

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

INFLUÊNCIA DO ANTICOAGULANTE NA OBTENÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO
DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM EQUINOS E MUARES

ANA LUÍSA SOARES DE MIRANDA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2016

Ana Luísa Soares de Miranda

INFLUÊNCIA DO ANTICOAGULANTE NA OBTENÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO
DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM EQUINOS E MUARES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Silveira Palhares

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2016

M672i Miranda, Ana Luísa Soares de, 1988-
Influência do anticoagulante na obtenção e criopreservação do plasma rico em plaquetas em equinos e muares / Ana Luísa Soares de Miranda. – 2016.
78 p. : il.

Orientadora: Maristela Silveira Palhares
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Zootecnia
Inclui bibliografia

1. Equino – Teses. 2. Muar – Teses. 3. Anticoagulantes – Teses. 4. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. – Teses. 5. Plaquetas (Sangue) – Teses. I. Palhares, Maristela Silveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

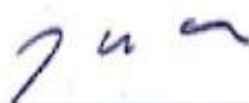
CDD – 636.108 96

Dissertação defendida e aprovada em 29 de janeiro de 2016, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Maristela Silveira Palhares

Presidente – Orientadora



Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes

Escola de Veterinária – UFMG



Profa. Priscila Fantini

Faculdade Univértix

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Laíse e Wander, sempre dispostos a me incentivar em todo e qualquer sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Maristela Silveira Palhares, pela orientação sempre carinhosa desde os tempos da minha residência médica. Sua competência como clínica e professora é inspiração constante para o meu crescimento profissional. Agradeço imensamente a paciência durante todos esses anos, mas sou grata principalmente pela confiança depositada em mim e pela credibilidade que tive como aluna e como médica veterinária. O aprendizado imenso que tive no Galpão de Equinos da Escola de Veterinária da UFMG não seria possível sem a orientação firme, porém sempre maternal, dessa professora experiente e que sempre me inspirou um aprimoramento constante, por meio do amor e dedicação aos cavalos.

A meu pai, Wander, por ser o exemplo de professor que sempre me encantou pela sua arte e paixão de ensinar o que se ama. À minha mãe, Laíse, por ser essa presença iluminada no meu dia a dia, sempre me lembrando sobre o que é realmente importante na vida. Agradeço aos dois pelo apoio e pelo incentivo a me dedicar ao que sempre amei: os cavalos. À minha irmã, Ana Helena, pela amizade e o carinho de sua presença. Ao meu irmão João, por dividir comigo o amor incondicional aos animais.

Aos meus queridos amigos do Galpão de Equinos, Paula Lopes, Natália Bernstein, Jorge Tibúrcio e Débora Spila, pela ajuda indispensável nos dias de experimento, sempre com um sorriso no rosto e um abraço pronto para ser dado em qualquer momento. Aos enfermeiros da clínica, Sebastião Alves e Isabel Marques, por compartilharem o conhecimento enorme que cada um traz de suas vidas e por se tornarem tão fundamentais na minha. Aos estagiários do Galpão, Álvaro Augusto e Jéssica Guerra, pela amizade e pela ajuda sempre espontânea e sorridente. À minha eterna R1, Iolanda Gea Kassem, por dividir comigo sonhos e risadas.

A Priscila Fantini, por despertar o meu interesse pelo PRP, pela amizade e pela ajuda fundamental em todos os momentos do meu mestrado. À Profa. Renata Maranhão, pela amizade, conselhos e sorrisos. À Profa. Fabíola Paes Leme e ao Prof. Paulo Ricardo Paes pela amizade, pelo acesso ao Laboratório de Patologia Clínica e pela ajuda no es-

clarecimento de dúvidas. Ao Prof. Benito Soto Blanco, pela disponibilização do aparelho hematológico e pela convivência sempre agradável no laboratório de Toxicologia.

Aos meus irmãos de coração, Luan Gavião Prado e Raphael Mattoso Victor, sempre presentes e dispostos a tornarem o meu dia mais leve, mais engraçado e com mais amor. Obrigada por serem parte da minha vida e por deixarem eu fazer parte da de vocês. Ao Raphael agradeço por dividir comigo a responsabilidade de coordenar o nosso querido grupo de estudos EMIE e pela ajuda nos dias de experimento. Ao Luan, agradeço pelas oportunidades de palestras e por me proporcionar o conhecimento de novos horizontes profissionais.

Às minhas queridas amigas veterinárias: Elisa Penna, Laura Vargas, Fernanda Guimarães, Maria Gazzinelli, Mayara Gonçalves, Cíntia Santos, Paula Cardeal, Ana Cláudia Parreiras, Ana Carolina Leite, Érika Procópio, Ludmilla Gomes, Alice Maletta e Anna Luiza Fachetti, pela presença constante na minha vida, sempre me fazendo sorrir.

Aos meus companheiros de residência e mestrado, Stephanie Tavares, Ronaldo Alves, Matheus Lóes e Jéssica Fontana, pela amizade consolidada durante todos esses anos, pela somatória das alegrias e pelos sorrisos sempre sinceros.

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, em especial a Cássia Gomes, pela amizade tão linda e pela confiança na realização de atividades no NAPq. Aos queridos tratadores chefiados pelo Sr. Nacir, obrigada pelo carinho e cuidado com o qual os animais do meu experimento foram sempre tratados. Ao meu amigo Francisco, o Côco, agradeço pela confiança em me emprestar um de seus animais e o carinho gratuito.

Aos cavalos, razão pela qual a felicidade será sempre presente na minha vida. Transformar a minha maior paixão em profissão é um privilégio. Agradeço a esses animais tão maravilhosos pelas oportunidades de aprendizado, pela empatia na felicidade e no sofrimento, e por refletirem amor de uma forma tão ímpar. Agradeço a Catarina, a mais especial dentre todos os cavalos que conheci, pela sua personalidade forte e contagiante vontade de viver, pelos sorrisos que me proporcionou, pelos “netinhos” que me presenteou e por me ensinar a ver esperança em cada paciente que atendi.

Vivendo, se aprende; mas o que se aprende,
mais, é só a fazer outras maiores perguntas.

João Guimarães Rosa

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Plaquetas: morfologia, funções e conceitos	15
2.2 Plasma Rico em Plaquetas	18
2.3 Processamento	24
2.4 Criopreservação	28
2.5 Muales: características, origem e particularidades clínico-laboratoriais	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais.....	37
3.2 Coleta e processamento	38
3.3 Avaliação das amostras de PRP.....	38
3.4 Criopreservação	40
3.5 Análise estatística	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Avaliação do sangue total: comparação dos anticoagulantes entre as espécies	41
4.2 Efeito do anticoagulante na obtenção do PRP em equinos e muales	47
4.3 Criopreservação do PRP em equinos e muales	52
5. CONCLUSÕES	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA/UFGM.....	77
ANEXO 2: DADOS BRUTOS ANIMAIS E7 E M1.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas de série vermelha em amostras de sangue total (EDTA, ACD e CS) em equinos e muares	42
Tabela 2	Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas de séries branca e plaquetária em amostras de sangue total (EDTA, ACD e CS) em equinos e muares.....	43
Tabela 3	Valores médios \pm erro padrão de parâmetros hematológicos de sangue total (EDTA, ACD e CS) e PRP e morfológicos de PRP, obtido em dois anticoagulantes (ACD e CS) e em duas espécies (equinos e muares).....	49
Tabela 4	Valores médios \pm erro padrão de contagens plaquetárias realizadas em aparelho hematológico pocH-100Iv-Diff® e contagem manual em câmara de Neubauer, de PRP obtido nos anticoagulantes ACD e CS, para as espécies equina e muar.....	50
Tabela 5	Valores médios \pm erro padrão de parâmetros morfológicos avaliados em microscopia óptica de inversão de fases e fixação com formolsalina do conteúdo plaquetário de PRP fresco obtido em dois anticoagulantes (ACD e CS) e em duas espécies (equina e muar).....	52
Tabela 6	Valores médios \pm erro padrão de parâmetros hematológicos de PRP fresco e congelado (ambos com crioprotetor DMSO e glicose 5%) obtidos de equinos e muares utilizando-se dois anticoagulantes (ACD e CS).....	55
Tabela 7.	Contagem plaquetária em aparelho hematológico e câmara de Neubauer de PRP fresco e congelado (ambos com crioprotetor DMSO e glicose 5%) obtidos de equinos e muares, de acordo com o anticoagulante (ACD e CS)	56
Tabela 8	Valores médios \pm erro padrão de parâmetros morfológicos avaliados em microscopia óptica de inversão de fases e fixação com formolsalina do conteúdo plaquetário de PRP fresco e criopreservado obtido em dois anticoagulantes (ACD e CS) e em duas espécies (equina e muar).....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fatores de crescimento e suas principais funções.....	23
Figura 2.	Análise morfológica plaquetária em formolsalina avaliada por microscopia óptica de inversão de fase. As setas numeradas indicam as diferentes classificações: 1: estado inativado; 2: estado incerto de ativação; 3: estado ativado (emissão de pseudópodes).....	39
Figura 3.	Container utilizado para o resfriamento lento, pré-congelamento do PRP. A) Visão interior do container, com amostras prontas para Refrigeração. B) Visão exterior do container utilizado no presente experimento..	40

