


**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NO PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS DE RATOS WISTAR**

**EVALUATION OF PLATELET ACTIVATION IN PLATELET-RICH PLASMA  
FROM WISTAR RATS**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA EN PLASMA RICO EN  
PLAQUETAS DE RATAS WISTAR**

 <https://doi.org/10.56238/arev7n6-110>

**Data de submissão:** 10/05/2025

**Data de publicação:** 10/06/2025

**Letícia Arantes Carvalho**

Acadêmica de Medicina veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
campus Araçatuba  
Lattes: 1055960826962166

**Gabriel Gomes Cravero Bezerra**

Acadêmico de Medicina veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
campus Araçatuba  
Lattes: 4739084431506877

**Roberta Harumi Yamazaki da Silva**

Médica veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria especialista em Patologia Clínica pela  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Araçatuba  
Lattes: 3167649280746595

**Eliana Yurika Kimura**

Médica veterinária residente de Patologia Clínica na Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” campus Araçatuba  
Lattes: 7521398155511463

**Mayla Abbas Guimarães**

Médica veterinária e especialista em Patologia Clínica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” campus Araçatuba  
Lattes: 9694480328979138

**Carolina Utiyke de França Fabri**

Médica veterinária e especialista em Patologia Clínica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” campus Araçatuba  
Lattes: 0081958824130036

**Gabirela Gallo**

Médica veterinária e mestre em ciências fisiológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” campus Araçatuba  
Lattes: 2050118829140131

**Suely Regina Mogami Bomfim**

Médica veterinária pela Universidade Federal Rural da Amazônia e Professora Assistente Doutora da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Araçatuba  
Lattes: 4265888153674520

## RESUMO

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados contidos no plasma sanguíneo dos animais, as quais possuem extrema importância fisiológica, pois liberam proteínas e fatores de crescimento que influem na regeneração celular de tecidos moles e ósseos. Sua importância na medicina veterinária e humana levou ao estudo de biotecnologias que buscam reproduzir e intensificar sua função no organismo, como é o caso do plasma rico em plaquetas (PRP), o qual concentra um número de plaquetas de 3 a 5 vezes maior que o volume inicial. Existem diversos métodos de confecção do PRP, que divergem no número de vezes em que o plasma é centrifugado, número de rotações por minuto, e consequentemente, há variações nos resultados obtidos, como concentração e morfologia plaquetária. Este estudo teve como objetivo comparar dois protocolos de confecção do PRP que sejam de baixo custo e de fácil preparo para analisar laboratorialmente a morfologia e a integridade das plaquetas em ratos Wistar albinos com a finalidade de verificar possíveis alterações decorrentes da manipulação. Para tal, foram colhidas amostras de sangue por punção cardíaca com agulhas hipodérmicas e seringas descartáveis, contendo anticoagulante CPDA-1, de 12 ratos Wistar albinos, adultos, machos, previamente anestesiados com cetamina (60mg/kg) e xilasina (10mg/kg). As amostras foram aliqüotadas e acondicionadas em três tubos: 500 µL (sangue total) e 1500 µL em cada um dos dois tubos para obtenção do PRP por protocolos PRPS (Sonnleitner et al. (2000) modificado) e PRPV (Vendramin et al. (2006) modificado). Após a colheita, as amostras de PRP foram diluídas em V- 52D DILUENT e em seguida, foram realizadas as contagens de plaquetas das amostras de sangue total e de PRP em contador automático de células sanguíneas modelo BC-5000 Vet® (Sherzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd. Shenzhen. Guangdong China, assim como as amostras de PRP. Para a avaliação morfológica das plaquetas foram realizados esfregaços das amostras de sangue total e de PRP que foram coradas por coloração de Romanowsky para leituras em microscópio óptico; e para a avaliação do marcador de ativação plaquetária foi utilizado o método ELISA, para mensuração do fator 4 plaquetário. A análise estatística foi realizada no programa Jamovi (versão 2.4.11), com análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Shapiro-Wilk. Os resultados da contagem plaquetária revelaram que as concentrações plaquetárias estavam de acordo com as propostas por Marx et al. (1998). A avaliação morfológica das plaquetas dos esfregaços de ST (68±22%) , PRPS (74±18%) e PRPV (75±14%) não diferiram entre os grupos. Da mesma forma, a quantidade de fator 4 plaquetário não diferiu entre os grupos

