

CARLOS ALBERTO CALIXTO

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) POR
MEIO DE CENTRÍFUGA DE BANCADA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2011

CARLOS ALBERTO CALIXTO

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) POR
MEIO DE CENTRÍFUGA DE BANCADA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

ORIENTADOR : PROF^a. DR^a. LYDIA MASAKO FERREIRA

COORIENTADOR : PROF. DR. LUIZ EDUARDO FELIPE ABLA

São Paulo

2011

Calixto, Carlos Alberto.

Plasma rico em plaquetas (PRP) por meio de centrifuga de bancada. / Carlos Alberto Calixto. -- São Paulo, 2011.

xvii, 122f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Platelet-rich plasma obtained with centrifuge technique.

1. Plasma rico em plaquetas; 2. Engenharia tecidual; 3 Cola de fibrina; 4. Cicatrização; 5. Centrifugação; 6. Plaquetas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA PLÁSTICA**

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

A meus pais, *FUAD* e *RACENA* que, com muito sacrifício e alegria, deram-me o maior fruto de um amor que foi o carinho e a educação que permitiram minha formação profissional — maior legado de uma herança para um de seus frutos — ensinando o caminho do ideal do ser humano que é a disciplina, a dedicação e a perseverança na busca do objetivo.

À *MARCELA* e *GUSTAVO* que, pelo brilho de seus olhos quando de minha decisão, foram mais do que o incentivo, mas a luz para a realização de um ideal.

À *SISSI*, minha esposa, que em nenhum momento permitiu-me fraquejar por este caminho que, com certeza, teria sido árduo sem o seu suporte.

À Professora Doutora **LYDIA MASA**
KO FERREIRA, minha orientadora, que sempre me
acolheu com palavras de incentivo.

Ao professor **LUIS EDUARDO FELIPE**
ABLA, meu Coorientador que sempre
mostrou muita paciência e dedicação para
a realização desta dissertação, sempre com
uma solução para cada obstáculo.

Ao Professor Doutor **MIGUEL SABINO NETO**, Coordenador do curso de Pós- Graduação em Cirurgia Plástica (UNIFESP), pela excelente condução do programa e pelo apoio.

À **AKEMI CHIBA**, bioquímica do Hemocentro do Hospital São Paulo (UNIFESP), que esteve presente em todas as fases práticas deste projeto.

À Professora **VÂNIA MORELLI**, da disciplina de hematologia da UNIFESP.

Aos **RESIDENTES** da disciplina de cirurgia plástica da UNIFESP.

À **PROFESSORA MARIA APARECIDA DALBONI** da disciplina de nefrologia da UNIFESP

À **Dr^a ANTONIA MARIA DE OLIVEIRA MACHADO** do Laboratório Central do Hospital São Paulo (UNIFESP) por todo empenho e dedicação ao projeto.

À **ROSANI TEREZA DE SIQUEIRA E SILVA, EUZA BEZERRA DA COSTA, CARLA ANN NEIVA PEREIRA e FÁBIO NOVATO** do Laboratório central do hospital São Paulo (UNIFESP) por todo empenho e dedicação ao projeto.

Ao matemático e estatístico **SÉRGIO MIKIO KOYAMA**, pelo auxílio, atenção e dedicação para com este estudo.

E, em especial, aos **VOLUNTÁRIOS** que participaram deste projeto, sem os quais nada teria acontecido, meus agradecimentos.

*Quando uma criatura humana desperta
para um grande sonho e sobre ele lança
toda a força de sua alma, todo o
universo conspira a seu favor.*

(Goethe)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
LISTAS	ix
RESUMO	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVO.....	23
3 LITERATURA	25
4 MÉTODOS.....	40
5 RESULTADOS.....	54
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
NORMAS ADOTADAS	80
ABSTRACT	83
APÊNDICES	85
ANEXO	119

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Punção venosa na fossa antecubital, na área anterior do braço.....	47
FIGURA 2.	Centrífuga <i>Eppendorf</i> AG [®] 5804 R.....	48
FIGURA 3.	Centrífuga carregada com tubos (notar a distribuição) ...	50
FIGURA 4.	Sequência de procedimentos: (A-B) Após a centrifugação do sangue total, os $\frac{2}{3}$ superiores do sobrenadante foram colhidos e desprezados. (C-D) O $\frac{1}{3}$ inferior foi colhido e encaminhado para contagem das plaquetas	51
FIGURA 5.	Os tubos de citrato após a primeira centrifugação foram transferidos para outros tubos de polipropileno. Os do Grupo Uma Centrifugação (GC ₁) foram encaminhados para contagem de plaquetas. Os tubos do Grupo Duas Centrifugações (CG ₂) foram submetidos à nova centrifugação	51

FIGURA 6.	Coleta de plasma. (A) Os tubos de citrato, após a primeira centrifugação foram transferidos para outros tubos de polipropileno e encaminhados para contagem de plaquetas. (B) Após a centrifugação do sobrenadante no CG ₂ . Os $\frac{2}{3}$ superiores do plasma foram colhi dos e desprezados, e o $\frac{1}{3}$ inferior encaminhado para contagem das plaquetas	52
FIGURA 7.	Contador automático calibrado pelo fabricante (<i>Cell-Dyn Ruby[®] Abbott Diagnostics Divions, 200 Abbott Park Road, Abbot Park, Il. 60064, USA</i>)	53
FIGURA 8.	Amostra Estudo. Box-plot do número de plaquetas, segundo método utilizado e estudo.....	56
FIGURA 9.	Amostra Estudo. Box-plot do percentual de concentração de plaquetas, segundo método utilizado e amostra estudo	56

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	Descrição do Grupo Controle (GCt)	44
QUADRO 2.	Distribuição do sangue coletado nos respectivos Grupos Controle, com uma centrifugação (GC ₁) e com duas centrifugações (GC ₂)	44
QUADRO 3.	Relação Força g x Tempo empregado no GC ₁ no método A e B	45
QUADRO 4.	Relação Força x Tempo empregado no GC ₂ , nos métodos 1, 2, 3, 4 e 5.	46
QUADRO 5.	Relação da aceleração da centrífuga (rpm) e a força relativa de centrifugação (<i>RCF</i>) correspondente	49
QUADRO 6.	Análise descritiva dos diferentes grupos de método utilizados	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Medidas resumo para o número de plaquetas/ μl por método e amostra.....	55
TABELA 2.	Número de testes com concentração superior a 100% segundo método e amostra.....	58
TABELA 3.	Teste de comparações de médias. Teste <i>t-Student</i> . Contagem do número de plaquetas/ μl	59
TABELA 4.	Teste de comparações de médias. Teste <i>t-Student</i> . Concentração	60
TABELA 5.	Teste de comparações de médias. Teste de Wilcoxon. Contagem do número de plaquetas	61
TABELA 6.	Teste de comparações de médias. Teste de Wilcoxon. Concentração	61
TABELA 7.	Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos resíduos da ANOVA	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
(*)	Significância estatística
μl	Microlitro
ANOVA	Análise de variância
ASC	<i>Adipose Stromal Cell</i> (Células-Tronco de Origem Adiposa Autóloga Derivada [Estroma])
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epitelial)
EPM	Escola Paulista de Medicina
FC	Fator de Crescimento
<i>g</i>	Força de Gravidade

GC₁	Grupo Uma Centrifugação
GC₂	Grupo Duas Centrifugações
GCt	Grupo Controle
GPC₁	Grupo Piloto Uma Centrifugação
GPC₂	Grupo Piloto Duas Centrifugações
GPCt	Grupo Piloto Controle
kg	Quilograma
min	Minuto
ml	Mililitro
N	Newton
n	Número amostral
<i>PDGF</i>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRFC	Plasma Rico em Fatores de Crescimento
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
r	Raio

<i>RCF</i>	<i>Relative Centrifugal Force</i> (Força Centrífuga Relativa)
rpm	Rotações por minuto
<i>t</i>	Tempo
<i>TGF</i>	<i>Transforming Growth Factor</i> (Fator Transformador de Crescimento)
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
<i>WBC</i>	<i>White Blood Cell</i> (Leucócito)
β	Beta

RESUMO

RESUMO

INTRODUÇÃO: O plasma rico em plaquetas (PRP) é a concentração autóloga de plaquetas em pequeno volume de plasma, obtido por centrifugação do sangue total com anticoagulante, sendo considerada importante fonte de fatores de crescimento (FC). A sua utilização enfatiza a regeneração tecidual. **OBJETIVO:** Obter o plasma rico em plaquetas (PRP) por meio de centrífuga de bancada. **MÉTODOS:** Foram coletos 40ml de sangue total de oito voluntários, para 72 testes, divididos em três grupos (grupos controle, de uma centrifugação, e de duas centrifugações), com variação da força de centrifugação em 200, 400 e 800g. **RESULTADOS:** Verificou-se que a concentração, no Grupo Duas Centrifugações, apresentou média inferior ao mensurado no Grupo Controle. O Grupo Uma Centrifugação, com a força centrífuga relativa de 200g, apresentou os maiores valores de contagem (417.750/ μ l), bem como as maiores concentrações de plaquetas (99,03%), que equivaleu a 1,99 vezes o aumento no número das plaquetas do GCt, enquanto que forças de centrifugação superiores foram insuficientes para o enriquecimento. **CONCLUSÃO:** Obteve-se o plasma rico em plaquetas (PRP), a partir de centrífuga de bancada, com maior concentração na força de 200g.

PALAVRAS-CHAVE: 1. Plasma rico em plaquetas; 2. Engenharia tecidual; 3. Cola de fibrina; 4. Cicatrização; 5. Centrifugação; 6. Plaquetas.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é a concentração autóloga de plaquetas em pequeno volume de plasma, obtido por centrifugação do sangue total, sendo considerada importante fonte de fatores de crescimento (FC). A sua utilização tem chamado a atenção na cirurgia plástica e em outras áreas da saúde, especialmente na regeneração tecidual, por tornar a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de retalhos e enxertos, sejam ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de células de gordura (MAN, PLOSKER, WINLAND-BROWN, 2001; EPPLEY, WOODSELL, HIGGINS, 2004; VENDRAMIN et al., 2006; SERRA RENOM et al., 2006; UEBEL et al., 2006, ALMEIDA et al., 2008; CERVELLI et al., 2009; POR et al., 2009a; CERVELLI & GENTILE, 2009).

As plaquetas atuam no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e re-epitelização, liberando diversos FC. Pelo menos sete diferentes FC foram identificados atuando na fase inicial da cicatrização (ANTONIADES & WILLIAMS, 1983; ROBSON, 1997; MARX et al., 1998; ANITUA, 2001):

- Três isômeros do Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor - PDGF*) \Rightarrow *PDGF $\alpha\alpha$* , *PDGF $\beta\beta$* , *PDGF $\alpha\beta$* .
- Dois Fatores Transformadores de Crescimento (*Transforming Growth Factor - TGF*) \Rightarrow *TGF β 1*, *TGF β 2*.
- Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF*).
- Fator de Crescimento Epitelial (*Epidermal Growth Factor - EGF*).

No início do processo de cicatrização, a liberação dos FC, pelos grânulos- α das plaquetas, possui um aspecto importante no controle e na

proliferação das células mesenquimais, incluindo-se os fibroblastos. O PRP é ativado pela adição de íons de cálcio, com a liberação dos FC e a exocitose dos grânulos- α , transformando o fibrinogênio em fibrina. Por meio desse processo, obtém-se, também, a cola de fibrina autóloga, denominada também de gel de plaquetas ou gel de PRP (GREEN & KLINK, 1998; KEVY & JACOBSON, 2004; EPPLEY, WOODDELL, HIGGINS, 2004). A apresentação do PRP em forma de gel facilita sua aplicação e manuseio em diversas áreas cirúrgicas, favorecendo a integração de retalhos e enxertos, sejam ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura. A utilização resulta em cicatrização mais rápida e eficiente, pelo efeito da aderência do gel, que é proporcional ao fibrinogênio presente (MAN, PLOSKER, WINLAND-BROWN, 2001; VENDRAMIN et al., 2006; SERRA RENOM et al., 2006; UEBEL et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008; POR et al., 2009a), embora estudos mostrem resultados adversos (POR et al., 2009b; AGHALOO, MOY, FREYMILLER, 2002).

A obtenção do PRP autólogo e sua aplicação em cirurgias era realizada por máquinas de autotransusão para a separação celular do sangue, cuja coleta era feita por meio de um cateter venoso profundo, colocado no paciente durante a cirurgia. Eram necessários 400 a 450ml de sangue e um técnico especializado para operar essas máquinas, o que limitava a obtenção do PRP a um centro cirúrgico de grande porte, representando maior morbidade para o paciente (MARX et al., 1998; MARX, 2000). A intenção de simplificar o método culminou no desenvolvimento de novos protocolos, com o emprego de aparelhos mais simples, menor custo e utilização de centrífugas de bancada. Assim, por meio de uma punção venosa periférica de 50 a 60ml de sangue, conseguiu-se obter em torno de 7 a 10ml de PRP. Com o aumento na concentração de plaquetas

em relação à amostra de sangue da coleta inicial. Esses resultados foram semelhantes às concentrações obtidas pelos métodos automatizados, que eram até quatro vezes superiores às amostras iniciais do sangue dos pacientes (LANDESBERG, ROY, GLICKMAN, 2000; PLOSKER, WINLAND-BROWN, 2001; MUÑOZ et al., 2003; MARX, 2004; MARLOVITS et al., 2004; ROSSI & SOUZA FILHO, 2004).

O PRP é obtido pela centrifugação do sangue autólogo, e não do homólogo que não libera os FC bioativos (MARX, 2004). Na obtenção do PRP, não há diferença em relação ao gênero e à idade (WEIBRICH et al., 2002); e as concentrações de plaquetas, obtidas do sangue venoso periférico e da medula óssea, são semelhantes (NISHIMOTO, OYAMA, MATSUDA, 2007), já o anticoagulante utilizado no tubo de coleta altera a integridade e a qualidade das plaquetas (MARX, 2001; GONSHOR, 2002; NISHIOKA et al., 2002).

A diferença de densidade por meio de centrifugação do sangue total, faz com que as células vermelhas precipitem na parte inferior, enquanto que o PRP permanece na parte intermediária e o plasma pobre em plaquetas (PPP) na parte superior. Entre a camada inferior de células vermelhas e a intermediária de PRP, há uma pequena zona denominada névoa, rica em leucócitos e plaquetas maiores REEDER et al. (1993). Quando se utiliza a metade inferior do plasma sobrenadante ou o seu terço inferior, como PRP, apresenta-se diferença na concentração final de plaquetas, sendo maior o enriquecimento quando se utiliza o $\frac{1}{3}$ inferior (EFEOGLU, AKÇAY, ERTÜRK, 2004; MARX, 2004).

A força centrífuga relativa (do inglês, *Relative Centrifugal Force - RCF*), também chamada de força *g*, excessiva pode interferir na qualidade e

integridade das plaquetas e na quantidade desproporcional de liberação de seus FC, produzindo um efeito, às vezes inibitório, de um determinado FC sobre outro (ZIMMERMANN et al., 2001; SOMMA et al., 2002; UEBEL et al., 2006; SÁEZ-TORRES BARROSO, CALVO BENITO, GAYÀ PUIG, 2007). A quantidade mínima dos FC *PDGF* e *TGF-β*, presentes no PPP, indica que quase todos os FC presentes no PRP são derivados das plaquetas (LANDESBURG, ROY, GLICKMAN, 2000; EPPLEY, PIETRZAK, BLANTON, 2006).

Existem vários sistemas de preparação de PRP disponíveis, por meio de centrífugas de bancada, embora estudos pré-clínicos e clínicos apresentem resultados contraditórios (AGHALOO, MOY, FREYMILLER, 2002; POR et al., 2009b). Há uma lacuna de estudos mais sistemáticos e consistentes sobre o assunto (REEDER et al., 1993; MARX, 2004; EFEOGLU, AKÇAY, ERTÜRK, 2004; SERRA RENOM et al., 2006; EVERTS et al., 2006; EPPLEY, PIETRZAK, BLANTON, 2006), o que faz com que a preparação do PRP permaneça, ainda, um procedimento experimental, apesar de sua promissora aplicação na regeneração tecidual.