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L: microlitros
ACD: citrato dextrose
ACTH: hormônio adrenocorticotrópico
ADP: difosfato de adenosina
ATP: trifosfato de adenosina
CO₂: dióxido de carbon
CTDA: citrato teofilina dipiridamole adenosina
CS: citrato de Sódio
DMSO: dimetil sulfóxido
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF: FC epidermal
FC: fatores de crescimento
FDA: *Food and Drug Administration*
FvW: Fator de von Willebrand
g: gauss
HCT: hematócrito
HGB: concentração de hemoglobina
HGF: FC do hepatócito
IGF-1: FC tipo I semelhante à insulina
IL-1 β : Interleucina-1 β
L-PRF: Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
L-PRP: PRP rico em leucócitos
LDH: lactato desidrogenase
LINFpc: porcentagem de linfócitos do total de leucócitos
LINFptot: linfócitos absolutos
MCV: volume corpuscular médio
MCH: hemoglobina corpuscular média
MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média
Morf Inativada: plaquetas em estado morfológico inativado
Morf Incerta: plaquetas em estado morfológico incerto
Morf Ativada: plaquetas em estado morfológico ativado

VPM: Volume plaquetário médio

NF- κ B: cadeia luminosa *kappa* de células B

OUTROSpC: porcentagem de neutrófilos, monócitos e basófilos do total de leucócitos

OUTROStot: neutrófilos, monócitos e basófilos absolutos

P-PRF: Fibrina Rica em Plaquetas puro

P-PRP: PRP puro

PAF: Fator de ativação plaquetária

PDGF: FC derivado de plaquetas

PDW: amplitude de distribuição de plaquetas

PLCR: índice de macrotrombócitos.

PLT: contagem de plaquetas

PLT AUMOT: contagem plaquetária em aparelho hematológico

PLT NEUBAUER: contagem plaquetária manual realizada em câmara de Neubauer.

PSL: *Platelet Storage Lesion*; Lesão Plaquetária de Armazenamento

rpm: Rotações por minuto

RBC: contagem de eritrócitos

RDWSD: largura da curva de distribuição de eritrócitos (desvio padrão)

RDWCV: largura da curva de distribuição de eritrócitos (coeficiente de variação)

SCA: sistema de canalículos abertos

TEM: microscopia eletrônica de transmissão

TGF- β 1: Fator β de crescimento transformante

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

VEGF: FC endotélio vascular

WBC: contagem de leucócitos

RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto biológico utilizado na promoção de melhor reparo tecidual, por meio dos fatores de crescimento presentes em sua composição. O objetivo do presente trabalho foi comparar a viabilidade da criopreservação das plaquetas de muare e equinos e a influência de dois anticoagulantes – citrato dextrose (ACD) e citrato de sódio (CS). Foram utilizados oito animais de cada espécie, com duas replicações cada. O PRP foi obtido em uma centrifugação única de 131g, durante oito minutos. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido após serem submetidas à curva de resfriamento controlado. Foi utilizado uma solução de DMSO a 3% em glicose como criopreservante. As análises foram feitas em aparelho hematológico e na câmara de Neubauer; a avaliação morfológica foi feita em microscopia óptica de contraste de fases. A concentração plaquetária do PRP em relação ao sangue total foi de 1,42 vezes para equinos e 2,00 vezes para muare, em ACD; e 1,39 vezes para equinos e 2,69 vezes para muare utilizando-se o CS. O protocolo utilizado foi mais efetivo em concentrar as plaquetas de muare do que de equinos, embora a qualidade do PRP congelado tenha sido semelhante nas duas espécies. Constatou-se o aumento das células em estado ativado nas amostras criopreservadas, independente da espécie ou anticoagulante empregado. A contagem de plaquetas em ACD e CS, no sangue total, foi mais fidedigna do que a contagem no EDTA para a produção do PRP. Baseando-se na premissa de que a presença leucocitária é deletéria à qualidade do PRP, o anticoagulante CS mostrou-se mais eficiente na redução de leucócitos totais em relação ao ACD, em ambas as espécies. Por não haver diferenças significativas entre a qualidade do PRP criopreservado obtido entre os diferentes anticoagulantes empregados (principalmente em parâmetros morfológicos plaquetários), sugere-se o CS como melhor anticoagulante na obtenção do PRP em equinos e muare. Aplicações clínicas são necessárias para validar os efeitos biológicos do PRP, fresco e criopreservado, especialmente em muare, que mostraram particularidades hematológicas em relação aos equinos.

Palavras-chave: anticoagulantes, cavalos, congelamento, equídeos, terapia regenerativa.

ABSTRACT

Platelet-Rich Plasma (PRP) is a biological product often used to promote tissue repair, due to its composition of growth factors. The aim of this study was to compare the viability of platelet cryopreservation on two species, horses and mules, and the influence of two different anticoagulants – dextrose citrate (ACD) and sodium citrate (SC). Eight animals of each species were used, with two replicas each. PRP was obtained after single centrifugation at 131 g in eight minutes. Samples were frozen in liquid nitrogen after exposure to a controlled cooling rate. A solution of glucose and 3% DMSO was used as a cryoprotectant. Blood analysis were performed on hematologic analyzer, Neubauer chamber and morphology was evaluated through optical microscopy of phase inversion. Platelet concentration on PRP when compared to total blood samples were 1,42 times in horses and 2,00 in mules, using ACD; and 1,39 times in horses and 2,69 times in mules using SC. The protocol was more efficient in concentrating mules' platelets when compared to horses', although both species cryopreservation had similar quality. There was a significant increase of cells in activated status after cryopreservation, despite the species or anticoagulant employed. Platelet count on ACD and SC, on total blood, was more truthful in ACD and SC when compared to EDTA, in order to establish PRP parameters. Based upon the negative effects of leukocytes on PRP, SC was more efficient in reducing total leukocyte count when compared to ACD on both species. Due to the fact that there was no significant differences between cryopreserved PRP and the anticoagulants employed (especially regarding morphology parameters of platelets), it is suggested that SC was a better anticoagulant to obtain PRP on both mules and horses. Clinical trials should be performed, especially in mules, due to its hematological distinctive features when compared to horses.

Key-words: anticoagulants, equids, freezing, horses, regenerative therapy.

1. INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto biológico, utilizado para a promoção de melhor reparo tecidual, por meio dos fatores de crescimento presentes em sua composição. Essa terapia possui diversas vantagens sobre os tratamentos convencionais, por proporcionar um tratamento personalizado, pouco invasivo e com aceleração da recuperação funcional, além de oferecer baixo risco devido a sua natureza autóloga (Anitua *et al.*, 2012; Textor e Tablin, 2013).

Considerado como promissora terapia regenerativa na medicina equina, o PRP vem sendo descrito como eficiente na redução da efusão e da dor com seu uso intra-articular em equinos (Abellanet e Prades, 2009), em tecidos moles do sistema locomotor (Textor, 2011; Duarte *et al.*, 2014) e em casos de laminite (Carmona *et al.*, 2013).

No entanto, a literatura é escassa no que concerne ao comportamento das plaquetas de asininos e muares, principalmente quando submetidas a estocagem em baixas temperaturas. A criopreservação adequada das plaquetas diminuiria o custo da terapia, assim como o estresse e o risco decorrentes do transporte desses animais para a sua realização.

O objetivo do presente trabalho é comparar a criopreservação das plaquetas de muares e equinos, com a avaliação da viabilidade pré e pós congelamento e a influência de dois anticoagulantes – citrato dextrose (ACD) e citrato de sódio (CS).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plaquetas: morfologia, funções e conceitos

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, derivados de células-tronco hematopoéticas pluripotentes (Lassen e Swardson, 1995; Stockham e Scott, 2011). Meyers *et al.* (1982) propuseram o conceito de as plaquetas serem consideradas como células secretórias, com armazenamento de uma rica variedade de substâncias em seus grânulos. Esse conceito está sendo retomado na literatura mais atual, uma vez que as plaquetas se demonstram cada vez mais presentes na fisiopatologia de doenças humanas relevantes como a hipertensão arterial e aterosclerose (Pande *et al.*, 1993), e também na medicina veterinária, em especial na clínica médica equina, nos casos de endotoxemia, laminite e afecções do trato gastrointestinal (Paes Leme *et al.*, 2006; Segura *et al.*, 2006; Brunso *et al.*, 2010; Piccione *et al.*, 2010). Assim, plaquetas po-

dem ser conceituadas como células complexas, multifuncionais e com capacidade imunomodulatória (McFarland *et al.*, 2005).

O processo de trombopoiese é complexo e dependente de diversos fatores transcricionais e bioquímicos, assim como de alguns hormônios, destacando-se a trombopoetina. A medula óssea fornece as suas células endoteliais para realizar o suporte de proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas, por meio do contato direto e liberação de citocinas. Um progenitor megacariocítico-eritróide gera os megacariócitos, que por sua vez nutrem as células endoteliais medulares via secreção de fatores de crescimento. Megacariócitos passam por endomitose, na qual anáfase, telófase e citocinese não são realizadas havendo, portanto, a divisão do DNA sem a divisão celular. A diferenciação terminal do megacariócito ocorre após a completa endomitose e a ocorrência da invaginação da membrana plasmática, que resulta, por sua vez, na formação do sistema de demarcação membranária, essencial para a formação e extensão das pró-plaquetas. A migração transendotelial e formação de pró-plaquetas são dependentes da interação de megacariócitos com as células endoteliais medulares via moléculas de adesão, como a integrina $\alpha 4\text{-}\beta 1$. A síntese dos grânulos ocorre simultaneamente à formação do sistema de demarcação membranária e consequente formação das pró-plaquetas. Estas são morfológicamente descritas como longas estruturas que se fragmentam ao serem submetidas às forças de cisalhamento nos capilares sinusóides da medula óssea e na própria circulação sanguínea. Esse processo consome todo o citoplasma do megacariócito e seu núcleo é direcionado para uma via apoptótica (Boudreaux, 2010).