**Palavras-chave:** Morfologia. Fator 4 plaquetário. Plasma rico em plaquetas. Roedores.

## ABSTRACT

Platelets are anucleated cell fragments contained in the blood plasma of animals, which are extremely important physiologically because they release proteins and growth factors that influence the cellular regeneration of soft and bone tissues. Their importance in veterinary and human medicine has led to the study of biotechnologies that seek to reproduce and intensify their function in the body, such as platelet-rich plasma (PRP), which concentrates a number of platelets 3 to 5 times greater than the initial volume. There are several methods for preparing PRP, which differ in the number of times the plasma is centrifuged, the number of rotations per minute, and, consequently, there are variations in the results obtained, such as platelet concentration and morphology. This study aimed to compare two low-cost and easy-to-prepare PRP protocols to analyze the morphology and integrity of platelets in albino Wistar rats in order to verify possible changes resulting from manipulation. To this end, blood

samples were collected by cardiac puncture with hypodermic needles and disposable syringes containing CPDA-1 anticoagulant from 12 adult male albino Wistar rats previously anesthetized with ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The samples were aliquoted and stored in three tubes: 500  $\mu$ L (whole blood) and 1500  $\mu$ L in each of the two tubes to obtain PRP by PRPS (Sonnleitner et al. (2000) modified) and PRPV (Vendramin et al. (2006) modified) protocols. After collection, the PRP samples were diluted in V-52D DILUENT, and then platelet counts were performed on the whole blood and PRP samples using a BC-5000 Vet® automatic blood cell counter (Sherzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd. Shenzhen, Guangdong, China), as well as the PRP samples. For the morphological evaluation of the platelets, smears of the whole blood and PRP samples were stained with Romanin B (1:1000) and stained with Romanin B (1:1000). Guangdong China, as were the PRP samples. For morphological evaluation of platelets, smears of whole blood and PRP samples were stained with Romanowsky stain for optical microscope readings; and for evaluation of the platelet activation marker, the ELISA method was used to measure platelet factor 4. Statistical analysis was performed using the Jamovi program (version 2.4.11), with analysis of variance (ANOVA), followed by the Shapiro-Wilk test. The platelet count results revealed that platelet concentrations were in accordance with those proposed by Marx et al. (1998). The morphological evaluation of platelets from ST ( $68 \pm 22\%$ ), PRPS ( $74 \pm 18\%$ ), and PRPV ( $75 \pm 14\%$ ) smears did not differ between groups. Similarly, the amount of platelet factor 4 did not differ between groups.