As limitações das metodologias empregadas na literatura pesquisada, para a determinação da regulagem de aceleração da centrífuga, impossibilitam a reprodutibilidade dos experimentos, considerando-se a falta de clareza relativamente a *RCF* e de seu raio (*r*), associado às rotações por minuto (*rpm*). A somatória destes fatores caracterizou o principal estímulo para a realização deste estudo, cujo objetivo foi o de obter o PRP por meio de centrífuga de bancada.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Obter o plasma rico em plaquetas (PRP) por meio de centrifuga de bancada.

LITERATURA

3. LITERATURA

3.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

REEDER et al. (1993), salientou que a diferença de densidade entre os componentes no sangue total centrifugado precipitaram as células vermelhas para a parte inferior, com o PRP na parte intermediária e o PPP na parte superior. Entre a camada inferior de células vermelhas e a intermediária de PRP, havia uma pequena zona denominada névoa, rica em leucócitos e plaquetas maiores.

Em 1998, MARX relatou uma contagem prévia de plaquetas no sangue total em 88 pacientes, com media de 232.000/ μ l com variações de 110.000 a 523.000/ μ l. A contagem media do PRP foi de 785.000/ μ l, com variações de 595.000 a 1.100.000/ μ l. Esses valores confirmaram a quantificação de concentração em 338%, quando comparada à contagem de plaquetas no sangue não centrifugado.

Para MARX (2000), o verdadeiro PRP representa 20% da fração do plasma, recomendando aguardar-se o volume aproximado de dez por cento de PRP, sobre o sangue total coletado, com a recomendação de utilizar-se o $\frac{1}{3}$ inferior do sobrenadante como PRP.

3.2 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

TAYAPONGSAK et al. (1994) em estudo com fibrina autóloga envolvendo partes ósseas (enxertos), denominado o procedimento de rede de fibrina autóloga, identificaram consolidações ósseas mais rápidas em 33 pacientes durante as reconstruções de continuidade da mandíbula, atribuindo-as aos componentes celulares dessa rede de fibrina autóloga.

MARX (1998) mostrou evidências do enriquecimento de plaquetas pela obtenção do PRP associado aos enxertos ósseos, e que facilitava a regeneração óssea de maneira precoce e segura. O PRP era obtido por meio de aparelhos de plasmaforese (*electro medics 500*, um separador celular por gradiente de densidade - Medtronic[®]). A obtenção do PRP por esse aparelho necessitou de 400 a 500ml de sangue total, colhidos por meio de cateter venoso central. A contagem prévia das plaquetas no sangue total era, em média, de 232.000/ μ l com variações de 110.000 a 523.000/ μ l. E o PRP obtido teve contagens médias de plaquetas de 785.000/ μ l, com variações de 595.000 a 1.100.000/ μ l, obtendo-se um enriquecimento aproximado de plaqueta de 338%, comparado à contagem prévia ao preparo do PRP, no sangue total.

ANITUA (1999), por meio de estudo randomizado e comparativo com grupo controle, com dez pacientes submetidos a enxertos ósseos autólogos, em tratamento odontológico, observou a completa regeneração em 100% dos casos tratados. Ao mostrar estudos preliminares, denominou o plasma rico em fatores de crescimento (PRFC), de origem autóloga. O PRFC foi

obtido com a força de 160g por cinco minutos, na temperatura ambiente, e considerou como PRFC pouco mais que $\frac{1}{2}$ inferior do plasma sobrenadante, e adicionou 50 microlitros de cloreto de cálcio a dez por cento, por 1,2ml de PRFC obtido, formando-se o gel de PRFC após 15 a 20 minutos, preconizando o tempo de utilização após a formação do gel de PRFC, para o preenchimento do defeito em cinco a dez minutos.

LANDESBERG, ROY, GLICKMAN (2000), utilizando centrífugas de laboratório e técnica com tubos, por meio de punção venosa periférica, obtiveram o PRP, estabelecendo um protocolo após analisar diferentes forças g e tempo de centrifugação t na obtenção do PRP. Observaram que a força de 200g, com o tempo de centrifugação de dez minutos, foi suficiente para o enriquecimento no número de plaquetas em 229% na primeira centrifugação, e de 205% após a segunda centrifugação. Concluíram que tempos menores ou iguais a cinco minutos falharam em obter qualquer enriquecimento de plaquetas, e que forças superiores a 250g resultaram em “*platelet pellet*” que não pôde ser ressuspenso. Porém, sugeriram a possibilidade em obter-se o PRP com a utilização de centrífugas de bancada, menores e mais baratas, pela força baixa e o tempo reduzido no preparo do PRP. E, ao observar a quantidade mínima dos FC *PDGF* e *TGF- β* , presentes no PPP, indicaram que quase todos os FC, presentes no PRP, seriam derivados das plaquetas.

MARX (2000) relatou a existência de algumas centrífugas de bancada que utilizavam tecnologias de centrifugações semelhantes às das máquinas de plasmaforese (*Smart Prep - Harvest Technologies, Norwell-MA; The Plasma Seal - Plasma Seal, San Francisco-CA; Platelet Concentrator -*

Implant Innovations Inc., West Palm Beach-FL), sugerindo que era possível obter-se um enriquecimento no número de plaquetas satisfatório, com a fração do terço inferior, com contagem de plaquetas próxima a um milhão/ μ l, sendo o citrato de sódio a 3,2% o anticoagulante ideal, por preservar a estrutura das plaquetas.

ZIMMERMANN et al. (2001) analisou os PRP obtidos do sangue de 15 voluntários, utilizando como método de preparo a plasmaforese, e o preparo pelo método de tubos com dupla centrifugação, sendo a primeira a 1650g por dez minutos e, após coleta do sobrenadante, uma nova centrifugação a 730g por mais dez minutos. Observou o enriquecimento de 525% obtido pela plasmaforese e de 411% no método de tubos. A contaminação (leucócitos, *White Blood Cell - WBC*) no método de tubos foi maior, com uma elevada ativação das plaquetas, comparada ao PRP obtido com a plasmaforese. Concluíram que aceitar que o enriquecimento de plaquetas indica o aumento no nível dos FC nos componentes das plaquetas é incorreto, por haver dois outros fatores influenciando a liberação final dos FC: a ativação das plaquetas e a contaminação por leucócitos. Enfatizaram que se as plaquetas forem ativadas antes do final do processo de centrifugação e obtenção do PRP, os FC podem ser perdidos no sobrenadante.

WEIBRICH & KLIES (2002) comparando a obtenção do PRP em centrífugas diferentes observaram a ineficiência de algumas centrífugas em obter o mesmo enriquecimento e preservação da integridade das plaquetas.

OKUDA et al. (2003) utilizaram dupla centrifugação (centrífuga de bancada), sendo a primeira a 2400 rotações por minuto (rpm) por dez

minutos, com coleta e nova centrifugação do sobrenadante a 3600rpm, obtendo-se um enriquecimento plaquetário de 283,4%, concluindo-se que a diferença poderia relacionar-se à variação da força g e do tempo de centrifugação t . Analisaram e observaram o enriquecimento dos FC ($PDGF-\alpha\beta$) em 440,6%, e o nível do ($TGF-\beta-1$) em 346,6%, e definiram o PRP como a fração do plasma em que estão concentrados os fatores de crescimento derivados das plaquetas ($PDGF-\alpha\beta$) e os fatores de crescimento transformadores ($TGF-\beta-1$).

ALMOGUERA VILLACAÑAS, ESPINOSA, LÓPEZ-OLIVA MUÑOZ (2003) compararam a obtenção de PRP por plasmaforese e pelo método de tubos, em centrifugas de bancada, afirmando que ambos os aparelhos eram suficientes para enriquecer o número de plaquetas, porém não informaram o percentual obtido do enriquecimento de plaquetas, nem os procedimentos adotados para a realização do estudo (força de centrifugação, aparelho utilizado, origem de sangue, entre outras diretrizes).

EFEUGLU, AKÇAY, ERTÜRK (2004) em estudo com coelhos brancos neozelandeses, modificaram o método de LANDESBERG, ROY, GLICKMAN (2000), aumentando a primeira centrifugação para 300g em dez minutos, com coleta do sobrenadante e centrifugação a 5000g por cinco minutos. Analisaram a metade inferior do plasma sobrenadante e seu terço inferior, comparando os resultados ao enriquecimento no número de plaquetas obtido, e observaram que o terço inferior obteve um enriquecimento de 429%, comparado ao grupo da metade inferior que obteve somente 122%. Também observaram ausência de correlação entre a quantificação no enriquecimento plaquetário e o valor do hematócrito.

HAYNESWORTH et al. (2002) relatou que a proliferação de células tronco mesenquimais adultas (*adult mesenchymal stem cells*), e suas diferenciações, relacionam-se diretamente com a concentração de plaquetas, e que uma resposta celular inicia-se quando a concentração de plaquetas atinge o aumento de quatro a cinco vezes o número de plaquetas no sangue total.

MARX (2004) relatou que a obtenção do PRP era simplificada pela sua obtenção por meio dos métodos em tubos, em centrífugas de bancadas, podendo ser facilmente utilizadas em consultórios e em ambientes cirúrgicos. Entretanto, enfatizou que para o processo de centrifugação, além de ser estéril, era necessária a precisão na separação das plaquetas das células vermelhas do sangue total, e que nesse enriquecimento deveria evitar-se o dano às plaquetas, evitando-se sua ativação e respectiva interferência na liberação de seus FC. Concluiu que nem todos os aparelhos utilizados na obtenção do PRP eram iguais, considerando-se que alguns poderiam não proceder a concentração de plaquetas íntegras e viáveis em número suficiente para interferir na cicatrização e regeneração tecidual. Definiu como PRP verdadeiro, ou padrão, aquele com contagem de plaquetas próximo a um milhão/ μl e que poucas máquinas estudadas conseguem, de forma consistente, esses níveis terapêuticos de concentração de plaquetas e, conseqüentemente, de liberação de seus FC.

VENDRAMIN et al. (2006), ao estabelecer um método barato e, segundo o autor, eficaz na obtenção do PRP a ser utilizado em cirurgia plástica, por meio do estudo de várias forças g e tempo de centrifugação t, observou que a força de 300g aplicada na primeira centrifugação, por dez minutos,

promoveu o enriquecimento de plaquetas, cujos resultados indicaram percentuais de 454% na metade inferior do plasma sobrenadante, na primeira centrifugação e que, após coleta do sobrenadante e segunda centrifugação produziu aumento do enriquecimento em 496%, com força de 640g, comparado com a dosagem das plaquetas no sangue total.

SÁEZ-TORRES BARROSO, CALVO BENITO, GAYÀ PUIG (2007) ao analisar a qualidade obtida do concentrado de plaquetas pela técnica de dupla centrifugação em tubos. Com 50ml de sangue procedeu-se a primeira centrifugação a 200g por dez minutos, e a segunda centrifugação, após a coleta do plasma sobrenadante, a 700g por 15 minutos, observaram o enriquecimento plaquetário do terço inferior do plasma, de $364 \pm 177\%$ (n=45). Por meio de citometria de fluxo, pela expressão de CD-62 analisaram a percentagem de plaquetas ativadas (n=8), com 2,7% de plaquetas ativadas na análise do sangue sem centrifugação, e de 3,6% das plaquetas ativadas após segunda centrifugação. Também observaram a ativação das plaquetas após o estímulo com a trombina bovina, associada à íons de cálcio, que foi de 96,2%. Concluíram que o método empregado não produziu ativação significativa das plaquetas no enriquecimento plaquetário, e que a resposta ao estímulo das plaquetas com a trombina indicou bom estado de conservação da integridade das plaquetas.

LEI, GUI, XIAO (2009) investigaram o efeito dos anticoagulantes na qualidade do PRP para determinar o mais apropriado na obtenção do PRP. Concluíram haver relação direta com o tipo de anticoagulante utilizado, sendo o citrato de sódio a 3,2% o mais apropriado por preservar a morfologia das plaquetas.

VENDRAMIN, FRANCO, FRANCO (2009) estabeleceram um método barato de preparação do gel de PRP para utilização em cirurgia plástica. Em seu estudo, o PRP de melhor qualidade foi obtido por meio de duas centrifugações, sendo a primeira a 400g por dez minutos e a segunda a 800g também por dez minutos, com uma redução plasmática que manteve apenas dez por cento, proporcional ao volume do sangue total utilizado no seu preparo. Obtiveram, assim, concentrações plaquetárias de aproximadamente 570% superiores ao do sangue do paciente. Afirmaram que o propósito não foi o de estudar o aumento da concentração de FC no PRP, uma vez que já foram realizados estudos anteriores comprovando esse aumento, cujos resultados indicaram proporcionalidade ao aumento da concentração de plaquetas. O sangue foi proveniente de bolsas de baixo peso (menor que 300 gramas), que seriam desprezadas por serem legalmente proibidas para transfusões. A centrífuga utilizada na preparação do PRP e da trombina autóloga foi a BR 4i[®] (Jouan), com raio de 16,1cm. A qualidade do PRP obtido em cada teste foi avaliada por contagem automática de plaquetas, com auxílio do aparelho *Cell-Dyn 3200[®]* (Abbott Diagnostics). Concluíram que uma alta concentração de plaquetas poderia ser obtida por esse protocolo de obtenção do PRP.

3.3 UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP): APLICAÇÃO CLÍNICA E EXPERIMENTAL

AGHALOO, MOY, FREYMILLER (2002), ao estudar os efeitos do PRP na regeneração óssea, concluíram não haver aumento significativo pela adição do PRP. Entretanto, ocorreram tendências histológicas, no aumento da formação óssea. Nesse estudo, o método utilizado foi o de duas centrifugações, com a *RCF* em 215g por dez minutos na primeira, e em 863g na segunda centrifugação, com redução do PRP em 10 a 15% do sangue total coletado.

LIU et al. (2002), ao estudar a influência do PRP, na proliferação de fibroblastos em cultura de células, expostas às plaquetas pré-incubadas em diferentes potenciais hidrogeniônicos (pHs) (5.0, 7.1, 7.6). Observou que plaquetas pré-incubadas em meio ácido (pH 5.0) induziu à elevada proliferação de fibroblastos, e à concentração de *PDGF* que, em diferentes amostras, apresentou aumento, particularmente, nos de pH (5.0). A concentração do *TGF-β*, entretanto, foi baixa após a incubação em pH 5.0, comparada ao pH 7.1 ou 7.6. Concluiu que essas observações poderiam ser relevantes no processo normal de cicatrização *in vivo*, e útil ao tratamento de feridas e em processos de cicatrização lenta, uma vez que os FC, liberados por meio dos grânulos α , possuem impacto importante na regulação e proliferação de células mesenquimais, incluindo-se os fibroblastos, durante o processo de cicatrização.

UEBEL et al. (2006) utilizaram o PRP (gel) em transplante capilar e concluíram que houve aumento na densidade folicular de 15,1% na área que recebeu os FC, juntamente com os enxertos, em comparação com o grupo controle, nos quais os enxertos haviam sido conservados com soro fisiológico a 0,9%.

SERRA RENOM et al. (2006) associaram o PRP aos enxertos de gordura na face em trinta e seis pacientes, porém referiram somente a velocidade empregada na centrífuga para a obtenção do PRP, que foi de 1800rpm por oito minutos, em uma única centrifugação, utilizando como PRP o terço inferior do plasma sobrenadante. Concluíram que o uso do PRP, associado aos enxertos de gordura autólogos nos preenchimentos faciais, poderia ser de grande utilidade, isolados ou associados à ritidoplastia, com a obtenção de menor índice de reabsorção da gordura implantada, bem como melhora da textura da pele e da qualidade da pele tratada.

ALMEIDA et al. (2008) associaram o PRP aos enxertos de face, em quatro pacientes referindo a velocidade da centrífuga de 1800rpm por oito minutos, em uma única centrifugação, utilizando como PRP a metade inferior do plasma sobrenadante. Apresentaram análise qualitativa de casos clínicos que evidenciaram melhor integração da enxertia adiposa nos preenchimentos faciais quando do uso do PRP, e melhor adaptação dos retalhos de ritidoplastia com o uso concomitante do PPP. Concluíram que os achados clínicos foram concordantes com a literatura internacional e incentivaram a prosseguir no desenvolvimento de técnicas cada vez mais apuradas e seguras no tratamento dos pacientes.

MARTÍNEZ-ZAPATA et al. (2009), em revisão sistemática sobre a utilização do PRP na regeneração tecidual, observou que existem vários trabalhos randomizados sobre o tema, e que não havia diferença significativa em comparações da utilização do PRP na regeneração tecidual com o grupo controle, devido às limitações das metodologias empregadas. Concluiu que havia necessidade de trabalhos futuros randomizados para determinar, com clareza, a eficácia e função do PRP para a regeneração tecidual, e sua preparação (obtenção).