As plaquetas participam em vários processos da hemostasia, destacando-se a sua função na formação dos tampões plaquetários (*plugs*). A *adesão plaquetária* ocorre em um primeiro momento, entre as plaquetas e os componentes subendoteliais, após a injúria vascular, consistindo na fase primária da hemostasia. A *agregação plaquetária*, por sua vez, ocorre após o início da adesão plaquetária, consistindo na concentração de mais plaquetas no local de injúria, graças às plaquetas já atuantes no local, formando-se dessa forma o *plug* plaquetário. A agregação também conta com a participação de substâncias agonistas, como trombina, colágeno, difosfato de adenosina (ADP) e epinefrina. As plaquetas oferecem a superfície e os receptores para a formação dos complexos de fatores envolvidos na cascata de coagulação - fase da hemostasia secundária - (Lassen e Swardson, 1995), além de uma matriz para a migração de células responsáveis pela formação tecidual, como fibroblastos (responsáveis pela formação do colágeno) e células

endoteliais (envolvidas na angiogênese). Dessa forma, há o remodelamento do coágulo para novo tecido cicatricial (Eppley *et al.*, 2003).

Pelagalli *et al.* (2003) compararam a adesão plaquetária em diferentes espécies. Observaram-se as plaquetas equinas com maior capacidade de adesão, seguidas das plaquetas de seres humanos, de suínos, de bubalinos e de ovinos, respectivamente. Meyers *et al.* (1982) citam as plaquetas equinas como detentoras de grandes quantidades de ADP, promovendo uma maior ativação dos receptores de fibrinogênio, e consequente maior capacidade de adesão das plaquetas na espécie.

Morfologicamente, as plaquetas são compostas por uma membrana fosfolipídica que contém glicoproteínas atuantes na interação entre células e fosfolipídeos necessários para a coagulação; um citoesqueleto que mantém a forma discóide e permite a alteração de forma pós ativação; um sistema tubular de retículo endoplasmático que armazena cálcio e atua na síntese de tromboxano; α -grânulos que armazenam os fatores de crescimento (FC) atuantes na hemostasia e reparo tecidual e vascular; grânulos contendo cálcio, magnésio, serotonina, ADP e trifosfato de adenosina (ATP), além de reservas de glicogênio e mitocôndrias, importantes no fornecimento energético celular (Stockham e Scott, 2011). Harris *et al.* (2012) também ressaltam que, além dos FC, as plaquetas contêm histamina, fibrinogênio, fibronectina, complemento c5a e fator de *von Willebrand* (FvW), categorizados como importantes mediadores químicos. Gader *et al.* (2008), ao compararem a ultraestrutura plaquetária entre camelos, seres humanos, bovinos e equinos, constataram serem as plaquetas equinas as que possuem menor tamanho e os α -grânulos mais organizados, com ausência do sistema de canalículos abertos (SCA) (conectado à superfície da membrana e presente nas plaquetas de seres humanos). De acordo com Brunso *et al.* (2010), em equinos, a secreção do conteúdo presente nos grânulos deveria ocorrer por uma rota alternativa, uma vez que o SCA é ausente na espécie. Nesse trabalho, foi possível confirmar que os grânulos se fundem uns com os outros, formando cadeias na superfície da membrana celular, com posterior liberação do conteúdo para o ambiente externo à célula. Diferentemente das plaquetas de seres humanos, as plaquetas de equinos possuem proteínas de fusão na membrana dos grânulos intraplaquetários, havendo uma maior fosforilação da proteína SNAP-23. Os autores concluíram ser essa via de excreção predominante sobre os mecanismos contráteis de reorganização citoesquelética na espécie equina, corroborando com Segura *et al.* (2006).

2.2 Plasma Rico em Plaquetas

2.2.1 Conceito e Classificação

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto biológico utilizado nas medicina veterinária e humana com o objetivo de promover uma melhor qualidade do reparo tecidual através dos FC presentes em sua composição (Textor e Tablin, 2013). Textor e Tablin (2012) ressaltam algumas características atrativas da terapia com PRP: coleta minimamente invasiva, preparação rápida e fácil, baixo custo e aparente eficácia clínica. Anitua *et al.* (2012) relatam ser essa terapia personalizada e menos invasiva que as convencionais, reduzindo a morbidade e acelerando a recuperação funcional.

O PRP, para receber essa denominação, deve possuir uma concentração de plaquetas significativamente maior quando comparado ao sangue total, não estando diretamente relacionado a obrigatoriedade de as plaquetas estarem em estado ativado (Textor, 2011). Marx (2004) pontua que uma concentração de 4 a 5 vezes maior de plaquetas deve ser encontrada no PRP em comparação com o sangue total para receber essa denominação. No entanto, Baksh *et al.* (2013), ao realizar uma extensa revisão sobre o uso do PRP em tendões, observou que a concentração plaquetária descrita na literatura consultada variou de 1,5 a 10 vezes no PRP em relação à concentração original do sangue total. Fontenot *et al.* (2012) ressaltam que a contagem plaquetária no sangue total de equinos está entre uma das mais baixas dentre os mamíferos e que, valores extrapolados da literatura de seres humanos, sugeridos como concentrações ideais no PRP, podem não se adequar à espécie equina. Esses autores ainda frisam que essa extrapolação da literatura humana também não leva em consideração a distinta fisiologia dos mecanismos de degranulação e do conteúdo de FC por plaqueta da espécie equina.

Anitua *et al.* (2012) ressaltam que a falta de um padrão relacionado ao PRP reflete seus efeitos controversos na literatura. Ehrenfest *et al.* (2008) propuseram uma classificação do PRP, uma vez que os autores pontuam que todos os produtos descritos e estudados na literatura são denominados “PRP”, não havendo distinção entre os sistemas de obtenção e protocolos seguidos. Esses autores determinaram três fatores relevantes ao realizar a classificação proposta:

1. Fator A: Refere-se às características práticas de cada técnica, relacionando-se com os *kits* de preparo e as centrífugas utilizadas. Dessa forma, tem-se os subfatores: A1 (relacionado ao tamanho da centrífuga), A2 (relacionado à duração do procedimento), A3

(relacionado ao custo do sistema ou dispositivo empregado) e A4 (relacionado com a ergonomia do *kit* escolhido e a complexidade do procedimento).

2. Fator B: Refere-se ao conteúdo do concentrado e, portanto, ao seu futuro potencial regenerativo ou de reparo tecidual. Tem-se os subfatores B1 (relacionado ao volume total do concentrado obtido), B2 (relacionado à eficácia da coleta plaquetária), B3 (relacionado a eficácia de coleta de leucócitos) e B4 (relacionado a preservação do estado inativado de plaquetas e leucócitos durante todo o procedimento).
3. Fator C: Refere-se a rede de fibrina do composto e é dividido em C1 (relacionado à concentração de fibrinogênio da amostra) e C2 (relacionado ao processo de polimerização da fibrina utilizado).

Pontuações são atribuídas a cada um dos fatores e subfatores supracitados e tem-se quatro variedades de PRP, nomeadas PRP puro (P-PRP), PRP rico em leucócitos (P-PRP), Fibrina Rica em Plaquetas puro (P-PRF) e Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF).

Na mesma tentativa de obtenção de uma padronização relativa, DeLong *et al.* (2012) propuseram o sistema PAW (*Platelet-Activation-White cells*) de classificação do PRP. Os autores destacam a necessidade de uma padronização para permitir a comparação dos resultados na literatura. Para tal, ressalta-se a importância da documentação de dados acurados em relação a concentração de plaquetas no composto, a presença ou ausência de ativadores e a concentração leucocitária (quando presente). Uma letra é atribuída a cada uma das características supracitadas, produzindo uma sigla que permitiria a identificação e comparação de todos os PRP descritos na literatura.

2.2.2 Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento representam uma das famílias moleculares mais importantes nos processos de cicatrização, sendo vastamente estudados para a melhor compreensão de suas funções (Molloy *et al.*, 2003).

Bennet e Schultz (1993) relatam que os FC foram inicialmente descobertos devido à sua habilidade em estimular continuamente a mitose das células quiescentes. Tal fato os diferencia dos elementos essenciais, cofatores e nutrientes, todos necessários nos processos metabólicos, porém incapazes de iniciar a divisão celular. Anitua *et al.* (2012) definem os FC como polipeptídeos que atuam como ferramentas na comunicação intercelular, mediando diversas funções

celulares, das quais destacam-se: migração, proliferação, diferenciação, metabolismo e apoptose. Molloy *et al.* (2003) pontuam que os FC possuem, em sua maioria, efeitos dose-dependente e necessitam de receptores específicos para serem ativos, trabalhando em sinergia com outras moléculas sinalizadoras.

