MARCO MARTINS\*\*\*; LAURENTINA QUEIRÓS\*\*\*\*;  
FERNANDO FIGUEIRA\*\*\*\*\*

### RESUMO

*Plasma rico em plaquetas tem sido utilizado como um veículo de transporte de factores de crescimento, que têm o potencial de acelerar naturalmente o processo de regeneração, cicatrização e crescimento ósseo e tecidos envolventes. O processo de obtenção do plasma rico em plaquetas envolve fundamentalmente a separação e concentração de plaquetas.*

*O método tradicional apresenta diversas desvantagens. Assim, propomos uma técnica de obtenção de plasma rico em plaquetas de fácil execução, podendo ser realizada em ambulatório, uma vez que não necessita de equipamento específico, nem de pessoal especializado tornando-se assim, numa técnica pouco dispendiosa e com grandes benefícios para o paciente.*

**Palavras-chave:** Plasma rico em plaquetas, plasma rico em factores de crescimento, factores de crescimento, plaquetas

### ABSTRACT

*Platelet-rich plasma has been used as a vehicle for growing factors potentially increasing the natural process of regeneration and cicatrization and bone and soft tissue growth.*

*The process to obtain platelet-rich plasma is achieved by the separation and concentration of platelets.*

*The traditional method presents various disadvantages therefore we propose a platelet-rich plasma technique that can be done in private practice due to its easy execution, non specific equipment and trained staff. This technique is not expensive and can bring great benefit to the patient.*

**Key-words:** Platelet-rich plasma, growth factors plasma, growth factors, platelets

### INTRODUÇÃO

O sangue apresenta-se como um factor primordial na função biológica do homem.

Quase metade do volume sanguíneo é formado por células, ou seja, eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O restante volume sanguíneo é constituído por plasma, um líquido aquoso amarelado que contém proteínas, açúcares, gorduras e sais minerais<sup>(1)</sup>.

As plaquetas, pequenos fragmentos celulares não nucleados, apresentam enormes reservatórios de factores de crescimento que têm o potencial de acelerar naturalmente o processo de regeneração, cicatrização e crescimento dos tecidos, tendo sido inicialmente usadas para o

\*Médico Dentista. Mestre em Cirurgia Oral e Maxilofacial pelo Eastman Dental Institute – Universidade de Londres. Estudante de Doutoramento em Cirurgia Oral e Maxilofacial pelo Eastman Dental Institute – Universidade de Londres. Assistente de Cirurgia Oral no I.S.C.S.-N. Assistente Hospitalar do Serviço de Estomatologia / Medicina Dentária no Hospital Senhora da Oliveira – Guimarães

\*\*Médica Dentista. Estudante de Mestrado em Oncologia no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / IPO-Porto – Universidade do Porto

\*\*\*Médico Dentista. Estudante de Mestrado em Fisiologia do Esforço no FCDEF. Assistente de Fisiologia Humana no I.S.C.S.-N. Assistente Hospitalar do Serviço de Estomatologia / Medicina Dentária no Hospital Senhora da Oliveira – Guimarães

\*\*\*\*Médica. Assistente Hospitalar de Imuno-Hemoterapia Directora de Serviço de Imuno-Hemoterapia do Hospital Senhora da Oliveira – Guimarães

\*\*\*\*\*Médico Estomatologista. Regente de Morfologia Oral no I.S.C.S.-N. Regente da Disciplina de Clínica Integrada no I.S.C.S.-N. Director de Serviço de Estomatologia / Medicina Dentária no Hospital Senhora da Oliveira - Guimarães

controlo hemostático <sup>(2,4,6,8,9)</sup>.

Recentemente, plasma rico em plaquetas tem sido utilizado como um veículo de transporte de factores de crescimento com efeito local <sup>(2,3,4)</sup>.

O uso de factores de crescimento é desta forma reportado por diversos autores como uma nova fronteira da terapia clínica, criando assim um novo marco que afecta diversas áreas médicas <sup>(4,6)</sup>.

No âmbito da medicina dentária o seu uso tem sido enquadrado na reconstrução de defeitos ósseos, enxertos ósseos, aumento do rebordo alveolar e levantamentos de seio maxilar <sup>(4)</sup>.

O processo de obtenção do plasma rico em plaquetas, envolve fundamentalmente, a separação e concentração de plaquetas e consequentemente, os factores de crescimento que estas contêm <sup>(6,7,8,9)</sup>.

Vários estudos revelam a presença de, pelo menos, 3 factores de crescimento importantes, nos grânulos  $\propto$  das plaquetas: factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), factor de crescimento transformante  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), factor de crescimento transformante  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) <sup>(2,4,6,7,8,9)</sup>.