KAZAKOS et al. (2009) realizaram estudos para saber a eficácia do gel de PRP no tratamento de feridas de extremidades, em trauma agudo. Estudo randomizado com 59 pacientes com fraturas abertas, fechadas e com necrose de pele e com queimaduras por abrasão, divididos em dois grupos. Grupo A (32 pacientes) tratados com curativos convencionais e grupo B (27 pacientes) tratados com aplicação local de gel de PRP. Concluindo que o tratamento com gel de plaquetas pode ser um valioso e efetivo auxílio no tratamento de lesões traumáticas agudas.

PALLUA, WOLTER, MARKOWICZ (2010) em revisão da literatura sobre a eficácia do PRP em pacientes queimados, concluiu haver poucos estudos sobre o assunto, e que seu valor não está claro, e que necessitava de estudos consistentes, e que teoricamente seus efeitos possam ser benéficos, entretanto a interação entre a reparação tecidual e a regeneração deva ser melhor compreendida.

KAKUDO et al. (2008), ao avaliar as alterações sobre, o potencial de proliferação do PRP ativado e do PPP sobre as células tronco derivadas de gordura humana (*human adipose-derived stem cells*), concluíram que o

PRP poderia contribuir com a proliferação de células tronco derivadas de gordura humana e dos fibroblastos dérmicos humanos (*Human dermal fibroblasts*), e que suas observações fortaleciam a possibilidade de aplicação clínica do PRP para cultura de células (*cell-based*), engenharia tecidual e cicatrização de feridas.

MISHRA, WOODALL, VIEIRA (2009), em revisão de literatura sobre os efeitos do PRP no tratamento de lesões de tendão e de músculos, concluiu que o PRP poderia ser promissor, embora não esteja comprovada, ainda, sua eficácia como tratamento de escolha para as lesões de tendão e de músculo. Estudos em animais têm sido desenvolvidos para entender o mecanismo pelo qual o PRP afeta a restauração dos tecidos. A característica autóloga do PRP torna-o seguro. Concluindo que, provavelmente, seria eficiente em atletas de elite e de recreação, bem como que estudos sistemáticos, bem definidos, randomizados, e prospectivos eram necessários para melhor compreensão do seu mecanismo de atuação em como, quando e em que situação utilizar o PRP de uma maneira mais eficaz.

POR et al. (2009a), em estudo de metanálise para determinar a eficácia da cola de fibrina e do gel de plaquetas na redução da drenagem pós-operatória, equimose e edema, na cirurgia do *face-lift*, observaram que a cola de fibrina preparada comercialmente continha concentração de fibrinogênio superior ao PRP, teoricamente, com melhor efeito de adesão. Porém, a propriedade autóloga do PRP, e seus FC, poderiam interferir na cicatrização. Consideraram que tanto a cola de fibrina como o PRP possuíam efeito de “selantes de tecidos”, concluindo que a metanálise não

apresentou benefício estatístico relativamente ao seu uso na cirurgia do *face-lift*, mas que, no entanto, poderiam ser úteis para pacientes com risco elevado de hematoma e equimose.

CERVELLI & GENTILE (2009) mostraram a aplicabilidade do PRP na cirurgia plástica com avaliação clínica, bem como a eficácia clínica da combinação de tratamentos com o PRP *in vitro*, que foram confirmados pela qualidade dos resultados e pela satisfação dos pacientes. Utilizaram o PRP (obtido com força centrífuga de 1100g correspondente a 3000rpm), associado ao enxerto de gordura na região da face, na proporção de 1ml de PRP para 2ml de gordura, referindo a manutenção dos resultados a partir do terceiro mês em 70% (n=25), comparado ao grupo controle, principalmente naqueles pacientes com manutenção superior a um ano, que foi e 31% (n=10). Concluíram, em seus estudos clínicos *in vitro*, uma aceleração da re-epitelização das úlceras de pele crônicas em pacientes submetidos à cirurgia plástica reparadora, e aumento na manutenção e função dos enxertos de gordura nesses pacientes, possivelmente pela estimulação da proliferação de células-tronco de origem adiposa (*Adipose Stromal Cell* - ASC).

CERVELLI et al. (2009), por meio de casos clínicos, sugeriu um plano terapêutico — envolvendo o gel de plaquetas com o tecido gorduroso centrifugado e obtido pela técnica de Coleman, para restaurar a densidade superficial dos tecidos — formado por dois tratamentos sequenciais: obtenção do gel de plaquetas de um pequeno volume de sangue (9 a 18ml). Utilizou o PRP, associado ao enxerto de gordura no tratamento de úlceras de extremidades inferiores (n=20), obtido por centrifugação a 1100g por dez minutos, com kit próprio para obtenção do PRP (Cascade Kit),

observou que 80% re-epitelizaram em 9,7 semanas, comparado a 55% dos pacientes tratados à base de colágeno e ácido hialurônico. O resultado final comprovou a eficácia da combinação desses dois tratamentos, com a confirmação da satisfação dos pacientes pela qualidade dos resultados.

POR et al. (2009b), ao estudar a influência do PRP, pela presença dos FC, no enxerto de gordura em pesquisa de animais (*nude mouse*) adicionado 20% de PRP ao enxerto de gordura, concluíram que não houve interferência na integração dos enxertos de gordura, comparado ao grupo controle. Nesse estudo não mencionaram o método de obtenção do PRP. Todavia, concordaram que pode ter ocorrido falha na metodologia aplicada na obtenção do PRP.

3.4 FORÇA CENTRÍFUGA RELATIVA (*RCF*)

De acordo com normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, e Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (ANDRIOLO et al., 2010), *RCF* corresponde à força centrífuga relativa e, também, à denominada força *g*, e refere-se à regulagem de aceleração da centrífuga, expressa em rpm.

Para a transformação do *g* em rpm, ou vice-versa, deve-se conhecer o raio da centrífuga usada pelo laboratório, conforme a seguinte equação:

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{\text{RCF} \times 10^5}{1,12 \times r}}$$

Em que “*r*”, expressa-se em cm, que corresponde à distância radial do centro do rotor da centrífuga à base da caçapa (raio).

MÉTODOS

4. MÉTODOS

Trata-se de estudo primário, prospectivo, randomizado, controlado e comparativo, realizado em centro único.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob o protocolo CEP.0059/10 (APÊNDICE 1).

Foi realizado um Projeto Piloto (APÊNDICE 5) para se verificar a reprodutibilidade do estudo, sobre a *RCF* com o tempo de centrifugação (*t*) em dez minutos, para a obtenção do PRP, fortalecendo o método adotado.

Deste momento em diante, neste estudo, definiu-se as siglas *g* como a unidade da *RCF* e *t* como a duração do tempo de centrifugação, em concordância com

- Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso, por ser o órgão máximo, que normatiza os procedimentos laboratoriais na área médica, muito embora, segundo o Sistema Internacional de Unidades (SI), a sigla N^1 defina força.

¹ Grandeza = força; Nome = newton; Plural = newtons; Símbolo = N, adotada, também, pelo Brasil em 1962, e ratificado pela Resolução nº 12 de 1988 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO), tornando-se de uso obrigatório em todo o Território Nacional.

4.1 CASUÍSTICA E AMOSTRA

4.1.1 CASUÍSTICA

A casuística foi composta por oito voluntários, quatro do gênero feminino e quatro do gênero masculino, com idade entre 28 a 64 anos, oriundos dos ambulatórios de Cirurgia Plástica do Hospital São Paulo, que tem como Titular do Serviço a Professora Doutora Lydia Masako Ferreira.

Os voluntários foram submetidos à coleta de amostras de sangue, objeto deste estudo, no Hemocentro da UNIFESP e analisadas no Laboratório Central da UNIFESP.

Todos os voluntários que participaram do estudo, após compreensão dos procedimentos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 2).

Os critérios adotados consideraram gênero, idade, peso, uso de anticoagulante e patologias agudas e infectocontagiosas. Não houve dimorfismo sexual ou interferências relativamente à faixa etária da casuística. Estes critérios obedeceram à legislação vigente, conforme Resolução - RDC n° 153, de 14 de junho de 2004.

Os critérios adotados para a seleção dos voluntários consideraram:

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Ambos os sexos.
- Idade superior a 18 anos.
- Peso acima de 55kg.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Doenças agudas.
- Doenças infectocontagiosas.
- Em uso de anticoagulantes.
- Perda acima de dez por cento do peso, nos últimos três meses.

4.1.2 AMOSTRA

De cada voluntário foram coletados nove tubos de sangue (40ml), que foram subdivididos em Grupo 1, em que foi realizada uma única centrifugação (GC₁), o Grupo 2 de duas centrifugações (GC₂), e o Grupo Controle (GCt).

Destes nove tubos, os dois últimos compuseram o Grupo Controle (GCt), que não foram submetidos à centrifugação, sendo que no oitavo tubo foi empregado o anticoagulante de citrato e o nono o anticoagulante de ácido etilenodiamino tetra-acético (*Thylenediamine Tetraacetic Acid - EDTA*), conforme o QUADRO 1.

QUADRO 1. Descrição do Grupo Controle (GCt).

GCt	
TUBO 8	TUBO 9
CITRATO	EDTA

Anteriormente à amostra de estudo, foi realizado um Projeto Piloto (APÊNDICE 5) composto por quatro voluntários, dos quais foram extraídos 14 tubos de sangue, que foram igualmente subdivididos em três principais grupos (GPC₁ ⇒ Grupo Piloto de Uma Centrifugação e GPC₂ ⇒ Grupo Piloto de Duas Centrifugações e o Grupo Piloto Controle GPCt).

4.2 PROCEDIMENTOS

Foram coletados 40ml de sangue total de cada um dos oito voluntários da casuística, distribuídos em nove tubos, sorteados previamente, para nove testes de quantificação de plaquetas, cuja composição foi: 4,5ml de sangue e 0,5ml de anticoagulante (QUADRO 2).

QUADRO 2. Distribuição do sangue coletado nos respectivos Grupos Controle, com uma centrifugação (GC₁) e com duas centrifugações (GC₂).

TUBOS 1-8	Citrato de sódio a 3,2%, 4,5ml de sangue e 0,5ml de anticoagulante (<i>BD Vacutainer</i> [®] , <i>Becton, Dickinson and Company-Franklin Lakes, NJ-USA</i>).
TUBO 9	EDTA, com 4ml (<i>BD Vacutainer</i> [®] , <i>BD Franklin Lakes NJ-USA 8019561</i> .)

4.2.1 GRUPO CONTROLE (GCt)

O GCt (Tubos 8 e 9), não foram submetidos à centrifugação (QUADROS 1 e 2). Somente foram encaminhados para contagem de plaquetas no sangue total, com o propósito de realizar-se a comparação do enriquecimento das plaquetas.

4.2.2 GRUPO UMA CENTRIFUGAÇÃO (GC₁)

Com o intuito de verificar-se o enriquecimento das plaquetas na obtenção do PRP, foi constituído o GC₁ (QUADRO 3), que quantificou as plaquetas no terço inferior do sobrenadante em uma única centrifugação, para a determinação da melhor *RCF* no preparo do PRP.

QUADRO 3. Relação Força *g* x Tempo empregado no GC₁ no método A e B.

GC ₁		
Métodos	<i>g</i>	(t/min)
A	200	10
B	400	10

4.2.3 GRUPO DUAS CENTRIFUGAÇÕES (GC₂)

O GC₂ (QUADRO 4), no qual foram realizadas duas centrifugações, foi composto por cinco métodos foram aplicadas variações da *RCF* equivalentes a 200, 400 e 800g, com *t* de dez minutos. Neste Grupo, após a primeira centrifugação todo o sobrenadante foi coletado, por pipetas plásticas e transferido para o tubo de polipropileno sem anticoagulante e submetido à segunda centrifugação, quantificando as plaquetas no terço inferior do sobrenadante, para a determinação do melhor *RCF* no preparo do PRP.

QUADRO 4. Relação Força x Tempo empregado no GC₂, nos métodos 1, 2, 3, 4 e 5.

GC ₂			
Métodos	g		(t/min)
	1 ^a	2 ^a	
1	200	200	10
2	200	400	10
3	200	800	10
4	400	400	10
5	400	800	10

4.2.4 TÉCNICAS DE COLETA E CENTRIFUGAÇÃO

As técnicas de coleta e de centrifugação seguiram as normas do *CLSI* (ERNST et al., 2010), que normatiza procedimentos laboratoriais, a força *g* e o tempo de centrifugação para obtenção do PRP.

As coletas dos oito voluntários foram executadas por um único técnico, no Hemocentro do Hospital São Paulo da UNIFESP, conforme recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso (ANDRIOLO et al., 2010).

A punção venosa foi efetuada na fossa antecubital, na área anterior do braço em frente e abaixo do cotovelo, usando tubos a vácuo, contendo citrato de sódio 3,2% (na proporção de uma parte de anticoagulante em nove partes de sangue total), com o menor tempo possível de garroteamento e trauma durante o procedimento (FIGURA 1).



FIGURA 1. Punção venosa na fossa antecubital, na área anterior do braço.

Após a coleta, o sangue total foi homogeneizado por meio de inversão do tubo (cerca de cinco a oito vezes).

Dentre as nove coletas, primeiramente foram colhidas a sequência de oito tubos de citrato, sendo o nono tubo, o de *EDTA*. Para a contagem plaquetária em sangue total foram submetidos o oitavo tubo de citrato, bem como o nono de *EDTA*. Os demais sete tubos de citrato foram submetidos à centrifugação para contagem das plaquetas, no terço inferior do sobrenadante.

A centrífuga utilizada foi a *Eppendorf AG*[®] 5804 R - 22331 (*Hamburg, Germany*), refrigerada, com raio de 16,1cm (FIGURA 2).



FIGURA 2. Centrífuga *Eppendorf AG*[®] 5804 R.

O funcionamento da centrífuga não foi interrompido para a retirada dos tubos, considerando que o seu freio não foi empregado; aguardou-se que se cessasse o seu funcionamento completamente com o intuito de evitar-se a hemólise. As configurações das forças centrífugas relativas (*RCF*) corresponderam à regulação da aceleração da centrífuga (rpm) conforme o QUADRO 5.

QUADRO 5. Relação da aceleração da centrífuga (rpm) e a força relativa de centrifugação (*RCF*) correspondente.

Força (<i>RCF</i>)	rpm
100 g	741
150 g	913
200 g	1054
300 g	1291
400 g	1491
500 g	1666
700 g	1972
800 g	2108
1100 g	2472

Durante o procedimento de centrifugação, os tubos foram dispostos no porta tubos (cor laranja), de maneira equilibrada. Esta cautela foi adotada para se evitar pesos desiguais na distribuição dos tubos durante a

centrifugação, garantindo, assim, ausência de desbalanceamento, mantendo a *RCF* constante (FIGURA 3).



FIGURA 3. Centrífuga carregada com tubos (notar a distribuição).

Após a coleta, os tubos de citrato foram rapidamente centrifugados à temperatura ambiente, a fim de obter-se o PRP, com a velocidade da centrífuga em rpm, de acordo com a força *g* estabelecida. A verificação de calibração da centrífuga (ANEXO 1), pelo fabricante, antecedeu a coleta.

As centrifugações foram igualmente realizadas por um único técnico bioquímico, também no Hemocentro do Hospital São Paulo da UNIFESP, nos 72 testes de quantificação de plaquetas.

No GC₁, após a primeira centrifugação, os $\frac{2}{3}$ superiores do plasma sobrenadante foram coletados e desprezados, por pipetas plásticas, sendo o $\frac{1}{3}$ inferior diretamente transferido para um tubo de polipropileno, e encaminhado para contagem das plaquetas (FIGURA 4).