Dos FC armazenados e secretados pelos α -grânulos das plaquetas, destacam-se os papéis do fator β de crescimento transformante (TGF- β 1 e TGF- β 2), FC derivado de plaquetas (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB), FC epidermal (EGF), FC endotélio vascular (VEGF) e proteínas biologicamente ativas como o FC tipo I semelhante à insulina (IGF-1) e FC do hepatócito (HGF). Os concentrados de plaquetas, portanto, são fontes de FC autólogos (Anitua *et al.*, 2005; Anitua *et al.*, 2012), que por sua vez são importantes na quimiotaxia de monócitos e macrófagos, atração e proliferação de fibroblastos e na regulação da transcrição de proteínas de matriz extracelular como fibronectina, colágeno e glicosaminoglicanos (Argüelles *et al.*, 2005; Theoret, 2005). As principais funções dos diferentes FC encontram-se descritas abaixo e resumidas na Fig. 1.

- PDGF: Consiste de duas cadeias polipeptídicas termoresistentes com dímeros AA, AB e BB. É primariamente um mitogênico de células de origem mesenquimal, como fibroblastos, osteoblastos e adipócitos, estimulando a formação de colágeno tipo I e promovendo indiretamente a angiogênese via ativação de macrófagos. A exposição ao PDGF estimula o DNA e a síntese protéica em tecidos ósseos, atuando na sua formação e reabsorção. O PDGF atua como um quimioatrativo para células de musculatura lisa, fibroblastos, macrófagos e leucócitos. Seu efeito é dependente da presença de outros fatores de crescimento. Aparentemente seu efeito mais significativo ocorre nos estágios primários do processo cicatricial, em que participa da indução de outros FC, como o IGF-1. Também atua na fase de remodelamento, estimulando proteínas relacionadas ou não à produção de colágeno, assim como a síntese de DNA, de forma dose-dependente (Bennet e Schultz, 1993; Molloy *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2012);
- TGF- β : Molécula regulatória que age de formas autócrina e parácrina, é um dos FC mais atuantes, uma vez que receptores para o mesmo são abundantes em todo o organismo. É o único FC capaz de inibir o crescimento de vários tipos celulares, principalmente as de origem ectodérmica, como queratinócitos e leucócitos. É um fraco mitogênico no que concerne células de origem mesodérmica, como fibroblastos. Um meca-

nismo fundamental antiproliferativo (catabólico) do TGF- β é sua habilidade em antagonizar os efeitos mitogênicos de outros FC, como o supracitado PDGF. Além disso, o TGF- β tem a capacidade de estimular a angiogênese e a produção de fibronectina, glicosaminoglicanos e colágeno, atuando na fase de remodelamento (Bennet e Schultz, 1993; Molloy *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2012);

- VEGF: Suas funções mais efetivas encontram-se nas fases de proliferação e remodelamento. Este FC é indutor de quimiotaxia e proliferação de células endoteliais, promovendo a angiogênese e a hiperpermeabilidade de vasos sanguíneos. Atua, ainda, como fator mitogênico e pró-apoptótico, promovendo a quimiotaxia e diferenciação de células epiteliais, renais, gliais e dos fibroblastos. A expressão do gene que codifica o VEGF é regulada por respostas a estímulos biológicos e biomecânicos, os quais destacam-se hipóxia tecidual, a presença de outros FC e interleucinas e durante a osteogênese (Molloy *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2012);
- IGF-1: Este FC possui 47% de homologia com a insulina e estimula o crescimento cartilaginoso, a formação de matriz óssea e a replicação de pré-osteoblastos e osteoblastos. Nas células osteoblásticas é capaz de aumentar a atividade da fosfatase alcalina. É mais ativo nas fases inflamatória e proliferativa e, em sinergia com o PDGF, é capaz de aumentar a velocidade e a qualidade do reparo tecidual. Também atua como promotor da migração de células vasculares endoteliais para o local de injúria, resultando em aumento da neovascularização (Bennet e Schultz, 1993; Molloy *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2012);
- EGF: Possui efeito mitogênico e quimiotático sobre fibroblastos e células epiteliais. É um indutor de migração celular e estimula a formação de tecido de granulação. Estimula a fosforilação de proteínas regulatórias, ativando-as. Dessa forma, ocorrem alterações na fisiologia celular, como a liberação do cálcio intracelular do retículo endoplasmático, o aumento no transporte de glicose e aminoácidos e a transcrição de genes importantes para a mitose. Células como fibroblastos, pré-osteoblastos e pré-condrócitos expressam um grande número de receptores para EGF (Bennet e Schultz, 1993; Anitua *et al.*, 2012);

- HGF: Quimiotático e mitogênico de células epiteliais, de ampla ação em diversos órgãos, causa hiperplasia de tecidos, além de promover angiogênese e neovascularização. O HGF atua sobre a morfogênese tubular de células epiteliais e endoteliais. Possui efeito aditivo com o VEGF na proliferação de células endoteliais e efeito sinérgico também com VEGF na migração celular. O próprio HGF induz a expressão do VEGF, de forma parácrina, amplificando o efeito angiogênico de ambos (Anitua *et al.*, 2005).

Fator de crescimento	Abreviação	Principais funções	Referência Bibliográfica
FC derivado de plaquetas (dímeros AA, AB e BB)	PDGF-AA PDGF-BB PDGF-AB	Mitogênico, estimula formação de colágeno tipo I, atua no metabolismo ósseo e como quimioatrativo.	Bennet e Schultz (1993); Molloy <i>et al.</i> (2003); Sánchez <i>et al.</i> (2003); Anitua <i>et al.</i> (2012).
Fator β de crescimento transformante (1 e 2)	TGF- β 1 TGF- β 2	Inibe o crescimento de vários tipos celulares e estimula a produção de glicosaminoglicanos e colágeno.	Bennet e Schultz (1993); Molloy <i>et al.</i> (2003); Sánchez <i>et al.</i> (2003); Anitua <i>et al.</i> (2012).
FC endotélio vascular	VEGF	Promove a angiogênese e hiperpermeabilidade de vasos sanguíneos, além da diferenciação celular.	Molloy <i>et al.</i> (2003); Anitua <i>et al.</i> (2012).
FC tipo 1 semelhante à insulina	IGF-1	Estimula crescimento cartilaginoso e formação da matriz óssea, além de promover a migração celular.	Bennet e Schultz (1993); Molloy <i>et al.</i> (2003); Sánchez <i>et al.</i> (2003); Anitua <i>et al.</i> (2012).
FC epidermal	EGF	Mitogênico, indutor de migração celular, esti-	Bennet e Schultz (1993); Anitua <i>et al.</i> (2012).

		mula a formação de tecido de granulação.	
FC do hepatócito	HGF	Quimiotático, mitogênico e com efeito angiogênico, principalmente em conjunto com o VEGF.	Anitua <i>et al.</i> (2005).

Figura 1. Fatores de crescimento e suas principais funções

Anitua *et al.* (2005) observaram diferenças entre as concentrações de FC entre diversos doadores (humanos) e que estas eram correlacionadas positivamente com a contagem plaquetária, corroborando com Molloy *et al.* (2003). O'Shaughnessey *et al.* (2014) constataram que citocinas anti-inflamatórias e FC são mais facilmente concentradas no sangue de pacientes humanos acometidos com osteoartrite quando comparados com pacientes sem quaisquer doenças, dando o primeiro passo na comprovação de que a qualidade do PRP produzido pode ser também devido à presença de condições patológicas, considerada como fator intrínseco de qualidade. Giraldo *et al.* (2013) observaram o efeito do sexo, raça e idade no conteúdo celular e de FC em PRP obtido de equinos, fatores também considerados intrínsecos na determinação da qualidade do PRP.

Bosh *et al.* (2011) avaliaram o efeito do PRP em lesões tendíneas na espécie equina e observaram a presença de neovascularizações nas lesões após única aplicação da terapia. Os autores especulam que a maior vascularização contribui para o efeito prolongado do PRP no local da injúria e pontuam a maior necessidade de pesquisas relacionadas a essa particularidade. Anitua *et al.* (2006) afirmam ser o ideal a aplicação dos FC localmente, com o objetivo de seguir uma cinética específica para mimetizar ao máximo os requerimentos do tecido que sofreu a injúria. Isto levaria à sua atuação durante as diferentes fases cicatriciais *in situ*. Tsuzuki *et al.* (2014) relatam que a baixa meia-vida biológica dos FC criam a necessidade da aplicação do PRP o mais próximo possível de seu alvo de ação e em um ambiente que os proteja de degradações desnecessárias. No entanto, Lindemann *et al.* (2001) pontuam que o efeito do PRP pode ser mais prolongado do que se pensava anteriormente, uma vez que as plaquetas ativadas são responsáveis pela mediação da cascata inflamatória, via síntese de Interleucina-1 β (IL-1 β). Dessa forma, as plaquetas são capazes de influenciar a resposta inflamatória durante várias horas, uma vez que a síntese de IL-1 β é originada da tradução direta do RNAm plaquetário e induzida pela

presença do fator de ativação plaquetário (PAF), ADP, colágeno e epinefrina, abundantes no local de injúria tecidual. Marx *et al.* (1998), ao estudarem a influência dos FC em enxertos ósseos, observaram que, mesmo após 6 meses do início da terapia, o enxerto demonstrou produção contínua de TGF- β , provavelmente sintetizado por fibroblastos e pré-osteoblastos, com atuação parácrina ou autócrina. Esses autores afirmam que a secreção contínua de TGF- β influencia osteoblastos a depositar matriz óssea e fibroblastos a depositar matriz colágena para suportar o crescimento capilar. Os autores especulam que apesar da vida plaquetária no local da injúria ser menor do que 5 dias, a extensão de seus efeitos se dá via dois mecanismos: o primeiro, com a ativação de células tronco e sua maturação em osteoblastos, que secretam seu próprio TGF- β ; e o segundo, consiste na quimiotaxia de macrófagos que substituem as plaquetas como fonte primária de FC após o terceiro dia de aplicação da terapia.

