



**Contemporânea**

*Contemporary Journal*

3(3): 1257-1267, 2023

ISSN: 2447-0961

**Artigo**

# **PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS A PARTIR DA ESPÉCIE *RATTUSNORVEGICUSALBINUS* (LINHAGEM *WISTAR*) PARA MANIPULAÇÃO LABORATORIAL – NOTA TÉCNICA**

PROTOCOL FOR THE PRODUCTION OF PLATELET RICH FIBRIN FROM *RATTUSNORVEGICUSALBINUS* SPECIES (*WISTAR* STRAIN) FOR LABORATORY MANIPULATION - TECHNICAL NOTE

DOI: 10.56083/RCV3N3-005

Recebimento do original: 17/01/2022

Aceitação para publicação: 13/02/2023

## **Bruno Botto de Barros da Silveira**

Doutor em Implantodontia

Instituição: Faculdade Anhanguera

Endereço: Avenida Vina Filho, 8544, Salvador - BA

E-mail: bbotto81@gmail.com

## **Jorge Moreira Pinto Filho**

Doutor em Odontologia

Instituição: Faculdade Anhanguera

Endereço: Avenida Vina Filho, 8544, Salvador - BA

E-mail: jorgeodonto@gmail.com

## **Elizabeth Ferreira Martinez**

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Faculdade São Leopoldo Mandic - Campinas

Endereço: Rua José Rocha Junqueira, Nº 13, Swift, CEP: 01345-477, Campinas – SP, Brasil

E-mail: bbotto81@gmail.com

**RESUMO:** Cicatrizes teciduais, assim como quantidade e qualidade do tecido periodontal são aspectos de grande importância para o sucesso de procedimentos cirúrgicos. A literatura demonstra diversos animais utilizados no intuito de estudar o processo de reparo tecidual, sendo os roedores,



principalmente os ratos, os animais mais frequentemente escolhidos para pesquisas laboratoriais na atualidade. Desta forma, o objetivo desta nota técnica é apresentar uma alternativa para a produção de fibrina rica em plaquetas (PRF), coletadas a partir do sangue de animais da espécie *Rattus Norvegicus Albinus* (linhagem *Wistar*), para utilização em pesquisas laboratoriais.

**PALAVRAS-CHAVE:** PRF, sangue, ratos wistar, reparo sem sutura.

**ABSTRACT:** Tissue scars, as well as periodontal tissue quantity and quality, are aspects of great importance for the success of surgical procedures. The literature shows several animals used in order to study the process of tissue repair, and rodents, especially rats, are the most frequently chosen animals for laboratory research nowadays. Thus, the aim of this technical note is to present an alternative for the production of platelet-rich fibrin (PRF), collected from the blood of animals of the species *Rattus Norvegicus Albinus* (Wistar strain), for use in laboratory research.

**KEYWORDS:** PRF, blood, wistar rats, sutureless repair.



## 1. Introdução

Cicatrizes teciduais, assim como quantidade e qualidade do tecido periodontal são aspectos de grande importância para o sucesso de procedimentos cirúrgicos. Pesquisas focadas no desenvolvimento de estratégias para reduzir o tamanho ou prevenir cicatrizes, na tentativa de melhorar o processo de reparação, são cada vez mais necessárias e valorizadas (Dohan, et al. 2006 e Kang, et al. 2011).

As Fibrinas Ricas em Plaquetas (do inglês, platelet-rich fibrin -PRF) são concentrados plaquetários que proporcionam tratamentos autólogos com potencial para estimular o processo biológico natural da cicatrização e auxiliar na regeneração de diversos tecidos, inclusive da pele (Choukroun, et



al. 2006 e Ehrenfest, et al. 2009). Faz-se necessário pesquisas consistentes a respeito dos efeitos biológicos da PRF nos processos de cicatrização e reparo tecidual, buscando proporcionar subsídios científicos que fundamentem seu uso clínico (Zimmermann, et al. 2001 e Dohan, et al. 2006).