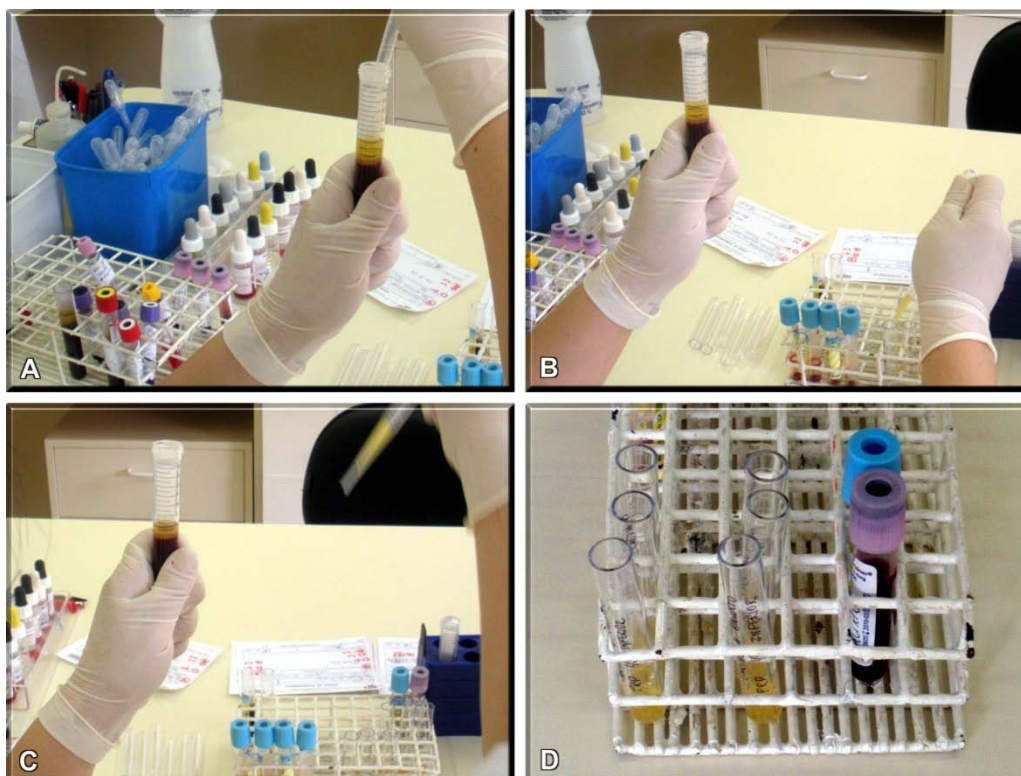


FIGURA 4. Sequência de procedimentos: (A-B) Após a centrifugação do sangue total, os $\frac{2}{3}$ superiores do sobrenadante foram colhidos e desprezados. (C-D) O $\frac{1}{3}$ inferior foi colhido e encaminhado para contagem das plaquetas.

No GC₂, após a primeira centrifugação, todo o plasma sobrenadante foi colhido e acrescido de um mm de células vermelhas, transferido para um novo tubo de polipropileno, por pipetas plásticas, e encaminhado para uma segunda centrifugação, de acordo com o *g* e o *t* estabelecidos (FIGURA 5).

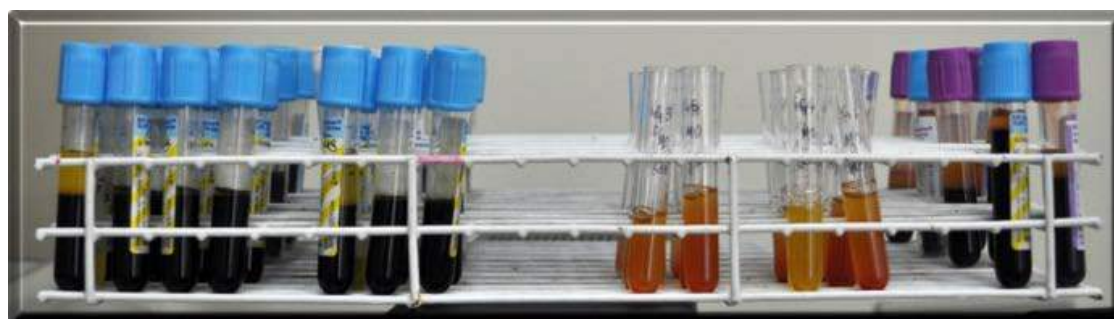


FIGURA 5. Os tubos de citrato após a primeira centrifugação foram transferidos para outros tubos de polipropileno. Os do Grupo Uma Centrifugação (GC₁) foram encaminhados para contagem de plaquetas. Os tubos do Grupo Duas Centrifugações (CG₂) foram submetidos à nova centrifugação.

Após esta segunda centrifugação, os $\frac{2}{3}$ superiores do plasma foram colhidos e desprezados, e o $\frac{1}{3}$ inferior, por pipetas plásticas, com algumas hemácias depositadas ao fundo, foi agitado e encaminhado para contagem das plaquetas (FIGURA 6).

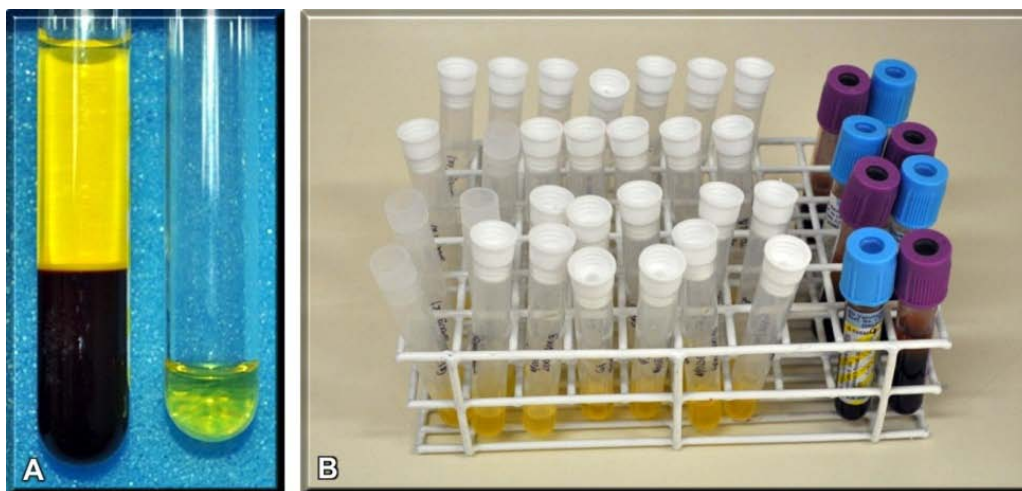


FIGURA 6. Coleta de plasma. (A) Os tubos de citrato, após a primeira centrifugação foram transferidos para outros tubos de polipropileno e encaminhados para contagem de plaquetas. (B) Após a centrifugação do sobrenadante no CG_2 . Os $\frac{2}{3}$ superiores do plasma foram colhidos e desprezados, e o $\frac{1}{3}$ inferior encaminhado para contagem das plaquetas.

4.2.5 CONTAGEM DE PLAQUETAS

A contagem plaquetária de sangue total e do PRP foi realizada no laboratório central do Hospital São Paulo da UNIFESP, em um contador automático adequadamente calibrado pelo fabricante (*Cell-Dyn Ruby*[®] Abbott Diagnostics Divions, 200 Abbott Park Road, Abbot Park, Il. 60064, USA) (ANEXO 1) (FIGURA 7).

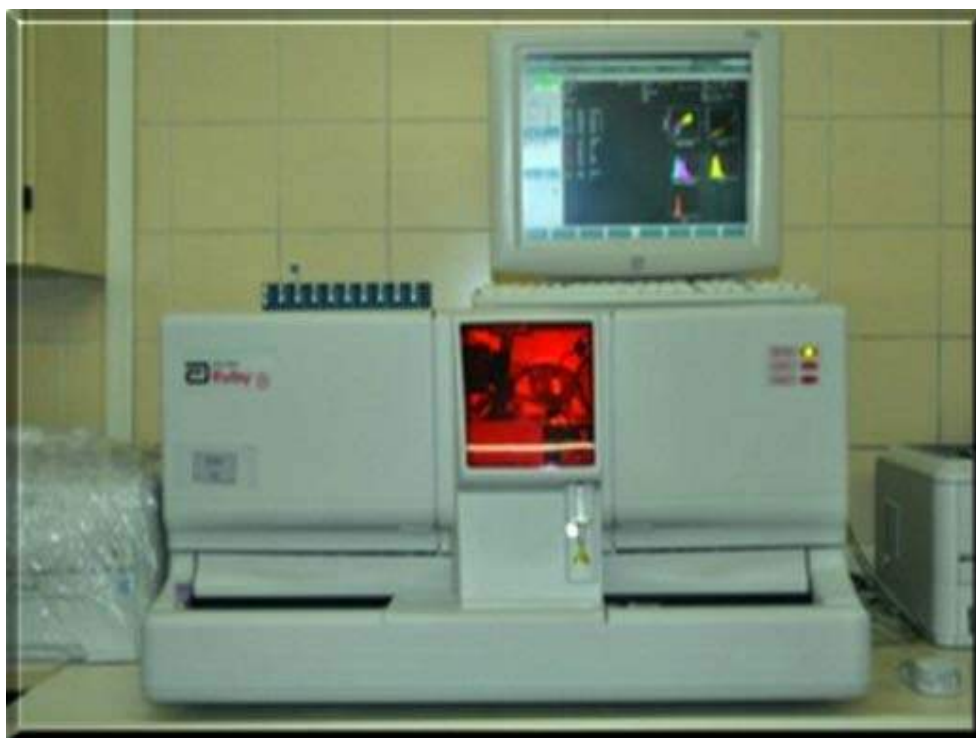


FIGURA 7. Contador automático calibrado pelo fabricante (*Cell-Dyn Ruby[®] Abbott Diagnostics Divisions, 200 Abbott Park Road, Abbot Park, Il. 60064, USA*).

4.3 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Realizou-se Análise de Variância (ANOVA), com medidas repetidas, tanto para a contagem do número de plaquetas como para o grau de concentração, para avaliar se as médias entre os diferentes métodos apresentavam valores estatísticos distintos, bem como se aplicou o teste t de *Student* para amostras pareadas, com a utilização da correção de Bonferroni. Com a finalidade de identificar as diferenças entre os diferentes métodos. Foram feitos, também, testes não paramétricos de Friedman para comparação das médias entre os métodos e de Wilcoxon para detectar as diferenças entre os mesmos.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Tendo em vista que o número de plaquetas pode variar conforme o tipo de anticoagulante utilizado, foram realizadas medições com o emprego do citrato e do *EDTA* (TABELA 1).

TABELA 1. Medidas resumo para o número de plaquetas/ μ l por método e amostra.

Amostra	Método utilizado	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
	Citrato	8	209.125 ^a	215.500	42.208	147.000	286.000
	<i>EDTA</i>	8	231.375 ^a	221.500	45.579	175.000	314.000
	A	8	417.750 ^b	446.000	116.350	258.000	571.000
	B	8	266.125 ^a	243.500	113.280	120.000	429.000
Estudo	1	8	218.675 ^a	213.000	99.875	80.400	431.000
	2	8	127.600 ^c	132.500	62.143	45.900	225.000
	3	8	43.950 ^d	43.050	21.793	16.700	78.700
	4	8	123.800 ^c	130.000	53.099	42.000	216.000
	5	8	52.050 ^d	51.400	23.211	17.900	88.200
	Total	72	187.828	173.500	130.469	16.700	571.000

^{a,b,c,d} Os índices representam os grupos com médias homogêneas. Assim, métodos com os mesmos índices indicam médias similares (ao em nível crítico de 5% global — equivalente a 0,3% com a correção de Bonferroni). Índices diferentes indicam diferenças entre as médias dos métodos comparados.

De uma forma geral, os percentuais de variação da concentração, com *EDTA*, mostraram-se bastante reduzidos, indicando uma coerência no número de plaquetas mensuradas utilizando-se os dois tipos distintos de anticoagulantes.

Para avaliar a contagem de plaquetas e o grau de concentração, em relação à contagem inicial, adotou-se a medida obtida com o citrato como

nível basal, tendo sido observado os resultados apresentados nas FIGURAS 8 e FIGURA 9.

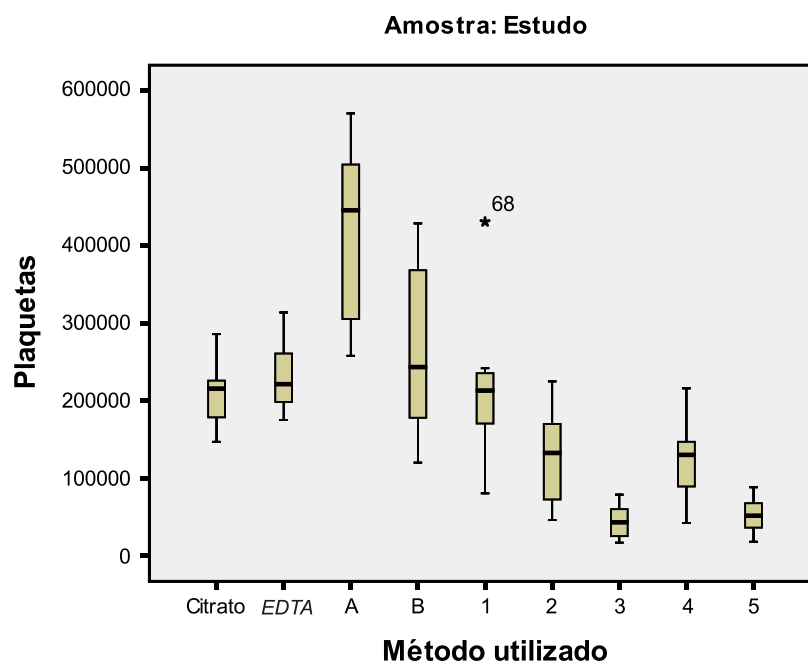


FIGURA 8. Amostra Estudo. Box-plot do número de plaquetas, segundo método utilizado e estudo.

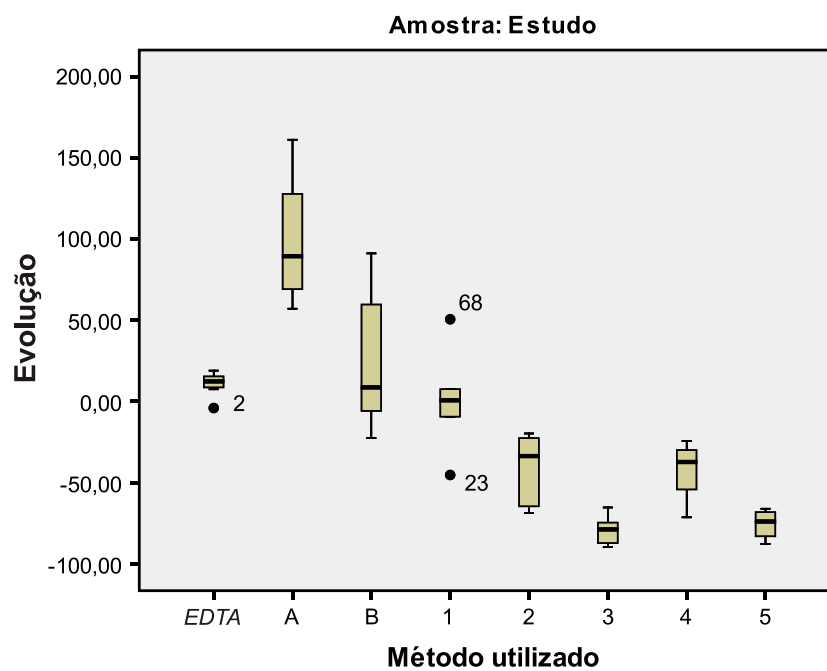


FIGURA 9. Amostra Estudo. Box-plot do percentual de concentração de plaquetas, segundo método utilizado e amostra estudo.

Para avaliar se as médias entre os diferentes métodos apresentavam valores estatísticos distintos, foi realizada a ANOVA com medidas repetidas tanto para a contagem do número de plaquetas como para o grau de concentração, tendo sido detectado no índice crítico de 5%, em ambos os casos, a existência de diferenças entre as médias dos diferentes métodos². Adicionalmente, para identificar as diferenças entre os diferentes métodos, foi aplicado o teste *t- Student* para amostras pareadas, com a aplicação da correção de Bonferroni³ (APÊNDICE 4). Dessa forma, foram identificados quatro grupos de métodos com médias similares (QUADRO 6):

QUADRO 6. Análise descritiva dos diferentes grupos de método utilizados.