Marx (2004) ressalta que a ação do PRP como um estímulo ao mecanismo cicatricial mais rápido, não sendo capaz de induzir tumores e possuindo segurança, uma vez que se trata de um produto autólogo.

2.3 Processamento

2.3.1 Processamento Geral

Segundo Baksh *et al.* (2013), a literatura é inconsistente no que se refere ao processamento do PRP, principalmente no que concerne seu modo de preparo, à concentração de plaquetas do composto e à citologia. Broeckx *et al.* (2014) pontuam que as amostras de PRP, devido aos seus diferentes protocolos de obtenção, possuem diferentes potências, contribuindo para os diferentes resultados da terapia observados na literatura. Yokomura *et al.* (1999) relatam ser a coleta sanguínea rápida – acima de 60ml/min – propícia a causar ativação e agregação durante a coleta, resultando em taxas de recuperação plaquetárias menores e conceituado como um erro processual.

DeLong *et al.* (2012), após extensa revisão, ilustraram a existência de dois métodos de obtenção do PRP: o primeiro, baseado na obtenção do plasma sanguíneo, tem seu foco na exclusão leucocitária, concentrando de 2 a 3 vezes o número de plaquetas em relação ao sangue total, obtido em baixas rotações por minuto (rpm) na centrifugação única; o segundo, denominado *Buffy-coat*, teria um maior poder de concentração plaquetária (3 a 8 vezes) e também leucocitária, necessitando para tal da elevação do número de rpm e tempo total de centrifugação. Nagata *et*

al. (2010) ressaltam ser a dupla-centrifugação capaz de causar alterações morfológicas de plaquetas, além de ser um método mais susceptível a erros de processamento.

Filardo *et al.* (2011) compararam dois protocolos de obtenção de PRP de sangue de seres humanos. O primeiro com centrifugação única e o segundo com centrifugação dupla. De acordo com os autores, a centrifugação única não resultou em leucócitos nas amostras e concentrou de 1 a 3 vezes a quantidade de plaquetas em relação ao sangue total. A centrifugação dupla, por sua vez, concentrou de 4 a 8 vezes as plaquetas e 1,4 vezes os leucócitos em relação ao sangue total. No ensaio clínico do mesmo trabalho, os resultados obtidos em pacientes com osteoartrite foram semelhantes nos dois grupos, porém, no grupo de dupla centrifugação (com maior concentração de leucócitos) ocorreram reações adversas não observadas no grupo de centrifugação única (sem leucócitos).

Especula-se sobre a ação dos leucócitos nas aplicações intra-articulares. Alguns autores pontuam os efeitos deletérios das proteases e do oxigênio reativo liberados pelos leucócitos, estimulando a liberação prematura dos FC (Nagata *et al.*, 2010). Outros autores relatam os efeitos benéficos na prevenção de infecção, por serem os leucócitos fonte de citocinas e enzimas, atuando também na síntese de PDGF e VEGF e no estímulo a liberação de FC pelas plaquetas (Andrade *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; Filardo *et al.*, 2011; Fontenot *et al.*, 2012). Fontenot *et al.* (2012) demonstraram estarem os leucócitos positivamente correlacionados com a expressão de citocinas catabólicas e negativamente com a expressão de matriz óssea, apesar de possuírem função imunomodulatória capaz de acelerar o reparo tecidual. Zimmermann *et al.* (2003) afirmam que os níveis de FC no PRP são influenciados pelas plaquetas em conjunto com os leucócitos, e que estes contribuem substancialmente para a concentração de FC no PRP. Os autores concluíram que a variação na concentração de TGF- β 1 depende primariamente do número de plaquetas, tendo como covariável o número de monócitos e que a concentração de PDGF-BB depende, além da presença das plaquetas, da presença de leucócitos. A concentração de PDGF-AB, nesse estudo, dependeu somente da fonte plaquetária. McCarrel *et al.* (2012), ao realizarem um estudo *in vitro* de tendinopatia equina, constataram que o PRP rico em leucócitos (L-PRP) possuía maior expressão de IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α), ressaltando a contribuição dos leucócitos para a expressão de citocinas inflamatórias nos explantes tendíneos. Os autores concluíram que a inflamação permanente promovida pela presença de leucócitos resulta em reparo inferior do tecido cicatricial. Por outro lado, Bendinelli *et al.* (2010), ao estudarem culturas de condrócitos desafiadas com TNF- α , observaram que o PRP rico em leucócitos foi capaz

de reduzir a ativação do fator nuclear de aumento da cadeia luminosa κ de células B ativadas (NF- κ B), um mediador primário do processo inflamatório. Castillo *et al.* (2011) ressaltam que apesar de o L-PRP possuir uma maior concentração de FC em comparação ao P-PRP, são os neutrófilos os responsáveis por impedir a cicatrização tecidual pelo aumento da inflamação local. Portanto, um L-PRP sem neutrófilos seria desejável.

A preparação a campo do PRP equino e seu processamento pelo sistema de tubos geram dúvidas a respeito de sua inocuidade para aplicação nos tecidos e estruturas dos equinos, pelo clínico. A partir dessa premissa, Álvarez *et al.* (2010) realizaram um estudo focado na contaminação bacteriana no PRP. Neste estudo, bactérias foram isoladas da pele equina preparada para a coleta sanguínea de forma não-asséptica, garganta e mãos do técnico responsável pela coleta sanguínea e no ambiente onde o animal se encontrava durante a coleta. Concluiu-se nesse estudo que são seguros a coleta e processamento do PRP a campo, sem necessidade de câmara de fluxo laminar ou Bico de Bunsen, desde que técnicas assépticas de preparação e coleta sejam corretamente empregadas.

2.3.2 Anticoagulantes

Segundo Mody *et al.* (1999), o anticoagulante ideal deve evitar a ativação artefactual das plaquetas por tempo suficiente para o envio da amostra até o local de processamento. Além disso, deve manter a reserva funcional dessas células até o momento do teste, não interferindo com testes subsequentes e, ainda, permitindo a avaliação plaquetária *in vivo* (isto é, permitindo a detecção de fatores que evidenciam algumas características da célula no metabolismo, como por exemplo, glicoproteínas de membrana) e *in vitro*, tanto nas avaliações realizadas com o sangue total, quanto naquelas realizadas com compostos plaquetários isolados.

Segundo Marx (2000), o uso do anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), o mais comumente utilizado em exames hematológicos de rotina, não é recomendado, pois tem a capacidade de fragmentar as plaquetas e superestimar a concentração das mesmas na amostra estudada. Ahnadi *et al.* (2003), ao observarem as plaquetas via microscopia eletrônica de transmissão (TEM), constataram que plaquetas coletadas em EDTA aparentaram-se mais ativadas e contendo menos grânulos quando comparadas a amostras sanguíneas coletadas em citrato teofilina dipiridamole adenosina (CTDA).

Em 1968, Gardner, F. já destacava os problemas na preservação das plaquetas humanas e ressaltava como um anticoagulante próprio para plaquetas era de extrema importância. A descoberta da solução anticoagulante citrato dextrose A (ACD-A) permitiu 80% de recuperação plaquetária para posterior transfusão, reduzindo também os *clumps* plaquetários. O mesmo autor também relata o controle da agregação plaquetária durante a centrifugação pelo anticoagulante Citrato de Sódio (CS) (Gardner, 1968).

Giraldo *et al.* (2015) testaram o efeito da solução anticoagulante citrato dextrose A e B (ACD-A e ACD-B) e CS na contagem plaquetária e liberação de FC em PRP equino. Não houve diferença significativa entre os anticoagulantes na contagem total plaquetária, volume plaquetário médio (VPM) e amplitude de distribuição de plaquetas (PDW). No entanto, no ACD-B, houve uma tendência a uma influência negativa sobre a concentração de FC e contataram-se alguns benefícios do ACD-A em relação aos demais anticoagulantes. Em relação ao CS, o ACD-A tem vantagem no processamento manual, uma vez que o volume de seu tubo é 44% maior. O ACD-A também foi superior na preservação de propriedades estruturais e fisiológicas das plaquetas duas ou mais horas após a realização da coleta, implicando na recomendação do uso desse anticoagulante nas situações em que o processamento e transporte de amostras não sejam imediatos. Em estudo similar, porém utilizando PRP bovino, Carmona *et al.* (2014) compararam ACD-A e CS e obtiveram os seguintes resultados: concentração plaquetária do PRP em relação ao sangue total de 2,3 e 2,5, em CS e ACD-A, respectivamente. A contagem leucocitária foi significativamente maior, principalmente de linfócitos, no PRP obtido com CS em relação ao ACD-A.