**Keywords:** Morphology. Platelet factor 4. Platelet-rich plasma. Rodents.

## RESUMEN

Las plaquetas son fragmentos celulares sin núcleo contenidos en el plasma sanguíneo de los animales, que tienen una gran importancia fisiológica, ya que liberan proteínas y factores de crecimiento que influyen en la regeneración celular de los tejidos blandos y óseos. Su importancia en la medicina veterinaria y humana ha llevado al estudio de biotecnologías que buscan reproducir e intensificar su función en el organismo, como es el caso del plasma rico en plaquetas (PRP), que concentra un número de plaquetas de 3 a 5 veces mayor que el volumen inicial. Existen varios métodos de preparación del PRP, que difieren en el número de veces que se centrifuga el plasma, el número de rotaciones por minuto y, en consecuencia, hay variaciones en los resultados obtenidos, como la concentración y la morfología plaquetaria. El objetivo de este estudio fue comparar dos protocolos de elaboración del PRP que son de bajo costo y fáciles de preparar para analizar en laboratorio la morfología y la integridad de las plaquetas en ratas Wistar albinas con el fin de verificar posibles alteraciones derivadas de la manipulación. Para ello, se tomaron muestras de sangre mediante punción cardíaca con agujas hipodérmicas y jeringas desechables, que contenían anticoagulante CPDA-1, de 12 ratas Wistar albinas, adultas, machos, previamente anestesiadas con cetamina (60 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Las muestras se dividieron en alícuotas y se colocaron en tres tubos: 500  $\mu$ L (sangre total) y 1500  $\mu$ L en cada uno de los dos tubos para obtener el PRP mediante los protocolos PRPS (Sonnleitner et al. (2000) modificado) y PRPV (Vendramin et al. (2006) modificado). Tras la recogida, las muestras de PRP se diluyeron en V-52D DILUENT y, a continuación, se realizaron los recuentos de plaquetas de las muestras de sangre total y PRP en un contador automático de células sanguíneas modelo BC-5000 Vet® (Sherzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd. Shenzhen. Guangdong China, al igual que las muestras de PRP. Para la evaluación morfológica de las plaquetas se realizaron frotis de las muestras de sangre total y PRP que se tiñeron con colorante Romanowsky para su lectura en microscopio óptico; y para la evaluación del marcador de activación plaquetaria se utilizó el método ELISA, para la medición del factor 4 plaquetario. El análisis estadístico se realizó en el programa Jamovi (versión 2.4.11), con análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Shapiro-Wilk. Los resultados del recuento plaquetario revelaron que las concentraciones plaquetarias estaban de acuerdo con las propuestas por Marx et al. (1998). La evaluación morfológica de las plaquetas de los

frotis de ST ( $68 \pm 22 \%$ ), PRPS ( $74 \pm 18 \%$ ) y PRPV ( $75 \pm 14 \%$ ) no difirió entre los grupos. Del mismo modo, la cantidad de factor 4 plaquetario no difirió entre los grupos.

**Palabras clave:** Morfología. Factor 4 plaquetario. Plasma rico en plaquetas. Roedores.

## 1 INTRODUÇÃO

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados de megacariócitos (HARVEY, 2012), os quais contêm três tipos de organelas maiores: grânulos alfa, lisossomos e corpos densos. Nos grânulos alfa encontramos fibrinogênio, fator 4 plaquetário, proteína 140 da membrana do grânulo (GMP-140), P-selectina, CD62p, trombospondina, beta-tromboglobulina e fatores de crescimento, os quais são liberados com a ativação das plaquetas e possuem função de pró-coagulação, anti-heparínica e promoção de crescimento celular (MASSABIK, P. S. et al, 2004), tornando-se essenciais no processo de cicatrização de tecidos moles e ósseos (ZECHNER et al. 2003).

Após ativação, as plaquetas sofrem diversas alterações bioquímicas e morfológicas com liberação do conteúdo dos grânulos (KICKLER, 2006). Portanto, mensurando os níveis séricos destes marcadores, podemos inferir se houve ativação plaquetária, principalmente quando há a presença das proteínas fator 4 plaquetário e beta-tromboglobulina, as quais são existentes apenas nas plaquetas. (KAPLAN, 1981)

Tendo em vista a importância das plaquetas para manutenção da fisiologia animal, este estudo consistiu na confecção do plasma rico em plaquetas (PRP), considerado um volume de plasma autólogo, com concentração de plaquetas (3 a 5 vezes do volume plaquetário inicial). Essa pesquisa foi necessária para avaliar se as plaquetas e seus fatores de crescimento seriam ativados durante a manipulação sanguínea e seu armazenamento, gerando gastos econômicos.

Alguns cuidados, porém, foram tomados quanto ao preparo das amostras e a interpretação dos resultados. A expressão das glicoproteínas da membrana plaquetária pode variar conforme o tipo de anticoagulante empregado, a solução tampão utilizada para o preparo, o tempo gasto no processamento da amostra até a fixação com paraformaldeído, a presença de fibrina ou FVW na solução e a natureza do anticorpo monoclonal empregado. Além disso, deve ser considerado o investimento inicial na aquisição de um citômetro de fluxo, a necessidade de calibrações frequentes e de pessoal técnico especializado.