1	Menores valores de número de plaquetas. Formado pelos métodos GC ₂ -3 (200/800g) e GC ₂ -5 (400/800g). Contagem média de 48.000/ μ l. Concentração de -77,58% (ou seja, com apenas em torno de 23% da contagem inicial obtida, com o anticoagulante citrato).
2	Valores médios de contagem de 125.700/ μ l. Concentração de -41,81%. Formado pelos métodos GC ₂ -2 (200/400g) e GC ₂ -4 (400/400g).
3	Formado pelos métodos GC ₂ -1 (200/200g) e GC ₁ -B (400g). Média de contagem 242.400/ μ l. Concentração de 12,35%.
4	Formado pelo método GC ₁ -A (200g. 750/ μ l). Maiores concentrações (99,03%).

² Para o número de plaquetas, foi obtido $F = 46,024$, $p < 0,001$. Para o grau de concentração foi obtido $F = 61,827$, $p < 0,001$.

³ Para o número de plaquetas foi utilizado $\alpha = 5\% / (8 \times 2) = 0,3\%$; para o grau de concentração foi utilizado $\alpha = 5\% / (7 \times 2) = 0,4\%$.

Finalmente, apenas do ponto de vista descritivo, foi realizada uma tabulação entre os diferentes métodos e a obtenção ou não de uma concentração superior a 100%. A TABELA 2 representa os resultados obtidos.

TABELA 2. Número de testes com concentração superior a 100% segundo método e amostra.

Amostra		Concentração de plaquetas			
		Concentração inferior a 100%	Concentração superior a 100%	Total	
Estudo	Grupo	1	8	0	8
		2	8	0	8
		3	8	0	8
		4	8	0	8
		5	8	0	8
		A	5	3	8
		B	8	0	8
Total		53	3	56	

Para avaliar se as médias entre os diferentes métodos apresentavam valores estatísticos distintos, foi aplicada a ANOVA com medidas repetidas, tanto para a contagem do número de plaquetas como para o grau de concentração, tendo sido detectada a existência de diferenças entre as médias dos diferentes métodos⁴ num índice crítico de 5%, em ambos os casos. Adicionalmente, para identificar as divergências entre os diferentes

⁴ Para o número de plaquetas, foi obtido $F = 46,024$, $p < 0,001$. Para o grau de concentração foi obtido $F = 61,827$, $p < 0,001$.

métodos, foi aplicado o teste t de *Student* para amostras pareadas (TABELAS 3-4), e a correção de Bonferroni⁵ (TABELA 7 - APÊNDICE 4).

TABELA 3. Teste de comparações de médias. Teste t-*Student*. Contagem do número de plaquetas/ μ l.

	GCt - EDTA	GC ₁ - A	GC ₁ - B	GC ₁ - 1	GC ₂ - 2	GC ₂ - 3	GC ₂ - 4	GC ₂ - 5
GCt - CITRATO	-22.250 ,003	-208.625 ,000	-57.000 ,100	-9.550 ,671	81.525 ,000	165.175 ,000	85.325 ,000	157.075 ,000
GC₁ - A			151.625 ,001	199.075 ,001	290.150 ,000	373.800 ,000	293.950 ,000	365.700 ,000
GC₁ - B				47.450 ,139	138.525 ,004	222.175 ,000	142.325 ,001	214.075 ,000
GC₂ - 1					91.075 ,002	174.725 ,001	94.875 ,002	166.625 ,001
GC₂ - 2						83.650 ,001	3.800 ,739	75.550 ,003
GC₂ - 3							-79.850 ,001	-8.100 ,196
GC₂ - 4								71.750 ,000

⁵ Para o número de plaquetas foi utilizado $\alpha=5\%/(8 \times 2)=0,3\%$; para o grau de concentração foi utilizado $\alpha=5\%/(7 \times 2)=0,4\%$.

TABELA 4. Teste de comparações de médias. *Teste t-Student*. Concentração.

	GC ₁ - B	GC ₂ - 1	GC ₂ - 2	GC ₂ - 3	GC ₂ - 4	GC ₂ - 5
GC ₁ - A	74,76 ,001	98,60 ,001	140,30 ,000	178,61 ,000	141,38 ,000	174,60 ,000
GC ₁ - B		23,84 ,145	65,53 ,005	103,85 ,000	66,61 ,001	99,83 ,000
GC ₂ - 1			41,70 ,000	80,01 ,000	42,78 ,000	76,00 ,000
GC ₂ - 2				38,32 ,000	1,08 ,856	34,30 ,001
GC ₂ - 3					-37,24 ,000	-4,01 ,208
GC ₂ - 4						33,22 ,000

Apesar da suposição de normalidade subjacente ao teste da ANOVA e do teste *t-student* ter sido aceita (verificado a partir do teste de Kolmogorov-Smirnov nos resíduos - TABELA 7 do APÊNDICE 4), e em virtude do número reduzido de observações, foram realizados testes não paramétricos de Friedman para comparação das médias entre os métodos. Posteriormente, para detectar diferenças, utilizou-se o teste de Wilcoxon (TABELAS 5 e 6). Os resultados obtidos corroboraram os identificados pela ANOVA e o teste *t-student*.

Constatou-se que, tanto em termos do número médio de plaquetas como do grau de concentração, o método GC₁-A, correspondente à realização de uma centrifugação com uma força de 200g por um período de dez minutos, foi o que apresentou as maiores concentrações de plaquetas.

TABELA 5. Teste de comparações de médias. Teste de Wilcoxon. Contagem do número de plaquetas.

	GCt - EDTA	GC ₁ - A	GC ₁ - B	GC ₂ - 1	GC ₂ - 2	GC ₂ - 3	GC ₂ - 4	GC ₂ - 5
GCt - CITRATO	-2,38 ,014	-2,52 ,008	-1,26 ,249	-0,07 ,969	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008
GC₁ - A			-2,52 ,006	-2,52 ,007	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008
GC₁ - B				-1,26 ,228	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008
GC₂ - 1					-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008
GC₂ - 2						-2,52 ,008	-1,40 ,192	-2,52 ,008
GC₂ - 3							-2,52 ,008	-1,12 ,313
GC₂ - 4								-2,52 ,008

Teste de Friedman $p < 0,001$

TABELA 6. Teste de comparações de médias. Teste de Wilcoxon. Concentração.

	GC ₁ - A	GC ₁ - B	GC ₂ - 1	GC ₂ - 2	GC ₂ - 3	GC ₂ - 4	GC ₂ - 5
GC₁ - A		-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008
GC₁ - B			-1,40 ,193	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008
GC₂ - 1				-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008	-2,52 ,008
GC₂ - 2					-2,52 ,008	-1,40 ,193	-2,52 ,008
GC₂ - 3						-2,52 ,008	-1,26 ,249
GC₂ - 4							-2,52 ,008

Teste de Friedman $p < 0,001$

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O PRP tem chamado a atenção, nos últimos anos, em diferentes áreas da odontologia (TAYAPONGSAK et al. 1994; ANITUA,1999) e da medicina como a ortopedia (KAZAKOS et al., 2009), medicina esportiva (HAYNESWORTH et al., 2002; LIU et al., 2002; KAKUDO et al., 2008; MISHRA, WOODALL, VIEIRA, 2009) e cirurgia plástica (SERRA RENOM et al., 2006; UEBEL et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008; PALLUA, WOLTER, MARKOWICZ, 2010).

Na cirurgia plástica essa atenção volta-se a dois aspectos: (a) Propriedade de adesão do gel de plaquetas, devido à quantidade de fibrinogênio presente no plasma que, pela ativação com os íons de cálcio forma o gel de fibrina, facilita o manuseio e integração de enxertos e retalhos, em consequência de suas propriedades de adesão aos tecidos; (b) Presença dos FC, presentes nas plaquetas, que interferem positivamente na cicatrização, além de seu grande potencial para aplicação na engenharia tecidual, apesar de haver estudos contraditórios (AGHALOO, MOY, FREYMILLER, 2002; POR et al., 2009b). A utilização do PRP pode ser valiosa e efetiva no auxílio ao tratamento da regeneração tecidual, em função da proliferação de células mesenquimais adultas, uma vez que suas diferenciações relacionam-se diretamente à concentração de plaquetas (HAYNESWORTH et al., 2002; LIU et al., 2002; MARX, 2004; KAKUDO et al., 2008).

Neste estudo, para sistematizar a obtenção de plaquetas por meio de centrifugas de bancadas, considerando-se seu baixo custo e fácil disponibilidade em hospitais e clínicas de menor porte, seguiu-se as normas recomendadas pela CLSI (ERNST et al. 2010) —órgão internacional que normatiza os procedimentos laboratoriais de coleta de sangue e centrifugação para a obtenção do PRP, e as

- Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso (ANDRIOLO et al., 2010). Foi de cunho prospectivo, randomizado, controlado e comparativo, realizado em centro único, para sistematizar a obtenção de plaquetas por meio de centrifugas de bancadas, composto por oito voluntários, 72 testes divididos em três grupos (GCt, GC₁, GC₂), com variação da *RCF* em 200, 400 e 800g. O tempo, para todos os métodos, foi determinado em dez minutos, e a força inicial de 200g seguiu recomendações da CLSI (ERNST et al. 2010), e foi considerado o terço inferior do sobrenadante, em ambos os grupos deste estudo, para a determinação do melhor *RCF* no preparo do PRP (MARX, 2000; EFEOGLU, AKÇAY, ERTÜRK, 2004).

Quanto ao grau de concentração em relação à contagem inicial das plaquetas, adotou-se a medida obtida com o citrato de sódio a 3,2% como nível basal, embora, no GCt, os percentuais de variação da concentração com o *EDTA*, mostraram-se bastante reduzidos, pela importância na preservação da morfologia das plaquetas e, conseqüentemente, de seus FC (MARX, 2000; LEI, GUI, XIAO, 2009).

Observou-se que o GC₁ apresentou o melhor índice de enriquecimento de plaquetas, no GC₁-A, com centrifugação de 200g, obtendo 99,3% de

enriquecimento na concentração de plaquetas, que equivaleu a 1,99 vezes o aumento no número das plaquetas do GCt, enquanto que forças de centrifugação superiores foram insuficientes para o enriquecimento, similarmente ao estudo de ANITUA (1999) e LANDEBERG, ROY, GLICKMAN (2000) que relataram resultados semelhantes, com centrifugação de 160g e de 200g por seis e dez minutos, respectivamente.

Ao analisar os resultados dos GC₂, o que aplicou 200g na primeira centrifugação e 200g na segunda, grupo GC₂-1(200/200g), foi o que obteve certo enriquecimento de plaquetas, 12,35%, que equivaleu a 1,12 vezes o aumento no número das plaquetas do GCt, porém, inferior ao que se conseguiu com GC₁-A com 200g, que foi de 99,3%, que equivaleu a 1,99 vezes o aumento no número das plaquetas do GCt, fato semelhante ao estudo de LANDEBERG, ROY, GLICKMAN (2000), e inferior aos valores encontrados por OKUDA et al. (2003) que foi de 284%. Contudo, esse estudo relatou somente a velocidade empregada pela centrifuga (rpm), omitindo seu raio, tornando difícil a sua reprodutibilidade pela impossibilidade do cálculo da força de centrifugação, de acordo com os estudos de MARX (2000) e POR et al. (2009a), e que não foi percebida por outros estudos como os de SERRA RENOM et al. (2006) e ALMEIDA et al. (2008).

Analisando-se o GC₂, quando se variou as forças entre 200, 400 e 800g observou-se um valor negativo de enriquecimento de plaquetas, não conseguindo o PRP. Ao empregar-se a força de 400g na primeira centrifugação e de 800g na segunda, o resultado apresentou os menores valores de número de plaquetas, bem como de concentração, tendo uma

contagem média de 48.000/ μ l e uma concentração de -77,58%, ou seja, apenas em torno de 23% da contagem inicial obtida no GCt, diferente do estudo de VENDRAMIN, FRANCO, FRANCO (2009) que relatou o enriquecimento de 570%, com emprego de centrifuga diferente ao deste estudo, porém de mesmo raio (16,1cm).

Ao utilizar, no GC₂₋₃, as variações de 200g na primeira centrifugação e de 800g na segunda, a média de contagem foi de 48.000/ μ l e grau de concentração de -77,58%, ou seja, com apenas aproximadamente 23% da contagem inicial obtida, utilizando o anticoagulante de citrato de sódio a 3,2%, valores bem inferiores aos relatados por SÁEZ-TORRES BARROSO, CALVO BENITO, GAYÀ PUIG (2007). Contudo, nesse estudo não referem como foi realizada a obtenção do PRP. Fato que talvez possa justificar porque o PRP foi ineficaz no estudo de AGHALOO, MOY, FREYMILLER (2002), que utilizaram essas variações na RCF.

Com a elevação das forças aplicadas, neste estudo, obteve-se o empobrecimento de plaquetas. Muito embora o fibrinogênio presente no plasma, em contato com os íons de cálcio, pudesse adquirir a propriedade do gel com efeitos de aderência e selante semelhantes ao PRP, de acordo com estudos de OKUDA et al. (2003)

Os resultados obtidos, neste estudo, foram diferentes aos obtidos por MARX (1998) que, com aparelhos de plasmaforese, alcançou enriquecimento de 338%, com aumento de 3,38 vezes a contagem das plaquetas no sangue total, enquanto que o estudo de VENDRAMIN et al. (2006) atingiu 496%, com aumento de 4,96 vezes a contagem das plaquetas

no sangue total, aplicando 300g na primeira centrifugação e 640g na segunda, com centrífuga de bancada. Neste estudo, não houve reprodutibilidade desse mesmo procedimento, uma vez que a elevação da força acima de 200g não promoveu enriquecimento semelhante, ficando o questionamento sobre a diferença das centrífugas. Sugerindo que, este fato, poderia influenciar no não enriquecimento de plaquetas íntegras e viáveis, em número suficiente para interferir na cicatrização e na regeneração tecidual (ZIMMERMAN, 2001; WEIBRICH & KLIES, 2002; MARX, 2004), diferentemente de estudos que afirmaram que os métodos com tubos, em centrífugas de bancada, eram suficientes para se obter o enriquecimento de plaquetas, quando comparadas a aparelhos de plasmaforese (LANDESBURG, ROY, GLICKMAN, 2000; ALMOGUERA VILLACAÑAS, ESPINOSA, LÓPEZ-OLIVA MUÑOZ, 2003; VENDRAMIN, FRANCO, FRANCO, 2009).

Revisões sistemáticas, sobre a utilização do PRP na regeneração tecidual (MARTÍNEZ-ZAPATA et al., 2009), sobre o concentrado de plaquetas no *face-lift* (POR et al., 2009a), bem como revisões de literatura sobre o PRP em ferimentos de extremidades e em traumas agudos (KAZAKOS et al., 2009) e em queimaduras (PALLUA, WOLTER, MARKOWICZ, 2010), concluíram que, apesar da existência de trabalhos randomizados sobre o tema, eram inconclusivos, devido às limitações das metodologias empregadas, ressaltando a necessidade de trabalhos futuros randomizados para se determinar, claramente, o preparo em centrífugas.

Constatou-se, neste estudo, no qual foram mencionadas claramente a *RCF*, e o (r) associado à rpm correspondente, que o método GC₁-A, correspondente à realização de uma centrifugação com uma força de 200g

por um período de dez minutos, foi o que apresentou as maiores concentrações de plaquetas, com aumento de 1,99 vezes a contagem de plaquetas no sangue total.

PERSPECTIVAS

Determinar a eficácia do PRP, obtido por centrifugação, com a *RCF* de 200g, com única centrifugação na regeneração tecidual, e a possibilidade de sua obtenção a partir de outras centrífugas, seguindo a metodologia deste estudo, bem como a quantificação dos respectivos FC.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Obteve-se o plasma rico em plaquetas (PRP), a partir de centrifuga de bancada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *Oral Maxillofac Surg.* 2002 Oct;60(10):1176-81.

Almeida ARH, Menezes JA, Araújo GKM, Mafra AVC. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: Análise de casos clínicos. *R Bras Cir Plást.* 2008; 23(2):82-8.

Almoguera Villacañas JR, Espinosa CV, López-Oliva Muñoz ME. Plasma rico en plaquetas. Análisis coparativo de cuatro presentaciones comerciales. *Patol Apar Locom.* 2003;1(1):59-66.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* [online]. 1999 Jul-Aug;14(4):529-35. Available from: URL: http://medlib.yu.ac.kr/eur_j_oph/ijom/IJOMI/ijomi_14_529.pdf

Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (*PRGF*) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2001 Aug;13(6):487-93; quiz 487-93.