2.3.3 Determinação da contagem plaquetária

A determinação precisa do número de plaquetas presente no PRP é fundamental, uma vez que todas as mensurações referentes a sua qualidade partem dessa premissa. A citometria de fluxo, nesse aspecto, é superior aos aparelhos hematológicos de rotina. A citometria de fluxo é uma técnica que permite avaliar a função plaquetária *in vivo* e *ex vivo*, proporcionando uma avaliação ampla da função plaquetária via detecção de glicoproteínas de membrana plaquetária, quantificando plaquetas ativadas circulantes, interações plaqueta-plaqueta e plaqueta-leucócito (ambos agregados) e mensurando a atividade pró-coagulante celular (Segura *et al.*, 2006). No entanto, o citômetro de fluxo é um aparelho caro, que requer amplo treinamento técnico, além de necessitar de constante padronização (Fantini, 2014). Esses entraves afastam as clínicas e veterinários

de campo de usufruírem dessa técnica. A contagem em câmara de Neubauer desponta como uma opção para uma contagem plaquetária confiável e que pode ser facilmente replicada por profissionais a campo. A contagem em câmara de Neubauer foi utilizada por Vendruscolo *et al.* (2012) durante a avaliação de protocolos de obtenção de PRP e por Fantini *et al.* (2016) ao analisarem a qualidade da criopreservação do PRP de equinos. Essa técnica manual de contagem plaquetária permite a contabilização individual das plaquetas, contornando algumas prováveis limitações apresentadas na contagem plaquetária pelos aparelhos hematológicos de rotina. As principais delas são: os *clumps* plaquetários são contados como uma única plaqueta, subestimando a contagem real; o PRP pode exceder o número máximo a ser contado pelo aparelho hematológico, requerendo, portanto, uma diluição da amostra de acordo com o limite linear do aparelho; o PRP é opticamente mais claro, podendo causar a aspiração incompleta pelo aparelho, que realizará uma contagem de pouca acurácia; os aparelhos de hematologia são calibrados para operar nos limites do sangue total, criando dúvidas nas contagens referentes a parâmetros existentes no PRP; um pacote veterinário (*Veterinary Package*) deve ser adquirido, uma vez que o aparelho deve ser capaz de discernir hemácias e plaquetas pelo tamanho, que são variáveis entre as espécies domésticas (Woodell-May *et al.*, 2005).

2.4 Criopreservação

2.4.1 Armazenamento de plaquetas

Na tentativa de ampliar o PRP como terapia regenerativa, a sua criopreservação com manutenção da função plaquetária se torna de grande valia para o clínico. A criopreservação propicia a coleta mais segura de maiores volumes de plaquetas para aplicações clínicas na medicina humana (Yokomuro *et al.*, 1999).

O maior tempo de prateleira dos compostos plaquetários criopreservados também cria uma facilidade logística de processamento e economia, pois as plaquetas de seres humanos, atualmente, são conservadas em temperatura ambiente (22°C) por no máximo cinco dias (Lozano *et al.*, 1999; Hornsey *et al.*, 2008; Shrivastava, 2009; Tynngård, 2009; Johnson *et al.*, 2014). Mesmo nesse curto tempo de armazenamento (cinco dias), ocorre uma perda de 20% na recuperação plaquetária. Se o tempo for ampliado para sete dias, mais 17% será perdido, além do alto risco de contaminação (AuBuchon *et al.*, 2004). Portanto, as plaquetas são as estruturas mais susceptíveis a contaminação bacteriana devido à sua armazenagem em temperatura ambiente, o que

reduz o seu tempo de prateleira quando comparadas à compostos como células vermelhas - mantidos a 4°C por 42 dias - e plasma - mantido congelado por até um ano (Rinalducci e Zola, 2015). O *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América (FDA) propõe critérios de recuperação e sobrevivência plaquetárias em bancos de sangue humano. O FDA propõe 66,7% de recuperação plaquetária pós armazenamento e 58% de sobrevivência no receptor, quando comparados com seus controles autólogos a fresco. No entanto, o FDA não especifica se essas mesmas metas nas plaquetas armazenadas podem ser extrapoladas para as criopreservadas (Dumont *et al.*, 2013).

2.4.2 Lesão plaquetária de armazenamento (*Platelet Storage Lesion*) e aspectos técnicos relevantes para uma criopreservação de qualidade

Segundo Shrivastava (2009), a lesão plaquetária de armazenamento (*Platelet Storage Lesion* - PSL) vem ganhando atenção de todos os clínicos, hematologistas e técnicos que trabalham no armazenamento de plaquetas. O mesmo autor define o PSL como a soma de alterações deletérias levando ao dano progressivo da estrutura e função plaquetárias, a partir do momento em que o sangue é retirado do doador até ser transfundido ao receptor.

Propriedades plaquetárias como estrutura, composição celular e habilidade de resposta a vários estímulos refletem a capacidade funcional plaquetária e são parâmetros a serem mantidos após armazenamento ou criopreservação (Shrivastava, 2009). No entanto, a perda da viabilidade da plaqueta é uma realidade, tanto no seu resfriamento (Beaujean, 2000) como no seu congelamento (Handin e Valeri, 1972). A condução de um bom protocolo de criopreservação plaquetária deve ocorrer de forma a minimizar a injúria celular durante o processo de congelamento e descongelamento – denominada crioinjúria. A crioinjúria pode resultar em extensa desidratação celular – denominado efeito da solução – e também na formação de microcristais de gelo intracelular – classificado como dano mecânico (Pfisterer *et al.*, 1969; Balint *et al.*, 2002).

Para o armazenamento plaquetário de sucesso, algumas variáveis devem ser levadas em consideração e Shrivastava (2009) pontua as principais. A primeira delas é a temperatura. A temperatura ideal para armazenamento dos compostos plaquetários oscila entre 22-24°C. A criopreservação é, portanto, por si só um desafio. A exposição da plaqueta ao frio causa mudanças morfológicas de discóide para esférico e o aparecimento de projeções na superfície devido a ativação da gelsolina (reação cálcio-dependente) e fosfoinositide, mediando a polimerização da

actina. Segundo Brunso *et al.* (2010), essa polimerização da actina nas células equinas é baixa, uma vez que a sua exocitose, como já mencionado anteriormente, ocorre por fusão na membrana celular ao invés de contração citoesquelética, como ocorre nas plaquetas de seres humanos. O complexo do receptor plaquetário FvW (GPIb) forma um *cluster* no resfriamento que se liga a receptores $\alpha\beta 2$ de integrina de macrófagos hepáticos, resultando em um rápido *clearance* da circulação sanguínea. A modificação da GPIb, teoricamente, permitiria o armazenamento de plaquetas resfriadas com maior sobrevivência na corrente de recipientes de transfusão dos compostos. Para prevenir a mudança no citoesqueleto plaquetário, testa-se na medicina humana a adição de citocalasina B, um inibidor de montagem do novo filamento de actina (Shrivastava, 2009). Para equinos, devido a sua particularidade secretória já mencionada por Brunso *et al.* (2010), a adição dessa substância não demonstraria melhoras significativas na manutenção da qualidade plaquetária sob baixas temperaturas. Shrivastava (2009) pontua ainda que a adição de quelantes de cálcio (presente inclusive nos anticoagulantes utilizados nos tubos de coleta) seria útil na preservação da forma discóide, uma vez que a mudança morfológica é uma reação cálcio-dependente. A adição de trehalose e glicoproteínas anticoagulantes reduzem a ativação plaquetária durante o armazenamento refrigerado. A segunda variável discutida por Shrivastava (2009) é referente à disponibilidade do combustível metabólico e capacidade respiratória proporcionada ao composto. O material de armazenamento deve ser adequadamente permeável ao oxigênio, para se evitar a glicólise anaeróbica com acúmulo de ácido lático e consequente queda de pH. A perda de viabilidade morfológica ocorre em pH menor do que 6,0 ou maior do que 7,5. No entanto, a morfologia já sofre alterações quando o pH atinge a marca de 6,8. Como o lactato e a produção de dióxido de carbono (CO_2), influenciam na queda do pH, a capacidade tampão do meio deve ser eficiente (Tynngård, 2009). O acesso ao oxigênio pode ser dificultado pela concentração total plaquetária armazenada, o tipo de *container* utilizado – não só em relação ao material, mas também pela razão volume:superfície – e a agitação contínua. A agitação é a terceira variável a ser considerada no armazenamento plaquetário. A agitação gentil e contínua facilita a utilização do oxigênio pelas células, ajudando a reduzir a taxa de queda do pH. A agitação brusca, no entanto, está associada com a liberação de lactato desidrogenase (LDH), componente citosólico plaquetário, sugerindo, portanto, algum grau de lise plaquetária (Shrivastava, 2009). Van der Meer e Korte (2011) demonstraram o benefício da agitação, não somente na distribuição de oxigênio, mas também na prevenção de sedimentação plaquetária, que leva à ativação por contato.