O factor de crescimento derivado das plaquetas é assim designado, visto ter sido encontrado pela primeira vez nas plaquetas, nos seus grânulos  $\alpha$ , embora actualmente se conheça a sua existência em outras células, como os macrófagos, células endoteliais, monócitos e fibroblastos, assim como na matriz óssea <sup>(2,7,8)</sup>.

O factor de crescimento derivado das plaquetas parece ter diversos efeitos positivos no processo de cicatrização, incluindo a mitogénese, angiogénese e regulação de outros factores de crescimento celular. Actua também, na promoção da função dos fibroblastos e osteoblastos, promoção da diferenciação celular e aceleração dos efeitos dos factores de crescimento em outras células, tais como os macrófagos <sup>(7,8,9)</sup>.

Devido á presença de plaquetas no coágulo sanguíneo, o factor de crescimento derivado destas é o primeiro factor de crescimento tecidual a actuar na revascularização, síntese de colagénico e regeneração óssea, no processo de cicatrização <sup>(7)</sup>.

O termo, factor de crescimento transformante  $\beta$

(TGF- $\beta$ ) é aplicado a uma superfamília de factores de crescimento e diferenciação, e recebe esta designação, visto ter sido efectuado o seu isolamento, pela primeira vez, em tecidos transformante (sarcomas) <sup>(2,7)</sup>. Os TGF- $\beta$  presentes no plasma rico em plaquetas, são as proteínas TGF- $\beta_1$  e TGF- $\beta_2$ , cujas funções primordiais parecem ser a quimiotaxia, a mitogénese dos precursores de osteoblastos e a capacidade de estimular a deposição de osteoblastos, na matriz de colagénico, durante o processo de regeneração óssea <sup>(2,7,8,9)</sup>. Adicionalmente, os TGF- $\beta$  inibem a formação de osteoclastos e reabsorção óssea, favorecendo assim, a formação óssea por dois mecanismos diferentes <sup>(7,8)</sup>.

O tradicional método de obtenção de plasma rico em plaquetas envolve o isolamento das plaquetas através de um separador de células, formando um gel com o uso de cloreto de cálcio e trombina de origem bovina <sup>(6,7,10)</sup>.

Este procedimento apresenta diversas desvantagens. O equipamento é bastante dispendioso e em regra geral, apenas está disponível em meio hospitalar, pelo que se torna difícil o uso de plasma rico em plaquetas autólogo em consultório privado <sup>(6,7)</sup>. Além disso, o uso de trombina de origem bovina tem sido associada com o desenvolvimento de anticorpos contra factores V, XI e trombina, resultando numa dificuldade acrescida no tratamento das coagulopatias <sup>(5,6,7)</sup>.

Assim, propomos uma técnica de obtenção de plasma rico em plaquetas de fácil execução, podendo ser executado num consultório privado. Uma vez que esta técnica não exige equipamento específico, não apresenta riscos para o paciente e tem-se revelado muito pouco dispendiosa <sup>(6)</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

A selecção do paciente é baseada na ausência de doenças locais ou sistémicas que possam contra-indicar o tratamento, como é o caso de estados hipovolémicos severos, instabilidade hemodinâmica, sepsis, isquémia miocárdica, angina instável, doença coronária esquerda, paciente com hematócrito abaixo dos 30%, número de plaquetas abaixo de 100.000/ $\mu$ l e terapia fibrinolítica <sup>(2,9,11)</sup>.

## TÉCNICA

O sangue é obtido antes do começo da cirurgia e da administração da anestesia.

Cerca de 10 a 20 ml de sangue são colhidos do paciente em sistema de vácuo usando tubos de 5 µl, contendo solução de citrato tri-sódio como anticoagulante.

Os tubos são centrifugados a 160G durante 6 minutos, à temperatura ambiente. O sangue é desta forma separado em 3 componentes básicos: glóbulos vermelhos que se apresentam na parte inferior do tubo; o plasma rico em plaquetas no meio do tubo; e o plasma pobre em plaquetas na parte superficial do tubo.

Cerca de 1 ml do plasma pobre em proteínas ( parte superficial do tubo) de cada tubo de 5 ml é rejeitado.

Pipeta-se o restante plasma e cerca de 1 a 2 mm da superfície da camada dos glóbulos vermelhos, no volume total de 1,2 ml, sendo transferido para tubos Eppendorf esterilizados e adicionado de 50 µl de cloreto de cálcio a 10%, a cada tubo.

Passados 15 a 20 minutos o gel de plasma rico em proteínas está formado.

O tempo existente entre a formação do gel de plasma rico em plaquetas e a otimização dos factores de crescimento está padronizado como 5 a 10 minutos.