Antoniades HN, Williams LT. Human platelet-derived growth factor: structure and function. *Fed Proc.* 1983 Jun;42(9):2630-4.

Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spagnoli LG, et al. Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Dec;15(4):625-34.

Cervelli V, Gentile P. Use of cell fat mixed with platelet gel in progressive hemifacial atrophy. *Aesthetic Plast Surg*. 2009 Jan;33(1):22-7.

Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Nov;62(11):1403-7.

Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Nov;118(6):147e-159e.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Nov;114(6):1502-8.

Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006 Jun;38(2):174-87.

Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002 Dec;22(6):547-57.

Green DM, Klink B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Apr;101(4):1161-2.

Haynesworth SE, Kadiyala S, Liang LN, Thomas T, Bruder SP. Chemotactic and mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet rich plasma suggests a mechanism for enhancement of bone repair. In: *Proceedings of the 48th. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*; 2002 Feb 9-3; Dallas (TX); 2002.

Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Nov;122(5):1352-60.

Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, Tilkeridis K, Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury*. 2009 Aug;40(8):801-5.

Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol*. 2004 Mar;36(1):28-35.

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 Mar;58(3):297-300; discussion 300-1.

Lei H, Gui L, Xiao R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem*. 2009 Sep;42(13-14):1452-60.

Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen*. 2002 Sep-Oct;10(5):336-40.

Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Jan;107(1):229-37; discussion 238-9.

Marlovits S, Mousavi M, Gäbler C, Erdös J, Vécsei V. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur Spine J*. 2004 Oct;13 Suppl 1:S102-6.

Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal A, Solà I, Bolibar I, Angel Expósito J, Rodríguez L, García J. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion*. 2009 Jan;49(1):44-56.

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 Jun;85(6):638-46.

Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.

Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.

Marx RE. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Mar;58(3):297-300; discussion 300-1.

Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med.* 2009 Jan;28(1):113-25.

Muñoz FLO, Sánchez-Villacañas JRA, Espinosa CV. Plasma rico en plaquetas. Análisis comparativo de cuatro presentaciones comerciales. *Patología del aparato locomotor de la Fundación Mapfre Medicina. Patol Apar Locom.* 2003;1(1):59-66.

Nishimoto S, Oyama T, Matsuda K. Simultaneous concentration of platelets and marrow cells: a simple and useful technique to obtain source cells and growth factors for regenerative medicine. *Wound Repair Regen.* 2007 Jan-Feb;15(1):156-62.

Nishioka T, Yokota M, Tsuda I, Tatsumi N. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clin Lab Haematol.* 2002 Apr;24(2):115-9.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*. 2003 Jun;74(6):849-57.

Pallua N, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns*. 2010 Feb;36(1):4-8.

Por YC, Shi L, Samuel M, Song C, Yeow VK. Use of tissue sealants in face-lifts: a metaanalysis. *Aesthetic Plast Surg*. 2009a May;33(3):336-9.

Por YC, Yeow VK, Louri N, Lim TK, Kee I, Song IC. Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009b Aug;62(8):1030-4.

Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1997 Jan-Mar;5(1):12-7.

Rossi J R, Souza Filho MAP. Obtenção de trombina autógena: proposta de um protocolo simplificado e de fácil reprodução. *R Paul Odontol*. 2004 Set-Out;26(5):4-9.

Sáez-Torres Barroso C, Calvo Benito J, Gayà Puig A. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. *R Esp Cirug Oral y Maxilofac* [online]. 2007 Jul-Ago;29(4):240-8. Available from: URL: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-05582007000400003&script=sci_abstract

Serra Renom JM, Muñoz del Olmo JL, Gonzalo Caballero C. Uso de factores de crescimento plaquetar unidos a injertos de grasa para lipofiling facial em ritidectomia. *Cir Plas Iberolatinoam*. 2006 Jul-Sep;32(3):191-8. Available from: URL: <http://scielo.isciii.es/pdf/cpil/v32n3/original6.pdf>.

Soma Y, Mizoguchi M, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Ihn H, et al. Specific inhibition of human skin fibroblast chemotaxis to platelet-derived growth factor A-chain homodimer by transforming growth factor-beta1. *Arch Dermatol Res*. 2002 Feb;293(12):609-13. Epub 2002 Jan 23.

Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994 Feb;52(2):161-5; discussion 166.

Uebel CO, da Silva JB, Cantarelli D, Martins P. The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Nov;118(6):1458-66; discussion 1467.

Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *R Bras Cir Plást*. 2009 Abr-Jun;24(2):212-8.

Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Plasma rico em plaquetas e factores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *R Col Bras Cir*. 2006 Jan-Fev;33(1):24-8.

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 Apr;30(2):97-102.

Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion.* 2001 Oct;41(10):1217-24.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOPTADAS

Andriolo A, Martins AR, Ballarati CAF, Barbosa IV, Mendes ME, Melo MR, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso [online]. 2ª ed. São Paulo: Manole, 2010. Disponível em:

<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042.pdf>

BIREME. Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. DeCS: descritores em ciências da saúde [citado em 01 abr 2006]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>.

Ernst DJ, Ballance LO, Calam RR, McCall R, Smith SS, Szamosi DI, Warunek DJ. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) - Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard [online]. 6th ed. Wayne (PA): H3-A6; 2007. Available from: URL: <http://www.icmje.org>.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [Internet]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2008 Oct; cited 2010 May 23]. Available from: URL: <http://www.icmje.org>.

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. Ferreira LM, coordenadora; Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, organizadores. São Paulo: Livraria Médica Editora; 2008.

Reeder GD, Hood AG, Hill AG, Potter PS, Iversen LIG, Keating RF, et al. Proceedings of the American Academy of Cardiovascular Surgeons. San Antonio (TX), 1993.

ABSTRACT


ABSTRACT

BACKGROUND: Platelet-rich plasma is an autologous concentration of autologous platelets in a small volume of plasma, obtained by centrifugation of the whole blood, and have been considered to be a rich source of growth factors. **OBJECTIVE:** Establish a method to prepare a platelet-rich plasma by centrifugation. **METHODS:** In this study 40 ml from the whole blood was obtained from eight volunteers, and seventy-two tests were performed in three groups (control, one spin, and two spins), changing the intensity performing from 200, 400 and 800g, to establish the method that achieves the optimal platelet enrichment and concentration. **RESULTS:** The optimal platelet concentration enrichment obtained with the group of two spins was inferior than values was obtained with the group of one spin. In those groups of one spin the enrichment of 99.03% of the platelet concentration was obtained with the relative centrifuge force of 200g. **CONCLUSION:** Platelet-rich plasma with high platelets counts can be prepared using the method of centrifugation, with highest concentration with the force of 200g.

KEYWORDS: 1. Platelet-Rich Plasma; 2. Tissue Engineering; 3. Fibrin Tissue Adhesive; 4. Wound Healing; 5. Centrifugation; 6. Blood Platelets.

***APÊNDICE 1. FOLHA DE APROVAÇÃO DO
PROTOCOLO CEP. 0059/10***

APÊNDICE 1.**FOLHA DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO CEP. 0059/10**

	<i>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</i>	<i>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</i>
---	--	---

São Paulo, 30 de abril de 2010.
CEP 0059/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) **CARLOS ALBERTO CALIXTO**
Co-Investigadores: Luiz Eduardo Felipe Abla, Lydia Masako Ferreira (orientadora)
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Força(G) e tempo(T) de centrifugação para obter o plasma rico em plaquetas"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: aprimoramento de técnica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Determinar a força e o tempo de centrifugação para obter o plasma rico em plaquetas..

RESUMO: O estudo será constituído por amostras de sangue coletadas no Hemocentro da UNIFESP e analisadas no Laboratório Central da UNIFESP. Será coletado sangue periférico de 2 doadores para 22 testes iniciais, divididos em 5 grupos, com variação de força (G) entre 200 e 800 G e com o tempo de centrifugação de 10 minutos, quantificando as plaquetas no terço inferior e na metade inferior do sobrenadante em duas centrifugações, para que seja determinada a melhor força no preparo do plasma rico em plaquetas. Será coletado tubo de citrato para obter o PRP e em seguida o tubo de EDTA para a contagem plaquetária em sangue total. A determinação dos fatores de crescimento (PDGF, TGF, VEGF e EGF) será feita pelo método de ELISA. A estrutura das plaquetas será analisada por meio de citometria de fluxo, com anti CD61 e CD62..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O plasma rico em plaquetas (PRP) é a concentração autóloga de plaquetas em pequeno volume de plasma, sendo uma importante fonte de fatores de crescimento. Sua utilização tem chamado a atenção na cirurgia plástica, especialmente na regeneração tecidual de pacientes queimados, por tornar a cicatização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de retalhos e enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de células de gordura..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados..

TCLE: Apresentado adequadamente, de acordo com a Res CNS 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 4938,00. .

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **25/4/2011 e 24/4/2012.**

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

1



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0059/10

Caso o material coletado seja utilizado em uma futura pesquisa, novo TCLE deverá ser assinado pelo voluntário e aprovado pelo CEP da Unifesp

***APÊNDICE 2. TERMO DE
CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO***

APÊNDICE 2.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este estudo, intitulado “Força e tempo de centrifugação para a obtenção do plasma rico em plaquetas”, tem como objetivo determinar a força e o tempo de centrifugação, em centrífugas de bancada, para obter o plasma rico em plaquetas por meio de centrífuga de bancada.

Estas informações são fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, em que será realizada a punção venosa periférica na veia do braço, para a coleta de 70ml de sangue a ser centrifugado, variando a força e o tempo de centrifugação, para a determinação de um protocolo eficiente.

Os riscos relacionados à sua participação são decorrentes da punção venosa, a qual será realizada sob todas as normas de segurança em saúde.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de um estudo para determinar um protocolo seguro de obtenção de plaquetas e de seus fatores de crescimento, que contribuirá para a melhoria dos conhecimentos sobre a cicatrização, bem como para a evolução do tratamento.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Carlos Alberto Calixto, que pode ser encontrado na Rua Napoleão de Barros, 715, 4º andar; tel.: 5576-4118. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética deste trabalho, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), localizado na Rua Botucatu, 572, 1º andar, conjunto 14, tel.: 5571-1062, fax 5539-7162, e-mail: cepunifesp@epm.br.

É garantida ao paciente a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, que terão, sem exceção, suas identidades mantidas em sigilo. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, será assumida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelo procedimento proposto neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem o direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para fins desta pesquisa.

Ficou claro que tenho o direito de ser atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, se assim o desejar, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “PLASMA RICO EM PLAQUETAS POR MEIO DE CENTRÍFUGA DE BANCADA”.

Eu, _____,
portador (a) do RG nº _____, após ter lido o Termo de Consentimento, declaro que ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Declaro, ainda,

que tive a oportunidade de sanar as dúvidas com o Dr. Carlos Alberto Calixto, com quem reafirmei a minha decisão em participar deste estudo. Ficou claro, também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e entendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido e sem prejuízo para o meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ____/____/____.

ASSINATURA DO PACIENTE/REPRESENTANTE LEGAL

_____ Data ____/____/____.

**ASSINATURA DA TESTEMUNHA PARA CASOS DE VOLUNTÁRIOS ANALFABETOS,
SEMIANALFABETOS OU PORTADORES DE DEFICIÊNCIA AUDITIVA OU VISUAL.**

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal, para a participação neste estudo.

_____ Data ____/____/____.

DR. CARLOS ALBERTO CALIXTO

APÊNDICE 3. PROTOCOLO 1

APÊNDICE 3. PROTOCOLO 1

Força g e Tempo de Centrifugação (t) para a obtenção do plasma rico em plaquetas.

Nome:

Nº Registro:

Data:

Idade:

Gênero:

Altura:

Peso:

DN:

Quantificação plaquetas sangue Total:

Hematocrito:

Hemoglobina:

Grupos GC_i:

Força	Tempo/Minutos	Quantificação Plaquetas 1/3 Inferior
200g	10	
400g	10	

Grupos GC_t:

Quantificação de Plaquetas Sangue Total	
Citrato	
EDTA	

Grupos GC_i:

Força	Tempo/Minutos	Quantificação Plaquetas 1/3 Inferior
200/200g	10	
200/400g	10	
200/800g	10	
400/400g	10	
400/800g	10	

Força g e Tempo de Centrifugação (t) para a obtenção do plasma rico em plaquetas.

Nome:

Nº Registro:

Data:

Idade:

Gênero:

Altura:

Peso:

DN:

Quantificação plaquetas sangue Total:

Grupos:

Força	Tempo	Quantificação/Plaquetas

	Força g (determinado protocolo 1)	Tempo/Minutos (determinado protocolo 1)	Quantificação Plaquetas
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

APÊNDICE 4. TABELAS

APÊNDICE 4

TABELA 7. Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos resíduos da ANOVA.

Amostra Estudo					
Número de plaquetas			Concentração		
Métodos	Z	P	Métodos	Z	P
GC ₁ - A	0,50	0,9633	GC ₁ - A	0,62	0,8428
GC ₁ - B	0,55	0,9198	GC ₁ - B	0,75	0,6244
GC ₂ - 1	0,80	0,5449	GC ₂ - 1	0,76	0,6184
GC ₂ - 2	0,45	0,9878	GC ₂ - 2	0,67	0,7623
GC ₂ - 3	0,40	0,9974	GC ₂ - 3	0,44	0,9910
GC ₂ - 4	0,47	0,9796	GC ₂ - 4	0,86	0,4567
GC ₂ - 5	0,41	0,9964	GC ₂ - 5	0,75	0,6215
GCt - Citrato	0,60	0,8686			
GCt - EDTA	0,42	0,9945			

APÊNDICE 5. PROJETO PILOTO

CARLOS ALBERTO CALIXTO

**PROJETO PILOTO: PLASMA RICO EM PLAQUETAS
POR MEIO DE CENTRÍFUGA DE BANCADA**

São Paulo

2010

1. INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é a concentração autóloga de plaquetas em pequeno volume de plasma, obtido por centrifugação do sangue, sendo considerada importante fonte de fatores de crescimento (FC). A sua utilização tem chamado a atenção na cirurgia plástica, especialmente na regeneração tecidual de pacientes queimados, por tornar a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de retalhos e enxertos, sejam ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura (MAN, PLOSKER, WINLAND-BROWN, 2001; EPPLEY, WOODELL, HIGGINS, 2004; VENDRAMIN *et al.*, 2006; SERRA RENOM *et al.*, 2006; UEBEL *et al.*, 2006, ALMEIDA *et al.*, 2008; CERVELLI *et al.*, 2009; POR *et al.*, 2009a; CERVELLI & GENTILE, 2009).

Inicialmente, a extração do PRP autólogo e sua aplicação em cirurgias eram realizadas por máquinas de autotransusão para a separação celular do sangue, cuja coleta era feita por meio de um cateter venoso profundo, colocado no paciente durante a cirurgia.

A intenção de simplificar o método culminou no desenvolvimento de novos protocolos, com o emprego de aparelhos mais simples, menor custo e utilização de centrífugas de bancada. Assim, por meio de uma punção venosa periférica de 50 a 60ml de sangue, conseguiu-se obter em torno de 7 a 10ml de PRP. Com a centrifugação, aumentou-se a concentração de plaquetas em aproximadamente 4,96 ($\pm 0,36$) vezes em relação à amostra de sangue da coleta inicial (LANDESBERG, ROY, GLICKMAN, 2000; MARX, 2000; MARX, 2004; MAN, PLOSKER, WINLAND-BROWN, 2001; MUÑOZ,

SÁNCHEZ-VILLACAÑAS, ESPINOSA, 2003; MARLOVITS *et al.*, 2004; ROSSI & SOUZA FILHO, 2004).

A diferença de densidade no sangue centrifugado faz com que as células vermelhas precipitem na parte inferior, enquanto que o PRP permanece na parte intermediária e o plasma pobre em plaquetas (PPP) na parte superior. Entre a camada inferior de células vermelhas e a intermediária de PRP, há uma pequena zona denominada névoa, rica em leucócitos e plaquetas maiores REEDER *et al.* (1993). Quando se utiliza a metade inferior do plasma sobrenadante ou o seu terço inferior, como PRP, apresenta-se diferença na concentração final de plaquetas (EFEOGLU, AKÇAY, ERTÜRK, 2004; MARX, 2004).