Entre os métodos de mensuração da ativação plaquetária, temos o radioimunoensaio (RIA), o ensaio imunoenzimático (ELISA), um teste quantitativo considerado de fácil interpretação; e a citometria de fluxo, um método considerado mais acurado mas não quantitativo (MASSABIK, P. S. et al, 2004).

Neste estudo, foram utilizados o ELISA e a análise de esfregaço de sangue e PRP, para avaliação da morfologia plaquetária.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a integridade das plaquetas nas amostras de PRP obtidas por dois protocolos. PRPS (Sonnleitner et al. (2000)) modificado e PRPV (Vendramin et al. (2006)) modificado.

### 2.2 ESPECÍFICO

Analisar a concentração plasmática de fator 4 plaquetário, assim como a morfologia das plaquetas em amostras de sangue total e PRP de ratos Wistar.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 12 *Rattus norvegicus* machos, adultos, linhagem Wistar, com peso corpóreo médio de 450g. Os roedores foram acondicionados em caixas de polipropileno (dois por caixa) sob condições ambientais padronizadas com ciclo de 12h claro/escuro, temperatura de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , umidade relativa do ar controlada  $55 \pm 10\%$  e ciclo claro/escuro de 12/12 horas diárias. As caixas foram forradas com maravalha e trocadas em dias alternados. A alimentação foi proveniente de ração convencional para ratos e a água potável ad libitum.

### 3.2 CONFECÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Foram testados dois protocolos de dupla centrifugação para a obtenção do PRP em ratos Wistar albinos. Foram colhidas amostras de sangue por punção cardíaca com agulhas hipodérmicas e seringas descartáveis, contendo anticoagulante CPDA-1 de 12 ratos Wistar albinos, adultos, machos, previamente anestesiados com cetamina (60mg/kg) e xilasina (10mg/kg). As amostras foram aliquotadas e acondicionadas em três tubos: 500  $\mu\text{L}$  (sangue total) e 1500  $\mu\text{L}$  em cada um dos dois tubos para obtenção do PRP por protocolos estabelecidos pelos autores Sonnleitner et al. (2000) modificado - PRPS e Vendramin et al. (2006) modificado - PRPV.

- PRPS: A amostra foi submetida à primeira centrifugação a 160 G por 20 minutos. A porção doplasma foi pipetada até um ponto abaixo da linha que separa o plasma das hemácias (de 1 a 3 mm abaixo) e centrifugada por 15 minutos a 400 G. Em seguida a fração superior do plasma (plasma pobre em plaquetas - PPP) foi separada, e o restante sendo considerado um concentrado de plaquetas, o PRP.

- PRPV: A amostra foi submetida à primeira centrifugação a 300 G por 10 minutos. A porção do plasma foi pipetada até um ponto abaixo da linha que separa o plasma das hemácias (de 1 a 3 mm abaixo) e centrifugada por 10 minutos a 640 G. Em seguida, a fração superior do plasma (PPP) foi separada, e o restante sendo considerado um concentrado de plaquetas, o PRP.

Após a colheita, as amostras de PRP foram diluídas em V- 52D DILUENT e em seguida, foram realizadas as contagens de plaquetas das amostras de sangue total e de PRP em contador automático de células sanguíneas modelo BC-5000 Vet® (Sherzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd. Shenzhen. Guangdong Chiina, assim como as amostras de PRP.

### 3.3 EXAMES LABORATORIAIS

Para a avaliação morfológica das plaquetas foram realizados esfregaços das amostras de sangue total e de PRP que foram corados por corantes do tipo Romanowsky. e para a análise da concentração plasmática de fator 4 plaquetário foi realizado o ELISA.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa Jamovi (versão 2.4.11). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Shapiro-Wilk, sendo considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ . Resultados: Os valores médio e desvio padrão defator 4 plaquetário obtidos para ST, PRPS e PRPV foram  $10,14 \pm 1,8$  ng/mL,  $10,47 \pm 2,19$  ng/mL e  $10,08 \pm 2,07$  ng/mL, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,908$ ). Conclusões: Diante dos resultados obtidos, concluímos que não houve influência da manipulação no preparo do PRP quando comparado com o sangue total.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Média e desvio padrão da plaquetometria do sangue total (ST), plasma rico em plaquetas Sonnleitner (PRPS), plasma rico em plaquetas Vendramin (PRPV) e da concentração de plaquetas do PRPS e PRPV de ratos Wistar