O gel de plasma rico em plaquetas pode assim ser aplicado durante a cirurgia na área do defeito, levando a uma rápida regeneração e cicatrização óssea e dos tecidos envolventes <sup>(7,8)</sup>.

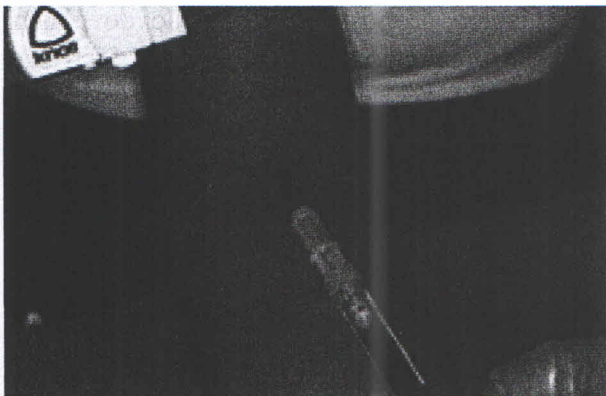


Fig.1 - Colheita de sangue do paciente

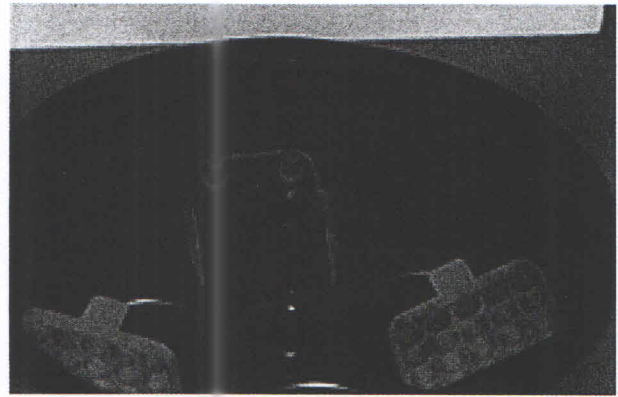


Fig.2 - Centrifugação do sangue

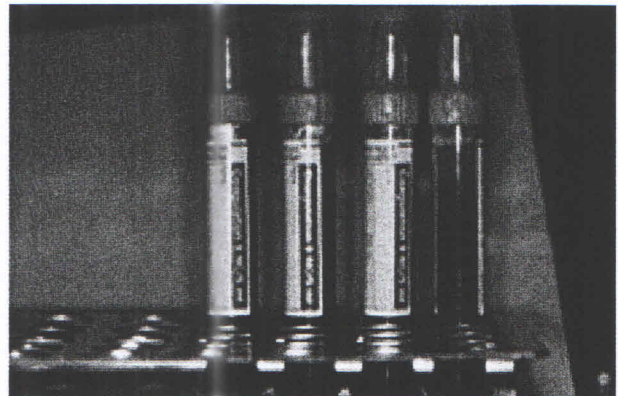


Fig.3 - Tubos após centrifugação



Fig.4 - Remoção de 1ml de plasma pobre em proteínas

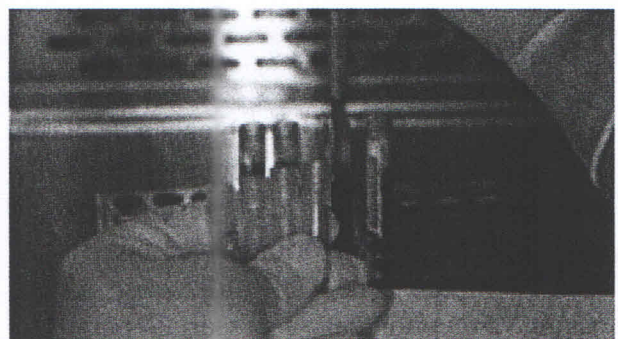


Fig.5 - Separação de plasma rico em plaquetas

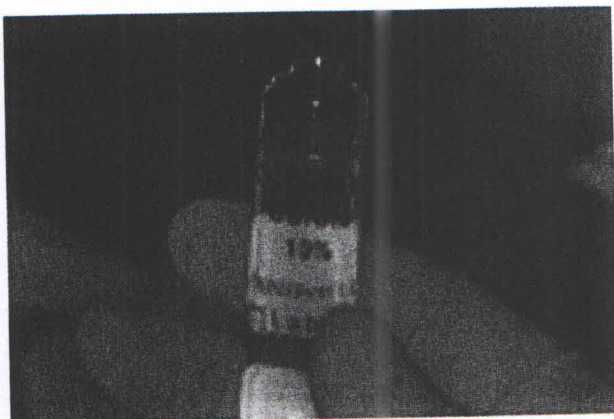


Fig.6 - Cloreto de cálcio a 10%

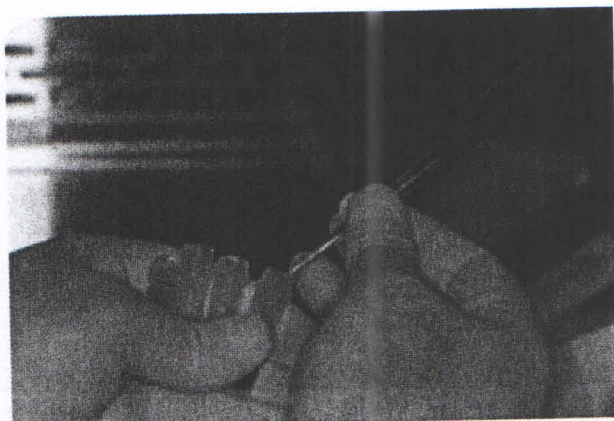


Fig.7 - Adição de cloreto de cálcio a 10%



Fig.8 - Plasma rico em plaquetas

## DISCUSSÃO

A técnica apresentada de obtenção de plasma rico em plaquetas autólogo, como forma de utilização de factores de crescimento em pacientes de ambulatório, parece-nos ser um método rápido e de fácil utilização, obtendo assim, as condições necessárias para uma regeneração mais rápida e efectiva. O uso desta

técnica poderá trazer grandes benefícios quando usada em conjunto com enxertos ósseos autólogos <sup>(2,6,7)</sup>.

Desta forma evitamos o uso de equipamento específico e de trombina bovina utilizados para a elaboração do gel no método tradicional, podendo assim ser realizado no consultório privado.

Contudo, é de reter que o gel de plasma rico em plaquetas autólogo, embora de fácil utilização, apresenta um tempo limite de manipulação de cerca de 10 minutos após a sua formação, o que exige que este seja elaborado no momento da sua aplicação de forma a preservar a actividade dos factores de crescimento <sup>(2,10)</sup>.

O uso desta técnica não introduz riscos de transmissão de doenças para o paciente, uma vez que o produto obtido tem origem no próprio sangue do doente e não é associado com outros componentes de origem animal ou humana <sup>(2,6)</sup>.

Estudos futuros deverão ser realizados, com vista á determinação de diferentes factores de crescimento e físico-químicos que poderão estar presentes no plasma rico em plaquetas, de forma a potenciar o efeito destes no crescimento, regeneração óssea e dos tecidos envolventes. Desta forma esta técnica poderia ser optimizada, chegando mesmo ás concentrações ideais dos diversos factores para uma melhor cicatrização, regeneração e crescimento da área receptora.