Embora a concentração de plaquetas seja proporcional à força g e ao tempo de centrifugação t (LANDESBERG, ROY, GLICKMAN, 2000; OKUDA *et al.*, 2003; VENDRAMIN *et al.*, 2006; VENDRAMIN, FRANCO, FRANCO, 2009), a força N excessiva pode interferir na qualidade e integridade das plaquetas e na quantidade desproporcional de liberação de seus FC, produzindo um efeito, às vezes inibitório, de um determinado FC sobre outro (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; SOMMA *et al.*, 2002; UEBEL *et al.*, 2006; SÁEZ-TORRES BARROSO, CALVO BENITO, GAYÀ PUIG, 2007). A quantidade mínima dos FC *PDGF* (Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas, do inglês *Platelet-Derived Growth Fator*) *TGF- β* (Fator Transformador de Transformador, do inglês *Transforming growth Fator*), presentes no plasma livre de plaquetas, indica que quase todos os FC presentes no PRP são derivados das plaquetas (LANDESBERG, ROY, GLICKMAN, 2000; EPPLEY, PIETRZAK, BLANTON, 2006).

LANDESBERG, ROY, GLICKMAN (2000), utilizando centrífugas menores (centrífugas de bancada) e mais simples, por meio de punção venosa periférica, obtiveram o PRP, estabelecendo um protocolo após analisar diferentes forças g e tempo de centrifugação t . Empregaram a metade inferior do sobrenadante como a fração de PRP, e observaram que a força de 200g, com o tempo de centrifugação de dez minutos, foi suficiente para o enriquecimento das plaquetas em 229% na primeira centrifugação, e de 205% após a segunda centrifugação. Concluíram que tempos menores ou iguais a cinco minutos falharam em obter qualquer enriquecimento de plaquetas, e que forças superiores a 250g resultaram em *platelet pellet* que não pôde ser ressuspensado. Porém, sugeriram a possibilidade de obter-se o PRP com a utilização de centrífugas de laboratório, menores e mais baratas ou de mesa, com forças baixas e com o tempo reduzido.

ZIMMERMANN *et al.* (2001) analisou os PRP obtidos do sangue de 15 voluntários, utilizando como método de preparo a plasmaforese, e o preparo pelo método de tubos com dupla centrifugação, sendo a primeira a 1650g por dez minutos e, após coleta do sobrenadante, uma nova centrifugação a 730g por mais dez minutos. Observou o enriquecimento de 525% obtido pela plasmaforese e de 411% no método de tubos, portanto, significativamente menor. A contaminação (leucócitos, *white blood cell - WBC*) no método de tubos foi consideravelmente maior, com uma elevada ativação das plaquetas, comparada ao PRP obtido com a plasmaforese.

OKUDA *et al.* (2003) utilizaram dupla centrifugação (centrífuga de mesa *Heraeus Labofuge 300*), sendo a primeira a 2400 rotações por minuto (rpm) por dez minutos, com coleta e nova centrifugação do sobrenadante a

3600rpm, obtendo-se um enriquecimento plaquetário de 283,4%, concluindo-se que a diferença poderia relacionar-se à variação da força g e do tempo de centrifugação t . Analisaram e observaram o nível dos FC ($PDGF-\alpha\beta$) em 440,6%, e o nível do ($TGF-\beta-1$) em 346,6%.

VENDRAMIN *et al.* (2006), ao estabelecer um método barato e, segundo o autor, eficaz na obtenção do PRP a ser utilizado em cirurgia plástica, por meio do estudo de várias forças g e tempo de centrifugação t , observou que a força de 300g aplicada na primeira centrifugação, por dez minutos, promoveu o enriquecimento de plaquetas, cujos resultados indicaram percentuais de 454% na metade inferior do plasma sobrenadante que, após coleta e segunda centrifugação produziu aumento do enriquecimento em 496%, comparado com a dosagem das plaquetas não submetidas ao enriquecimento.

Existem vários sistemas de preparação de PRP disponíveis, embora estudos pré-clínicos e clínicos apresentem resultados contraditórios. Há uma lacuna de estudos mais sistemáticos e consistentes sobre o assunto (REEDER *et al.*, 1993; MARX, 2004; EFEOGLU, AKÇAY, ERTÜRK, 2004; SERRA RENOM, MUÑOZ DEL OLMO, GONZALO CABALLERO, 2006; UEBEL *et al.*, 2006; EVERTS *et al.*, 2006; EPPLEY, WOODSELL, HIGGINS, 2006), sendo este, portanto, o principal estímulo para a realização deste estudo piloto, cujo objetivo foi o de determinar a força g ideal, com o tempo de centrifugação t estabelecido em dez minutos, de acordo com o preconizado em literatura por LANDESBERG, ROY, GLICKMAN (2000); ZIMMERMANN (2001); OKUDA *et al.* (2003); VENDRAMIN *et al.* (2006), para obtenção do PRP.

2. MÉTODOS

2.1 CASUÍSTICA E AMOSTRA

2.1.1 CASUÍSTICA

A casuística foi composta por quatro voluntários, dois do gênero feminino e dois do gênero masculino, com idades entre 28 a 64 anos, oriundos dos ambulatórios de Cirurgia Plástica do Hospital São Paulo, que tem como Titular do Serviço a Professora Doutora Lydia Masako Ferreira.

Os pacientes foram submetidos à coleta de amostras de sangue, objeto deste estudo, no Hemocentro da UNIFESP e analisadas no Laboratório Central da UNIFESP, e adotou as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso (ANDRIOLO et al., 2010).

Todos os voluntários que participaram do estudo, após compreensão dos procedimentos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1).

Os critérios adotados consideraram gênero, idade, peso, emprego de anticoagulante e patologias agudas e infectocontagiosas (QUADRO 1). Não houve dimorfismo sexual ou interferências relativamente à faixa etária da casuística. Estes critérios obedeceram à legislação vigente, conforme Resolução - RDC nº 153, de 14 de junho de 2004.

QUADRO 1. Critérios de inclusão e exclusão.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO
▪ Ambos os sexos.
▪ Idade superior a 18 anos.
▪ Peso acima de 55kg.
CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
▪ Doenças agudas.
▪ Doenças infectocontagiosas.
▪ Em uso de anticoagulantes.
▪ Perda de peso acima de dez por cento do peso nos últimos três meses.

2.1.2 AMOSTRA

A amostra deste estudo foi composta por dois principais grupos — Grupo Piloto Uma Centrifugação (GPC₁) e Grupo Piloto Duas Centrifugações (GPC₂) — constituídos por 14 tubos, nos quais foram distribuídos o sangue total (62,5ml) obtido dos quatro voluntários da casuística.

Destes 14 tubos, os dois últimos compuseram o Grupo Piloto Controle (GPCt), que não foram submetidos à centrifugação: o de número 13 de anticoagulante de citrato e o de número 14 de anticoagulante *EDTA*

(Etilenodiamino Tetra-Acético, do inglês *Thylenediamine Tetraacetic Acid* *Ácido*).

Descreve-se, no QUADRO 2, os subgrupos do GPC₁ (três métodos), e GPC₂ (nove métodos), bem como o GPCt (anticoagulantes de citrato e *EDTA*), com suas respectivas vezes e forças de centrifugação.

QUADRO 2. Subgrupos do GC₁ (três subgrupos); GC₂ (nove subgrupos); GCt (anticoagulantes de citrato e *EDTA*), e respectivas vezes e força de centrifugação *t* de dez minutos.

GCt			
TUBO 13		TUBO 14	
CITRATO		<i>EDTA</i>	
GC ₁			
Métodos	<i>g</i>	(t/min)	
A	100	10	
B	150	10	
C	200	10	
GC ₂			
Métodos	<i>g</i>		(t/min)
	1 ^a	2 ^a	
1	100	100	10
2	100	150	10
3	100	200	10
4	100	300	10
5	100	500	10
6	100	700	10
7	150	150	10
8	150	200	10
9	200	200	10

2.2 PROCEDIMENTOS

Após a coleta de 62,5ml de sangue total de cada um dos voluntários da casuística, este sangue total foi distribuído em 14 tubos, sendo:

TUBOS 1-12	4,5ml de sangue e 0,5ml de anticoagulante citrato de sódio a 3,2%, (<i>BD Vacutainer®</i> , <i>Becton, Dickinson and Company-Franklin Lakes, NJ-USA</i>), utilizados nos Grupos de Centrifugação.
TUBO 13	Citrato de sódio a 3,2%, 4,5ml de sangue e 0,5ml de anticoagulante (<i>BD Vacutainer®</i> , <i>Becton, Dickinson and Company-Franklin Lakes, NJ-USA</i>).
TUBO 14	<i>EDTA</i> , com 4ml (<i>BD Vacutainer®</i> , <i>BD Franklin Lakes NJ-USA 8019561.</i>)

A centrífuga utilizada foi a Centrífuga *Eppendorf AG® 5804 R - 22331 (Hamburg, Germany)*, com raio de 16,1cm.

2.2.1 TÉCNICAS DE COLETA E CENTRIFUGAÇÃO

As técnicas de coleta e de centrifugação seguiram as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (ERNST et al., 2010), que normatiza procedimentos laboratoriais, a força e o tempo de centrifugação para obtenção do PRP.

As coletas dos quatro voluntários foram executadas por um único técnico, no Hemocentro do Hospital São Paulo da UNIFESP.

A punção venosa foi efetuada na fossa antecubital, na área anterior do braço em frente e abaixo do cotovelo, usando tubos a vácuo, contendo citrato de sódio 3,2% (na proporção de uma parte de anticoagulante em nove partes de sangue total), com o menor tempo possível de garroteamento e trauma durante o procedimento.

Após a coleta, o sangue total foi homogeneizado por meio de inversão do tubo (cerca de cinco a oito vezes).

Dentre as 14 coletas, primeiramente foram colhidas a sequência de treze tubos de citrato, sendo o décimo quarto tubo, o de *EDTA*. Para a contagem plaquetária em sangue total foram submetidos o décimo terceiro tubo de citrato, bem como o décimo quarto de *EDTA*. Os demais doze tubos de citrato foram submetidos à centrifugação para enriquecimento das plaquetas para obtenção do PRP.

Após a coleta, os tubos de citrato foram rapidamente centrifugados à temperatura ambiente, a fim de obter-se o PRP, com a velocidade da centrífuga em rpm, de acordo com a força *g* estabelecida. A verificação de calibração da centrífuga (ANEXO 1), pelo fabricante, antecedeu a coleta.

As centrifugações foram igualmente realizadas por um único técnico bioquímico, também no Hemocentro do Hospital São Paulo da UNIFESP, nos 48 testes de quantificação de plaquetas, após as centrifugações, e que foram divididos em dois grupos principais (GPC_1 e GPC_2), já mencionados.

No GPC₁, após a primeira centrifugação, os $\frac{2}{3}$ superiores do plasma sobrenadante foram coletados e desprezados, sendo o inferior diretamente transferido para um tubo de polipropileno, e encaminhado para contagem das plaquetas.

No GPC₂, após a primeira centrifugação, todo o plasma sobrenadante foi colhido e acrescido de um mm de células vermelhas, transferido para um novo tubo de polipropileno e encaminhado para uma segunda centrifugação, de acordo com a força g e o tempo de centrifugação t estabelecidos pelo *CLSI* (ERNST et al., 2010). Após esta segunda centrifugação, os $\frac{2}{3}$ superiores do plasma foram colhidos e desprezados, e o $\frac{1}{3}$ inferior, com algumas hemácias depositadas ao fundo, foi agitado e encaminhado para contagem das plaquetas.

2.2.2 PROTOCOLO DE FORÇA

Definido o protocolo de força g e com o tempo de centrifugação t , estabelecido em dez minutos para o preparo do PRP, outros novos testes obedecerão a este protocolo, com o propósito de verificar a reprodutibilidade do método pela quantificação de plaquetas.

3. RESULTADOS

Os métodos do GPC₁ (A, B e C) apresentaram valores das medianas próximos. Entretanto, conforme pode ser averiguado, o grau de dispersão dos resultados é relativamente elevado, o que pode impedir a diferenciação entre os valores desses grupos. Ainda em relação à amostra piloto, pode-se notar que os métodos do GPC₂ apresentaram valores de número de plaquetas inferiores aos obtidos pelos métodos do GPC₁. Comparando-se mais detalhadamente os métodos do GPC₂, é possível notar que a mediana dessa medida, aparentemente, apresenta uma relação inversamente proporcional com o valor máximo de força aplicada nas duas centrifugações, ou seja, o número de plaquetas no método 7 (150-150g) foi similar à observada no método 2 (100-150g) e levemente superior à observada nos métodos 3 (100-200g), 8 (150-200g) e 9 (200-200g), os quais apresentaram valores da mediana similares.

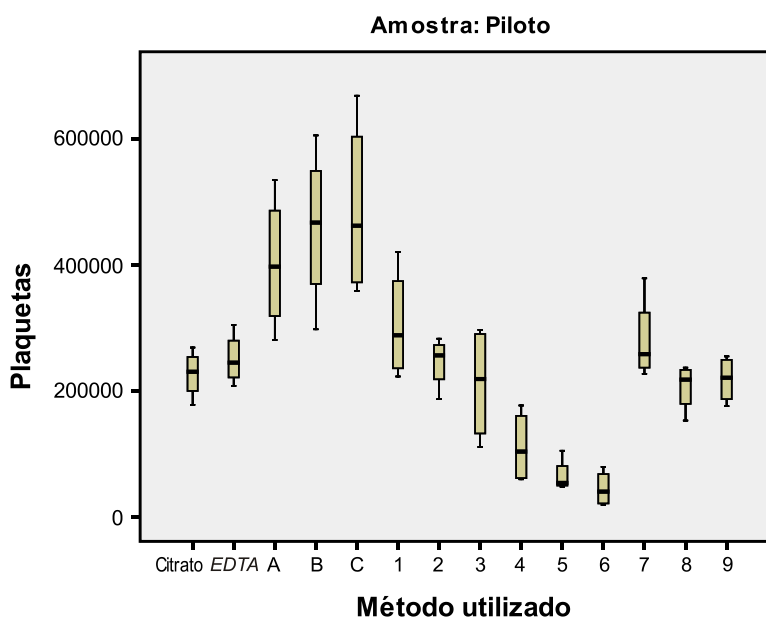


FIGURA 1. Box-plot do número de plaquetas segundo método utilizado.

Para avaliar o grau de concentração em relação à contagem inicial, adotou-se a medida obtida utilizando-se o Citrato como nível basal, tendo sido observado os resultados apresentados na FIGURA 2.

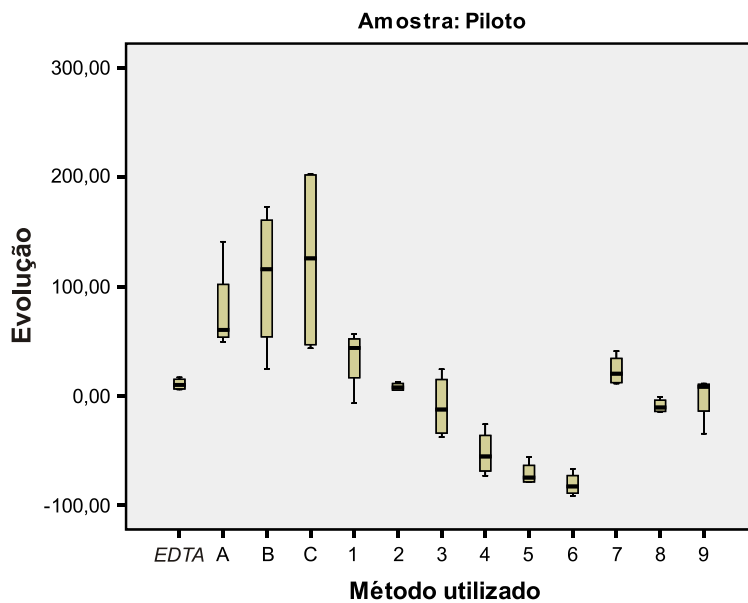


FIGURA 2. Box-plot do percentual de concentração de plaquetas segundo método utilizado.

Tendo em vista que o número de plaquetas pode variar conforme o tipo de anticoagulante utilizado, foram realizadas medições utilizando-se o *EDTA* (TABELA 1).

TABELA 1. Medidas resumo para o número de plaquetas por método e amostra.