A literatura demonstra diversos animais utilizados no intuito de estudar o processo de cicatrização tecidual, sendo os mamíferos os que mais se assemelham ao homem no tocante à deposição de colágeno nas feridas (Cohen; Mast, 1990 e Padilha, et al. 2018). Os roedores, principalmente os ratos, são seguidamente escolhidos devido ao baixo custo, à facilidade de transporte e obtenção e pelo pouco espaço que ocupam (Cohen; Mast, 1990 e Lichtenfels, et al. 2013). Entretanto, em razão das diferenças biológicas apresentadas por esses animais, os protocolos empiricamente estabelecidos para a obtenção de PRF em seres humanos parecem não propiciar a formação de malhas de fibrina adequadas a partir do sangue destes animais. Desta forma, alguns ajustes aos protocolos tradicionais de utilização e manipulação em laboratório se fazem necessários (Cohen; Mast, 1990 e Oliveira, et al. 2015).

O objetivo desta nota técnica é apresentar uma alternativa para a produção de PRF, a partir do sangue coletado de animais da espécie *Rattus Norvegicus Albinus* (linhagem *Wistar*), para utilização em pesquisas laboratoriais.

## **2. Método de Obtenção do PRF**

Para a obtenção do PRF a partir de um modelo animal não humano, faz-se necessário alguns ajustes de protocolo para melhor desempenho do material e melhor preparo macroestrutural.



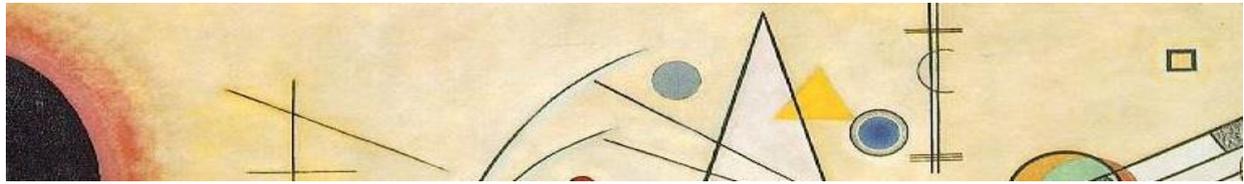
## 2.1 Modelo Animal

Foi utilizado como modelo animal a espécie *Rattus Norvegicus Albinus* (linhagem *Wistar*) machos, com peso de 300g e 3 meses de idade. Inicialmente, os animais foram submetidos à anestesia por via intramuscular, com associação do anestésico Cloridato de Quetamina (1mg/100g de peso) e do Cloridrato de Xilazina (2mg/100g de peso). Todos os preceitos éticos foram seguidos e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética No Uso Animal da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic (Campinas- Protocolo No 2018/023).

## 2.2 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma estrutura rígida e tiveram seus membros superiores e inferiores fixados com fitas adesivas. Com o auxílio de uma tesoura Goldeman Fox (Quinelato® Schobell Industrial Ltda. Rio Claro, SP, Brasil), foi realizado um corte horizo horizontal 2mm abaixo do osso esterno e 2 cortes verticais paramedianos ao mesmo osso. Seguidamente, fez-se o rebatimento do esterno superior, permitindo acesso direto ao coração com o mínimo de sangramento possível Figura 1).

Utilizando um *scalp* 21 no sistema a vácuo, faz-se a punção diretamente no ventrículo esquerdo do animal (Figura 2). Em razão do rápido processo de coagulação do sangue nessa espécie de animal, para a obtenção do coágulo de fibrina, preconizamos a utilização de tubos de 10mL, de plástico (Vacutube Seco, Biocon®, Brasil), sem qualquer ativador de coagulação, característica inerente a este material. Para um animal com aproximadamente 300g de peso corporal, aproximadamente de 6-8mL de sangue são obtidos por animal. Após a coleta, o tubo foi posicionado em uma centrífuga de bancada (Centrífuga Ditigal Spinplus, Spinlab®), equilibrada por peso com tubo no mesmo volume de água.