## CONCLUSÃO

A técnica proposta de obtenção do plasma rico em plaquetas é uma técnica de fácil execução, não necessita de material específico nem de pessoal altamente especializado, podendo ser realizada em ambulatório. Pelo que é de realçar o baixo custo e rápida preparação da técnica.

A incorporação desta técnica leva a grandes benefícios para o paciente, tendo em vista a rápida regeneração, de forma quantitativa e qualitativa, dos tecidos e a ausência de riscos de infecção ou transmissão de doenças.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - ALBERT, J., DALESKOG, M., WALLÉN, N.H. – A comparison of the antiplatelet effect of s-nitrosoglutathione in whole blood and platelet-rich plasma. *Thrombosis Research* 2001; 102: 161-165.
- 2 - ANITUA, E., - Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Maxillofac Implants* 1999; 14 (4): 529-535.
- 3 - GREEN, D.M., KLINK, B. – Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101 (4): 1161-1162.
- 4 - KASSOLIS, J.D., ROSEN, P.S., REYNOLDS, M.A. – Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000; 71 (10): 1654-1661.
- 5 - LANDESBERG, R., KARPATKIN, M., – Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56 (9): 1116-1117.
- 6 - LANDESBERG, R., ROY, M., GLICKMAN, R.S. – Quantification of growth factor levels using a simplified met platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58 (3): 297-300.
- 7 - MARX, R.E., CARSON, E.R., EICHSTAEDT, R.M., SCHIMMELE, S.R. STRAUSS, J.E., GEORGEFF, K.R. – Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radol Endod* 1998; 85 (6): 638-646.
- 8 - SCHIMITZ, J.P., HOLLINGER, J.O. – The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac* 2001; 59 (9): 1119-1120.
- 9 - SHANAMAN, R., FILSTEIN, M.R., DANESHMEYER, M.J. – Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21 (4): 345-355.
- 10 - SONNLEITNER, D., HUEMER, P., SULLIVAN, D.Y. – A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technique note. *Int J Maxillofac Implants* 2000; 15 (6): 879-882.
- 11 - WHITMAN, D.H., BERRY, R.L. – A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56: 1217-1218.