Amostra	Método utilizado	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Piloto	Citrato	4	227.000	230.500	38.009	178.000	269.000
	<i>EDTA</i>	4	250.750	245.000	40.975	208.000	305.000
	A	4	402.750	397.500	109.009	281.000	535.000
	B	4	459.750	467.500	127.766	298.000	606.000
	C	4	488.250	462.500	144.230	359.000	669.000
	1	4	305.250	288.500	89.153	223.000	421.000
	2	4	245.750	256.500	41.452	187.000	283.000
	3	4	211.500	219.000	93.047	111.000	297.000
	4	4	111.025	103.700	58.715	59.700	177.000
	5	4	65.225	53.950	26.746	48.000	105.000
	6	4	44.625	40.100	28.577	18.900	79.400
	7	4	280.750	258.500	67.815	227.000	379.000
	8	4	206.500	218.000	38.057	153.000	237.000
9	4	218.250	221.000	37.456	176.000	255.000	
Total		56	251.2418	241.500	145.427	18.900	669.000

^{a,b,c,d} Os índices representam os grupos com médias homogêneas. Assim, métodos com os mesmos índices indicam médias similares (ao em nível crítico de 5% global — equivalente a 0,3% com a correção de Bonferroni). Índices diferentes indicam diferenças entre as médias dos métodos comparados.

De uma forma geral, nota-se que os percentuais de variação da concentração utilizando-se o *EDTA* em relação ao Citrato, mostraram-se bastante reduzidos, indicando uma coerência no número de plaquetas mensuradas utilizando-se os dois tipos distintos de anticoagulantes. Em relação à concentração nos grupos de teste, verifica-se que, analogamente ao observado nas medidas de contagem, os grupos GPC₁ apresentaram valores de concentração maiores do que as observadas nos métodos do

GPC₂. Entretanto, verifica-se também que a dispersão dos métodos do GPC₁ é relativamente superior à observada no GPC₂. Novamente, é possível também identificar um comportamento inversamente proporcional entre a força máxima aplicada nas unidades amostrais sujeitas aos métodos do grupo GPC₂ e o grau de concentração.

Avaliando-se os valores médios obtidos, pôde-se verificar que, conforme a TABELA 2, nos métodos 3 a 9 do grupo GPC₂, o grau de concentração apresentou média negativa, indicando que o número de plaquetas obtidas, após o procedimento, foi inferior ao mensurado na amostra controle com Citrato. Adicionalmente, verificou-se que, à exceção do GPC₁-B-C, todos os demais métodos apresentaram grau de concentração inferior a 100%.

TABELA 2. Medidas resumo para o grau de concentração por método e amostra.

Amostra	Método utilizado	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
	EDTA	4	10,70	10,04	5,31	5,86	16,85
	A	4	77,76	60,35	42,52	49,37	140,99
	B	4	107,31	115,79	66,83	24,69	172,97
	C	4	124,47	125,78	89,67	43,49	202,81
	1	4	34,36	43,82	28,20	-6,69	56,51
	2	4	8,23	7,62	3,73	5,06	12,61
Piloto	3	4	-9,61	-12,53	29,47	-37,64	24,27
	4	4	-52,47	-55,43	20,88	-73,11	-25,94
	5	4	-71,14	-74,75	10,67	-79,00	-56,07
	6	4	-80,99	-82,84	10,78	-91,49	-66,78
	7	4	23,16	20,25	13,89	11,26	40,89
	8	4	-9,15	-10,63	6,47	-14,50	-0,84
	9	4	-1,68	8,30	22,01	-34,57	11,24
	Total	56	11,50	6,28	66,45	-91,49	202,81

^{a,b,c,d} Os índices os grupos com médias homogêneas. Assim, métodos com os mesmos índices indicam médias similares (em nível crítico de 5% global — equivalente a 0,3% com a correção de Bonferroni). Índices diferentes indicam diferenças entre as médias dos métodos comparados.

Para avaliar se as médias entre os diferentes métodos apresentam valores estatisticamente distintos, foi aplicada uma Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas tanto para a contagem do número de plaquetas como para o grau de concentração, tendo sido detectado ao nível crítico de 5%, em ambos os casos, a existência de diferenças entre as médias dos diferentes métodos⁶. Adicionalmente, para identificar as diferenças entre os diferentes métodos, foi aplicado o teste *t-Student* para amostras pareadas, tendo sido utilizada a correção de Bonferroni⁷.

Em decorrência do número reduzido de observações, não foi possível a identificação de grupos de métodos bem definidos, tendo sido detectado apenas diferenças pontuais entre os métodos. Tendo em vista a suposição de normalidade inerente tanto à ANOVA como ao teste *t-student*, foram aplicados testes de Kolmogorov-Smirnov nos resíduos, tendo sido plausível, ao nível de 5%, a suposição em todos os casos.

Adicionalmente, em virtude do número reduzido de observações, foram realizados testes não paramétricos de Friedman para comparação das médias entre os métodos. Posteriormente, para detectar as diferenças entre os mesmos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Os resultados obtidos corroboraram os identificados pela ANOVA e o teste *t-Student*.

Finalmente, apenas do ponto de vista descritivo, foi realizado uma tabulação entre os diferentes métodos e a obtenção ou não de uma concentração superior a 100%. A TABELA 3 corresponde aos resultados obtidos.

⁶ Para o número de plaquetas na amostra piloto, foi obtido $F = 13,648$, $p = 0,008$; para o grau de concentração na amostra piloto, foi obtido $F = 21,095$, $p = 0,019$.

⁷ Para o número de plaquetas na amostra piloto, foi utilizado ; para o grau de concentração na amostra piloto, foi utilizado .

TABELA 3. Número de testes com concentração superior a 100% segundo método e amostra.

Amostra	Concentração de plaquetas		Total	
	Concentração inferior a 100%	Concentração superior a 100%		
Grupo	1	4	0	4
	2	4	0	4
	3	4	0	4
	4	4	0	4
	5	4	0	4
Piloto	6	4	0	4
	7	4	0	4
	8	4	0	4
	9	4	0	4
	A	3	1	4
	B	2	2	4
	C	2	2	4
Total	43	5	48	

De uma forma geral, verifica-se que apenas os métodos GPC₁-A (33%), GPC₁-B e GPC₁-C (100%) apresentaram resultados superiores a 100%. O teste Qui-quadrado para independência para amostra piloto foi de 18,53 ($p=0,082$), indicando que não foi possível identificar uma relação entre o método e a ocorrência de uma concentração superior a 100%.

4. CONCLUSÃO

Apenas os métodos GPC₁-B (150g) e GPC₁-C (200g) apresentaram resultados superiores a 100%.

APÊNDICE 1. PROJETO PILOTO - TABELAS

TABELA 4. Piloto: Teste de comparações de médias. Teste t-Student. Contagem do número de plaquetas.

	GCt - EDTA	GC ₁ - A	GC ₁ - B	GC ₁ - C	GC ₁ - 1	GC ₁ - 2	GC ₁ - 3	GC ₁ - 4	GC ₁ - 5	GC ₁ - 6	GC ₁ - 7	GC ₁ - 8	GC ₁ - 9
GCt - CITRATO	-23.750 ¹ ,023 ²	-175.750 ,035	-232.750 ,040	-261.250 ,053	-78.250 ,115	-18.750 ,023	15.500 ,654	115.975 ,011	161.775 ,004	182.375 ,001	-53.750 ,070	20.500 ,078	8.750 ,776
GC₁ - A			-57.000 ,296	-85.500 ,306	97.500 ,118	157.000 ,040	191.250 ,067	291.725 ,021	337.525 ,011	358.125 ,009	122.000 ,117	196.250 ,027	184.500 ,041
GC₁ - B				-28.500 ,579	154.500 ,053	214.000 ,050	248.250 ,082	348.725 ,028	394.525 ,014	415.125 ,012	179.000 ,086	253.250 ,037	241.500 ,042
GC₁ - C					183.000 ,120	242.500 ,063	276.750 ,094	377.225 ,033	423.025 ,014	443.625 ,014	207.500 ,120	281.750 ,044	270.000 ,032
GC₁ - 1					59.500 ,206	93.750 ,196	194.225 ,036	240.025 ,020	260.625 ,013	24.500 ,428	98.750 ,103	87.000 ,231	
GC₂ - 2					34.250 ,349	134.725 ,008	180.525 ,003	201.125 ,001	-35.000 ,215	39.250 ,007	27.500 ,381		
GC₂ - 3					100.475 ,015	146.275 ,032	166.875 ,016	-69.250 ,123	5.000 ,879				
GC₂ - 4					45.800 ,104	66.400 ,022	-169.725 ,011	-95.475 ,013					
GC₂ - 5					20.600 ,058	-141.275 ,003	-153.025 ,002						
GC₂ - 6					-236.125 ,004	-161.875 ,001	-173.625 ,004						
GC₂ - 7					74.250 ,067								
GC₂ - 8					-11.750 ,640								

¹ Corresponde à média das diferenças entre as observações dos dois grupos comparados.² Corresponde ao nível descritivo (p) do teste t-Student

TABELA 5. Piloto: Teste de comparações de médias. Teste t-Student. Concentração.

	GC₁ - B	GC₁ - C	GC₁ - 1	GC₁ - 2	GC₁ - 3	GC₁ - 4	GC₁ - 5	GC₁ - 6	GC₁ - 7	GC₁ - 8	GC₁ - 9
GC₁ - A	-29,55 ,301	-46,70 ,295	43,40 ,115	69,53 ,040	87,37 ,070	130,24 ,022	148,90 ,009	158,75 ,008	54,60 ,119	86,91 ,026	79,45 ,033
GC₁ - B		-17,15 ,455	72,95 ,065	99,08 ,059	116,92 ,092	159,79 ,036	178,45 ,018	188,30 ,017	84,15 ,093	116,46 ,045	108,99 ,041
GC₁ - C			90,10 ,121	116,24 ,080	134,07 ,108	176,94 ,047	195,61 ,025	205,45 ,025	101,30 ,123	133,61 ,061	126,15 ,046
GC₂ - 1				26,13 ,176	43,97 ,187	86,84 ,032	105,50 ,012	115,35 ,008	11,20 ,405	43,51 ,082	36,04 ,192
GC₂ - 2					17,84 ,314	60,70 ,011	79,37 ,001	89,22 ,001	-14,93 ,183	17,38 ,004	9,91 ,402
GC₂ - 3						42,87 ,005	61,53 ,016	71,38 ,005	-32,77 ,133	-0,46 ,975	-7,92 ,740
GC₂ - 4							18,67 ,084	28,51 ,011	-75,64 ,009	-43,33 ,018	-50,79 ,059
GC₂ - 5								9,85 ,064	-94,30 ,003	-61,99 ,000	-69,46 ,006
GC₂ - 6									-104,15 ,001	-71,84 ,001	-79,30 ,009
GC₂ - 7										32,31 ,046	24,85 ,243
GC₂ - 8											-7,46 ,504

¹Correspondem à média das diferenças entre as observações dos dois grupos comparados.

²Corresponde ao nível descritivo (p) do teste t-Student


ANEXO 1. LAUDO DE CALIBRAGEM


ANEXO 1.

Laudo de calibragem do contador automático (Cell-Dyn Ruby® Abbott Diagnostics Divions, 200 Abbott Park Road, Abbot Park, Il. 60064, USA)

ENTRO UNIFESP/HSP FAX : 1155740139 07 FEV. 2011 12:18 Pág. 1

A/C Dr. Calixto


Universidade Federal de São Paulo
SPDM – Associação Paulista para o Desenvolvimento da Medicina
 Diretoria Administrativa - Gerência de Engenharia Clínica
 Setor de Calibração e Certificação


 Página 1 de 2

Certificado de calibração N° 06612-10

I – Dados Gerais:

Solicitante : Hemocentro – Banco de Sangue – Imunohematologia
 Endereço : Rua Napoleão de Barros, 715 – 4º Andar – Vila Clementino
 Data de Calibração : 07/12/10
 Data de Validade : 07/04/11

II – Dados do Equipamento:

Equipamento : Centrífuga Refrigerada
 Fabricante : Eppendorf
 Modelo : 5804R
 Patrimônio : SN

III – Método Utilizado:

Determinação dos valores apresentados por comparação utilizando tacômetro e cronômetro calibrado e com rastreabilidade, segundo método interno – Procedimento Centrífuga.

IV – Rastreabilidade:

Tacômetro Digital calibrado pela empresa Masterlabor Inst. e Serviços Ltda.

	Equipamento Utilizado	Padrão de Calibração
Marca	Tako	Tacômetro Digital
Série	N/M	
Número de identificação	39300	MP PQ – 196/01
Nº do Certificado/Orgão Emissor	68837018 – Microprec	PO204/2006 (RBC)
Próxima Calibração	Abril/ 2010	Agosto/ 2011

Termômetro Digital calibrado pela empresa Masterlabor Inst. e Serviços Ltda.

	Equipamento Utilizado	Padrão de Calibração
Marca	HP	CAPPO 10+
Série	2823A15257	
Número de identificação	3458A	ML do Padrão 173
Nº do Certificado/Orgão Emissor	L0686/10 – LRM	5879/07-Ecil (RBC)
Faixa de indicação	-50 à 1300°C	
Precisão em 65°C	+/-0,3% leitura ± 1°C	0,2°C
Próxima Calibração	Abril/ 2010	Abril/ 2011

V – Observações:

- Os resultados da calibração estão contidos na tabela com valores obtidos através da comparação com os padrões e as incertezas estimadas da medição;
- Os resultados deste certificado referem-se exclusivamente ao instrumento submetido à

Rua Pedro de Toledo, 795 – Vila Clementino – São Paulo – SP
 Tel/Fax.: 5576 4412 / 5576 4627 / 5571 1127

Página 2 de 2

Certificado de calibração Nº **06612-10**

VI – Condições do teste:

Umidade ambiente : 60%
Temperatura ambiente : 21°C

VII – Itens testados na certificação:

Sistema mecânico:
Verif.

Integridade do corpo;
 Limpeza em geral;
 Integridade do rolamento;
 Lubrificação das engrenagens;

Obs:

Legenda:
 - Aprovado
 - Reprovado

Sistema elétrico:
Verif.

Botões do equipamento;
 Temporizador;
 Circuitos eletrônicos;
 Alarmes;
 Funções Programadas

Obs:

VIII – Resultados Obtidos:

Rotações Medidas

Leitura	R.A. RPM	M.V.I.I. RPM
1	3000	2998
2	2000	1999
3	1000	1001

R.A. = Rotação Ajustada M.V.I.I. = Média dos Valores Indicados no Instrumento

Temperaturas Medidas:

Pontos de calibração °C	M.V.I.I. °C	Erro °C
10,0	10,3	0,3

V.R. = Valor Real M.V.I.I. = Média dos Valores Indicados no Instrumento

Conclusão: O equipamento referenciado atende os padrões necessários para utilização Hemocentro.

Executante: Eng. Orlando Junior CREA: 5061155059	Coordenador Técnico: Eng. Orlando Junior CREA: 5061155059	Gerente: Eng. Victor Piovezan CREA: 5062778420
---	--	---

Rua Pedro de Toledo, 795 – Vila Clementino – São Paulo – SP
Tel/Fax.: 5576 4412 / 5576 4627 / 5571 1127

Hemogram CRIANDO SOLUÇÕES **Relatório de Serviços** **Nº 005033**

Equipamento: Cell Dyn Modelo: Ruby Nº de Série: 3511286
Contato: Mauro
Cliente: HSP
Endereço: RUBY 02 Rev. Soft:
Cidade: São Paulo UF: SP
CEP: _____ DDD: _____ Telefone: _____ Ramal: _____
Fax: _____ Ramal: _____ E-mail: _____

Data da Chamada: 14/12/10 Hora da Chamada: 18:30 hs. Tempo de Locomoção: 0:00 hs.
Data do Atendimento: 15/12/10 Hora do Atendimento: 10:10 hs. Tempo de Serviço: 0:30 hs.
Data da Finalização: 15/12/10 Hora da Finalização: 10:10 hs.

Status do Equipamento:
 Equip. Novo - Instalação Garantia Locação T & M (a pagar) Contrato ST Demonstração

Descrição da Queixa:
manutenção Preventiva
feita em
proxim 06/2011

Descrição do problema:

Descrição da Solução:

Peças Utilizadas:			
Descrição da Peça	Quantidade	Código	Part Number

Para equipamentos fora de garantia e sem contrato de manutenção será feito orçamento prévio.
Garantia dos Serviços 90 dias.

Nome / Assinatura do Cliente: _____ Data: 15/12/10
Nome / Assinatura do Técnico: Ricardo Data: 15/12/10