### 2.3 Protocolo de centrifugação e produção da fibrina

Utilizou-se um protocolo de centrifugação de 400 G, (2500 rpm) por 12 minutos. Feito isto, após 20 minutos de estagnação para a formação da membrana posteriormente à centrifugação, os tubos foram abertos de forma delicada, evitando homogeneização do sangue (Figura 3). Utilizando uma pinça reta (Quinelato® Schobell Industrial Ltda. Rio Claro, SP, Brasil) foi realizado o pinçamento da fibrina produzida, e com o auxílio de uma espátula para manipulação de fibrina (Maximus®, Belo Horizonte, MG, Brasil) foi destacado o restante de glóbulos vermelhos presos na região do *buffycoat*. Em seguida, a fibrina foi colocada em um estojo (Maximus®, Belo Horizonte, MG, Brasil) para desidratação.

### 2.4 Destino dos Animais

Em razão da quantidade de sangue coletado e diante de um quadro iminente de choque hipovolêmico, foi aplicado cloreto de potássio no coração, visando uma parada cardíaca, com o animal ainda anestesiado. Desta forma, nenhum sofrimento foi gerado ao animal. Os animais eutanasiados foram colocados em sacos para lixo biológico e encaminhados para congelamento, seguido da incineração.

## 3. Discussão

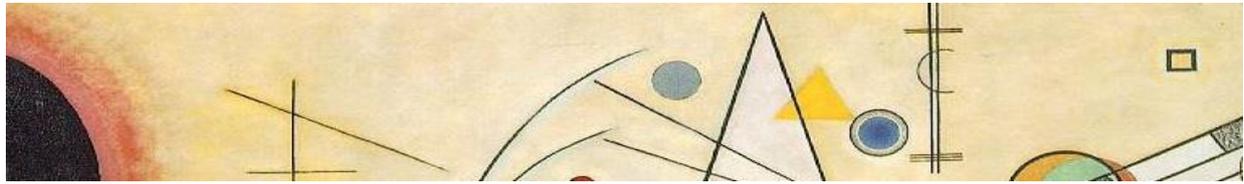
A utilização de ratos e outros modelos animais nas práticas laboratoriais, envolvendo a produção e aplicação da PRF é uma realidade. A PRF na sua fase de membrana, vem sendo utilizada para diversas aplicabilidades clínicas. O protocolo inicialmente proposto para a produção de membranas de PRF foi a partir dos estudos de Choukroun, o qual preconizou a utilização de tubos com ativadores de coágulo (Choukroun, et



al. 2006). Esse protocolo vem sendo descrito por diversos trabalhos da literatura, mesmo quando utilizado em animais de laboratório.

Na prática laboratorial, percebe-se que o tempo de coagulação do sangue do animal difere do sangue humano. Em algumas espécies, como o *Rattus Norvegicus Albinus* (linhagem *Wistar*), há uma coagulação sanguínea (Plaquetas ratos *Wistar*  $863,6 \pm 120,7 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) mais rápida quando comparamos com o sangue humano (Plaquetas humanos  $150 - 450 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) (Cohen; Mast, 1990 e Padilha, et al. 2018). Desta forma, a produção da membrana de fibrina nos protocolos Choukroun, não pareceram capazes de formar fibrinas com o padrão macroestrutural viável para ser utilizado em pesquisas.