A taxa de resfriamento controlado empregada no processo de criopreservação é de fundamental importância, uma vez que cristais de gelo intracelulares podem se formar quando taxas muito rápidas são empregadas, fato definitivo para a lesão mecânica da membrana plaquetária (Landi *et al.*, 2004). No entanto, segundo Balint *et al.* (2002), a melhor taxa de resfriamento ainda é debatida entre 1°C/min e 2-3°C/min. Os mesmos autores supracitados propõem uma taxa inicial de 1°C/min com compensação do calor de fusão para 2°C/min. Essa correção na curva de resfriamento influenciou positivamente a qualidade de plaquetas descongeladas após submetidas a protocolo de criopreservação de seis etapas. Fantini *et al.* (2016) mantiveram uma taxa de resfriamento lento de -0,07°C/min na criopreservação de PRP equino, obtendo uma diminuição do percentual de agregação funcional mensurada nas amostras via agregômetro de 40% ao se testar protocolos com diferentes concentrações de DMSO.

2.4.3 Crioprotetores

Balint *et al.* (2002) demonstraram ser o crioprotetor primordial na preservação plaquetária em baixas temperaturas, atuando na diminuição do gradiente osmótico entre o espaço intra e extracelular. Johnson *et al.* (2011) citam já terem sido testados e descritos na literatura a eficácia de vários crioprotetores, ressaltando o dimetil sulfoxido (DMSO), trehalose, propileno glicol, etileno glicol, glicerol, glicerol-glicose, óxido nítrico e dextran-40. Os autores ainda pontuam ser o DMSO considerado o melhor crioprotetor plaquetário, corroborando com Lozano *et al.* (1999), ao afirmarem que o DMSO tem efeito inibitório na ativação plaquetária, sendo superior ao glicerol e outros crioprotetores. Landi *et al.* (2004) afirmam que o DMSO é um crioprotetor que penetra rapidamente na membrana plaquetária, independentemente da concentração plaquetária a qual ele é exposto. Gao *et al.* (1999), no entanto, ponderam que a eficácia e toxicidade dos diferentes crioprotetores não são estudadas a fundo e com o delineamento necessário para se permitir uma comparação verídica entre eles.

Alguns dos pioneiros em criopreservação utilizando DMSO foram Valeri *et al.* (1974). Os autores, testando DMSO a 6% como crioprotetor, obtiveram recuperação *in vitro* de 75% e *in vivo* de 45% de plaquetas de seres humanos. Brodthagen *et al.* (1985) testaram glicerol, dextran e manitol como crioprotetores em plaquetas de seres humanos. O dextran não se mostrou um crioprotetor plaquetário eficiente, mesmo em conjunto com o glicerol, que por sua vez, também não foi eficiente quando testado isoladamente; os piores resultados foram obtidos com o mani-

tol, com prejuízo à saúde celular, principalmente no que se refere ao equilíbrio osmótico. Lozano *et al.* (1999) testaram uma concentração reduzida de DMSO (2%) em plaquetas de seres humanos em conjunto com Thrombosol, uma mistura de moléculas mensageiras secundárias que protegem as plaquetas de danos causados pelas baixas temperaturas. No entanto, a concentração tradicional de 6% provou-se mais eficiente, uma vez que obteve as menores taxas de LDH, corroborando com Appleman *et al.* (2009), que realizaram os mesmos testes em plaquetas caninas e obtiveram resultados semelhantes. Cetin *et al.* (2001) compararam um grupo controle sem crioprotetor com grupos de diferentes concentrações de DMSO (0,5%, 1% e 3%). Os grupos com DMSO sofreram menor queda na contagem plaquetária em relação ao controle, porém sem diferença estatística entre as diferentes concentrações empregadas. No entanto, houve forte correlação negativa entre o aumento da concentração de DMSO e resposta à agregação. Os autores concluíram que o DMSO resultou em defeitos na agregação, porém já descritos e comprovados na literatura como reversíveis. Balint *et al.* (2002) testaram concentrações de DMSO a 6% e a 10%. Os melhores resultados foram obtidos com a concentração a 6%, via avaliação ultraestrutural e funcional, que comprovaram menores alterações morfológicas e maior recuperação após descongelamento (45%). Valeri *et al.* (2005) testaram um protocolo modificado de criopreservação, porém mantendo a concentração de 6% de DMSO. Os resultados consistiram em 94% de recuperação plaquetária após descongelamento, com recuperação *in vivo* de 30%. Hornsey *et al.* (2008) obtiveram 23% de perda plaquetária utilizando DMSO a 6%, além de evidências de ativação plaquetária e lise (mensurada via concentração de LDH) em plaquetas de seres humanos. No entanto, os autores demonstraram que as plaquetas ainda tinham capacidade de adesão e a formar agregados. Johnson *et al.* (2011), utilizando DMSO a 6% como crioprotetor em plaquetas de seres humanos, obtiveram 60 a 80% de recuperação plaquetária, com redução significativa da agregação – em resposta ao ADP e colágeno - e viabilidade plaquetárias – mensuradas via expressão de CD62P, proteína de membrana dos α -grânulos - além de apoptose. Dumont *et al.* (2013) avaliaram a recuperação e sobrevivência de plaquetas de seres humanos criopreservadas em DMSO a 6% objetivando atender aos padrões impostos pelo FDA. A recuperação plaquetária obtida foi de 42%, não atingindo aos padrões impostos pelo FDA para plaquetas armazenadas (porém, não criopreservadas). No entanto, a taxa de sobrevivência nos receptores foi em média de sete dias, excedendo a meta do FDA (média de cinco dias). Fantini *et al.* (2016) obtiveram 43% de ativação plaquetária após congelamento de PRP utilizando DMSO a 3% como crioprotetor, mantendo 35% do valor inicial de agregação plaquetária. Slichter *et al.* (2014) realizaram extensa revisão sobre estudos *in vivo* de plaquetas criopreservadas em

DMSO. Na maioria dos estudos avaliados obteve-se metade da recuperação plaquetária de compostos criopreservados em comparação ao fresco, com sobrevivência minimamente reduzida, além de função hemostática aparentemente efetiva, sem efeitos adversos no receptor.

2.4.4 Plaquetas criopreservadas e o estudo proteômico

Plaquetas criopreservadas possuem melhor efeito terapêutico coagulante - apesar da menor taxa de sobrevivência pós-transfusão - em comparação a plaquetas frescas. A explicação para isso foi buscada por vários autores. A hipótese mais plausível é a de que a função hemostática aumentada de plaquetas criopreservadas *in vivo* se deva a um fenótipo pró-coagulante. Essa atividade pró-coagulante é mediada pela externalização da fosfatidilserina e formação de micropartículas que também expressam fosfatidilserina. Micropartículas são fragmentos celulares anucleados, sem DNA e contendo baixos níveis de RNAm. Elas são formadas durante o processo de criopreservação e possuem receptores de superfície específicos. Seu conteúdo depende do empacotamento seletivo de moléculas, com inclusão ou exclusão de proteínas específicas durante a sua formação. Comprovou-se que as micropartículas possuem atividade pró-coagulante até 100 vezes maior do que as plaquetas. As micropartículas aumentam a geração de fosfatidilserina e fator indutor de trombina, contribuindo para a formação mais rápida do coágulo. Ocorre uma disponibilidade local maior para fixação de proteínas coagulantes disponível, gerando trombina mais rapidamente. As micropartículas advindas das plaquetas criopreservadas são fenotipicamente distintas daquelas presentes antes do processo de criopreservação. O método proteômico, que avalia a classe das micropartículas e seu perfil protéico, pode ser um aliado na avaliação de parâmetros específicos apresentados pelas plaquetas criopreservadas (Johnson *et al.*, 2014; Raynel *et al.*, 2015). Mais estudos, no entanto, devem ser realizados para concluir se essa função pró-coagulante altera a liberação ou a meia-vida de FC em compostos como o PRP e se há alguma diferença clínica entre tratamentos de plaquetas frescas e criopreservadas.

2.5 Muare: características, origem e particularidades clínico-laboratoriais

O muar é um equídeo híbrido, obtido do cruzamento entre animais *Equus asinus* e *Equus caballus*. O cruzamento mais utilizado é o jumento com a égua, isto é, machos da espécie *Equus*

asinus com fêmeas da espécie *Equus caballus*, tendo como produtos o burro e a mula. O cruzamento inverso, determinado pelo garanhão (*Equus caballus*) e a jumenta (*Equus asinus*) é menos frequente, produzindo híbridos denominados bardoto ou bardota. O bardoto é considerado inferior ao muar, uma vez que muares possuem maior porte, beleza zootécnica e resistência física, o que lhes confere conseqüentemente maior valor econômico. Os híbridos machos são sempre inférteis, apesar de demonstrarem forte libido e serem capazes de realizar a cópula normalmente. As fêmeas híbridas, no entanto, podem eventualmente ser férteis (Anderson, 1939; Jones e Johnsen, 1985; Camac, 1997; Araújo, 2010).