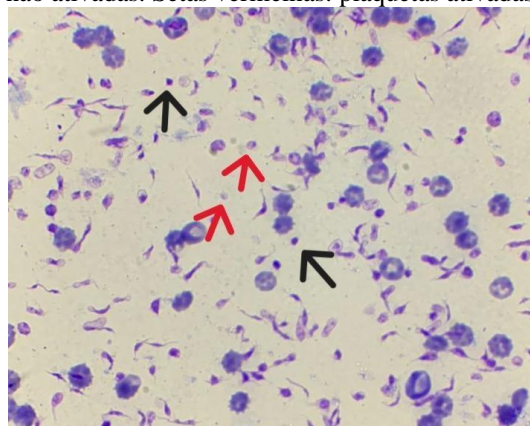
Amostras	ST ( $\mu$ L)	PRPS ( $\mu$ L)	PRPV ( $\mu$ L)	PRPS (%)	PRPV (%)
Média	813.500	4.210.000	3.215.333	511	392
Desvio padrão	108.762	1.694.095	808.037	168	73

Fonte: pelo autor



Diante dos resultados da contagem plaquetária realizado no contador automático de células sanguíneas, as concentrações de plaquetas obtidas pelos dois protocolos estão de acordo com Marx et al. (1998) (Tabela 1).

**Figura 1.** Esfregaço do plasma rico em plaquetas de ratos Wistar corado por coloração de Romanowsky. Morfologia plaquetária. Setas pretas: plaquetas não ativadas. Setas vermelhas: plaquetas ativadas



Fonte: Pelo autor

**Tabela 2.** Média e desvio padrão da porcentagem de ativação plaquetária em amostras de sangue total (ST), plasma rico em plaquetas Sonleitner (PRPS), plasma rico em plaquetas Vendramin (PRPV) de ratos Wistar.

	Plaquetas não ativadas	Plaquetas ativas	Porcentagem de ativação (%)
ST	64±45	135±45	68±22
PRPS	52±35	148±35	74±18
PRPV	49±27	151±27	75±14

Fonte: pelo autor

Na avaliação morfológica dos esfregaços de sangue total e PRP, não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de ativação plaquetária dos ST, PRPS e PRPV ( $P=0,447$ ) (Tabela 2 e Figura 1).

#### 4.1 VALORES DE FATOR 4 PLAQUETÁRIO

Os valores médios e desvios padrão de fator 4 plaquetário obtidos para ST, PRPS e PRPV foram  $10,14 \pm 1,8$  ng/mL,  $10,47 \pm 2,19$  ng/mL e  $10,08 \pm 2,07$  ng/mL, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,908$ ).



## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, a confecção do plasma rico em plaquetas dos protocolos descritos por Sonleitner e por Vendramin e o sangue total não apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de ativação plaquetária. Portanto, concluímos que não houve influência da manipulação no preparo do PRP na ativação plaquetária.

## REFERÊNCIAS

- HARVEY, J. W. Veterinary Hematology. A diagnostic guide and color Atlas. **Editora Elsevier**. 2012.
- KAPLAN KL, Owen J. **Plasma levels of Beta- thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo**. Blood 57: 199-202, 1981.
- LANDI EP et al. **Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo**, Rev. bras. hematol. hemoter., Campinas, 2003;25(1):39-46.
- MASSABIK, P. et al. Ativação Plaquetária na Esclerose Sistêmica e Alternativas Metodológicas para sua Avaliação. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 62-9, jan./fev., 2004
- KICKLER, T. S. Platelet biology – an overview. **Journal Compilation**, v. 2, p.79–85, 2006.
- SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, p. 879-882, 2000.
- VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Rev Col Bras Cir**, v. 31, n. 1, p. 24- 28, 2006.
- ZECHNER, W. et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. **Int. J. Oral maxillofac. Implants**, v. 18, n. 1, p. 15-22, Jan./Feb. 2003.