O elevado número de plaquetas destes modelos animais permite a utilização de tubos de plástico sem aditivos ou ativadores de coagulação para a produção do coágulo de fibrina, permitindo que este siga o protocolo de centrifugação sem que haja a coagulação antes mesmo da centrifugação. Estes mesmos tubos não são capazes de formar coágulos quando preenchidos com sangue humano, sendo utilizados para a obtenção de fibrina em sua fase líquida (também denominada de fibrinogênio). Ao utilizarmos tubos de vidro (preconizados para obtenção de coágulos de fibrina a partir de sangue humano), para centrifugar o sangue dos ratos, o mesmo coagula antes do processo de centrifugação conseguir separar os elementos figurados do sangue por densidade, inviabilizando a separação entre as hemácias e a malha de fibrina. Consideramos que com esta técnica pode-se produzir as membranas de fibrina, a partir do sangue coletado em ratos da espécie *RattusNorvegicusAlbinus* (linhagem *Wistar*) com um padrão macroestrutural e manutenção de qualidades biológicas viáveis para ser utilizado nas pesquisas laboratoriais.



## Referências

Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006). *Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 101(3), e37–e44.*

Kang YH, Jeon SH, Park JY, et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* 2011;17:349–359

Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.-O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., ... Dohan, D. M. (2006). *Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 101(3), e56–e60.*

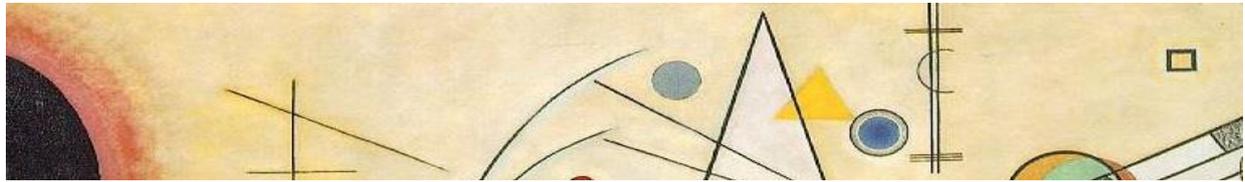
Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends in Biotechnology, 27(3), 158–167.*

Zimmermann, R., Jakubietz, R., Jakubietz, M., Strasser, E., Schlegel, A., Wiltfang, J., & Eckstein, R. (2001). *Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. Transfusion, 41(10), 1217–1224.*

Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006). *Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 101(3), e45–e50.*

COHEN, I. K., & MAST, B. A. (1990). *Models of Wound Healing. The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care, 30, 149–154.*

Padilha, W., Soares, A., Navarro-Junior, H., Joly, J., Peruzzo, D., Napimoga, M., & Martinez, E. (2018). *Histologic Evaluation of Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin in the Inflammatory Process and Repair of Noncritical Bone Defects in the Calvaria of Rats. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 33(6), 1206–1212.*



Lichtenfels, M., Colomé, L., Sebben, A. D., & Braga-Silva, J. (2013). *Effect of platelet rich plasma and platelet rich fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. Microsurgery, 33(5), 383–390.*

Oliveira MR, deC Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR Jr, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015;44:649–655.



## ANEXOS

Figura 1: acesso cirúrgico permitindo acesso ao coração do rato





Figura 2: punção do ventrículo esquerdo com auxílio de um escalpe no 23 com sistema à vácuo



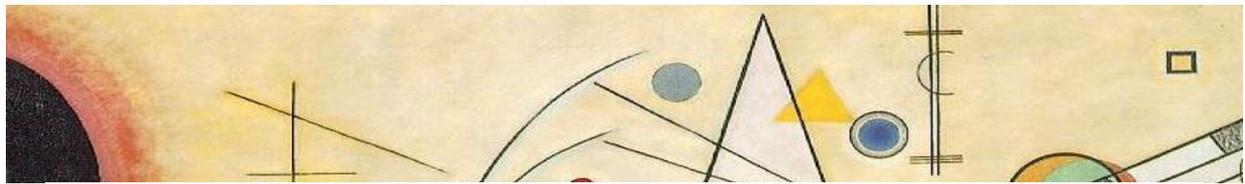


Figura 3: coágulo de fibrina formado num tubo de plástico sem aditivo ou ativador de coagulação após o processo de centrifugação