Os muares apresentam características intermediárias entre o equino e o asinino, com predominância de características asininas, das quais destacam-se a morfologia dos cascos, predominantemente encastelados e pequenos; linha dorso-lombo convexa ou reta; alta capacidade de conversão alimentar e pouca variação na pelagem, sendo frequentes as particularidades de zebruras, faixa crucial e listras de burro. Os membros pélvicos dos muares são desprovidos de castanhas ou estas, quando presentes, são rudimentares, semelhantes aos de asininos. Araújo (2010) pontua que o muar herda dos asininos a sua rusticidade, resistência a ecto e endoparasitas, adaptabilidade a climas quentes, inteligência e prudência, recebendo do cavalo, a energia e o temperamento. Torres e Jardim (1977) determinam que muares toleram o calor melhor do que os cavalos, suportando melhor exercícios prolongados. No entanto, os mesmos autores citam que os cavalos superam os muares no que se refere a trabalhos em solo mole e fofo (devido ao maior tamanho do casco), são mais rápidos e também convivem melhor com outros animais, seja na cocheira ou durante o trabalho. O uso do muar em regiões de clima quente, montanhosas e de vegetação seca, revela a sua maior preferência em relação a outros animais utilizados para trabalho, destacando-se o cavalo, o jumento, o boi e o camelo. Muares são capazes de carregar 2/3 de seu próprio peso em longas distâncias, enquanto o cavalo suporta menos do que a metade de seu peso. O boi leva vantagem somente em trabalhos pesados e lentos. Como animal de tiro, o muar possui mais força quando comparado ao cavalo, levando-se em conta as proporções de peso corporal. Em serviços de sela que em sua trajetória possuam caminhos íngremes e pedregosos o muar possui a preferência nacional. Entre os fatores determinantes para a popularidade do muar no Brasil estão a topografia acidentada em certas regiões, o clima quente na maioria do território, a ausência de uma raça nacional de tiro, a presença de regiões em que a agricultura é apenas parcialmente mecanizada e o alto preço de tratores e máquinas agrícolas (Torres e Jardim, 1977; Araújo, 2010).

Estima-se que a origem dos muares seja concomitante ao encontro das espécies de asininos e equinos, uma vez que há facilidade de acasalamento devido principalmente à libido e alta fecundidade do jumento, além da passividade da égua para recebê-lo. Na Mesopotâmia, registros de bardotos são datados de 2800 a.C. Com as invasões dos hicsos (de origem asiática) ao Egito (1640 a.C.) tem-se os primeiros relatos referentes a muares. No século VI a.C. os gregos importaram do Oriente a indústria de muares, utilizando-os nos trabalhos agrícolas e preservando os equinos para momentos de guerra. Romanos importaram da Grécia jumentos de melhor qualidade para acasalarem com suas éguas, gerando muares para os serviços agrícola, de tração e de transporte de carga (Araújo, 2010).

No Brasil, estima-se que os muares possam ser advindos das Ilhas Canárias e Madeira, ou precedentes de animais produzidos em países vizinhos na América Latina durante o ciclo da prata, tendo sua introdução no país no século XVI. Com a ascensão da mineração e o surgimento do tropeirismo, a produção de muares se fez necessária para suprir as demandas de abastecimento de minas, novos núcleos populacionais, do intercâmbio entre o litoral e o interior, o escoamento das produções de minério e agrícola, além do transporte das mercadorias importadas pelos portos. A necessidade se tornou tamanha que houve necessidade de importação de muares das províncias cisplatinas de Argentina e Uruguai (Araújo, 2010).

Devido à grande demanda interna de muares, algumas propriedades principalmente de Minas Gerais iniciaram a sua produção focada nesse equídeo. No início do século XIX, a criação de muares já havia se expandido da região centro-sul para a centro oeste. Em 1810, na região onde hoje se encontra Casagrande, em Minas Gerais, deu-se início a criação de jumentos especializados para a produção de muares de sela, denominados Jumento Pêga. Em 1939 foi criada a Associação Brasileira dos Criadores de Jumentos da Raça Brasileira, visando a união das raças nacionais de asininos, destinados à produção de muares capacitados para os serviços de lavoura, tração animal e sela. Em 1947, criou-se a Associação Brasileira dos Criadores de Jumentos da Raça Pêga, sediada em Belo Horizonte, Minas Gerais. Os muares advindos da raça Pêga obedecem ao padrão racial aprovado pelo Ministério da Agricultura em 1949 e são classificados de acordo com o regulamento de controle de genealogia de muares, aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 11 de outubro de 2005. Os muares obtidos de cruzamentos com Jumento Pêga são em sua maioria marchadores, aumentando ainda mais o seu valor nas atividades de sela (Araújo, 2010).

Apesar de muares originados de Jumento Pêga serem a grande maioria dos híbridos no Brasil, ainda se preserva no país muares originados de Jumentos Nordestinos, animais de menor porte e características zootécnicas inferiores. Na região nordeste do país, os asininos mantêm sua maior importância em relação aos muares nas atividades de carga, tração e sela (Araújo, 2010).

Clinicamente, segundo Crane (1997), é seguro tratar muares e asininos como equinos. No entanto, o autor pontua que há diferenças na fisiologia, comportamento e manejo que podem influenciar no diagnóstico das enfermidades. Muitos muares, por exemplo, não estão acostumados à manipulação diária e podem requerer maior contenção durante o exame clínico. O médico veterinário também deve estar atento ao fato de estes animais não demonstrarem dor e desconforto de maneira tão óbvia quanto os equinos e pequenas alterações no comportamento e alimentação podem ser de relevante importância no estado clínico do animal. Pritchard *et al.* (2005), ao realizarem um levantamento focado no bem-estar de animais de tração, utilizaram parâmetros clínicos e comportamentais, comparando-os entre equinos, muares e asininos. Muares apresentaram escore corporal mais elevados quando comparados à equinos e demonstraram-se mais serenos em relação a aproximação de um observador quando comparados à asininos, além de apresentarem menos quantidade de ectoparasitos, corroborando com Burn *et al.* (2010) que realizaram estudo similar, porém compreendendo um maior intervalo de tempo e um maior número de animais.

Na literatura existem poucas informações referentes às particularidades dos muares no que concerne padrões hematológicos e suas diferenças para com os equinos. Um estudo realizado por Gul *et al.* (2007) com equídeos paquistaneses saudáveis demonstrou que valores de hematócrito e hemoglobina sérica são maiores em equinos, seguidos por muares e, por fim, asininos. Na contagem total de leucócitos, asininos lideram em maior quantidade, seguidos por muares e equinos, respectivamente. A dosagem de fibrinogênio sérico foi menor nos muares e maior nos asininos, estando os equinos com valores intermediários entre as duas espécies. Demais valores hematológicos e bioquímicos não apresentaram diferença significativa entre as três espécies. Ribeiro *et al.* (2004), avaliando constituintes séricos de equinos e muares submetidos à prova de resistência no estado do Mato Grosso/Brasil, não observaram diferenças na bioquímica sérica entre as espécies, corroborando com Gupta *et al.* (1994). Henze *et al.* (2011) detectaram diferenças genéticas nas características protéicas de asininos, muares e equinos, demonstrando a maior similaridade do padrão do muar ao padrão asinino. Os autores relatam que essas diferenças observadas explicam, em parte, a diferença no metabolismo existente entre as espécies su-

praticadas, principalmente no que se refere ao estresse oxidativo e ao sistema de defesa extracelular. Fazio *et al.* (2013) demonstraram que endocrinologicamente, muarens desenvolvem maior estresse durante o transporte quando comparados a equinos, uma vez que seus níveis de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e cortisol são maiores.

Em relação aos parâmetros plaquetários de muarens, importantes para a confecção e avaliação da qualidade do plasma rico em plaquetas (PRP), poucas informações são encontradas na literatura. Na grande maioria das vezes há uma extensão do que se aplica no equino para os asininos e muarens, o que pode não ser compatível com a real situação de cada um, principalmente no que se refere aos parâmetros clínico-laboratoriais (De Aluja *et al.*, 2001).

Girardi (2012) estabeleceu parâmetros hematológicos para a raça asinina de Jumento Pêga, demonstrando o maior número de plaquetas na idade adulta quando comparados a animais jovens, sem comparar, no entanto, as diferentes espécies equídeas. Ramirez *et al.* (1999), estudando a trombocitopenia imunomediada neonatal em potros muarens, obteve valores de contagem plaquetária de potros entre 281.000-353.000/ μL no momento do nascimento e de 170.000-364.000/ μL 24 horas após o nascimento. Dias (2014) propôs parâmetros hematológicos para muarens no sudeste brasileiro e em diferentes faixas etárias e raças, obtendo uma média de $288,05 \pm 136,80 \times 10^3/\text{mm}^3$.

Em relação ao plasma rico em plaquetas (PRP), não foram encontradas informações referentes às particularidades de muarens na literatura. Fantini (2014) padronizou o uso da técnica de confecção de PRP em jumentos da raça Catalana, utilizando ACD como anticoagulante e 10 minutos de centrifugação única a 133 gauss (g), permitindo a concentração de plaquetas em 2,06 vezes e reduzindo os leucócitos em 15 vezes, quando comparados ao sangue total.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão Ética do Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob protocolo de número 351/2014 (Anexo 1).

3.1 Animais

Os critérios de inclusão no estudo contemplaram animais com ausência de hipertermia ou afecção terminal, além de não estarem recebendo anti-inflamatórios ou antibióticos, após a realização de exame clínico completo.

Os equídeos utilizados eram de propriedade da Escola de Veterinária da UFMG. Os equinos estavam alocados no Hospital Veterinário da UFMG, e os muares na Fazenda Experimental Hélio Barbosa, em Igarapé, Minas Gerais. Os muares foram transportados para a Escola de Veterinária duas semanas antes do início do experimento. Os equídeos eram mantidos em piquetes, recebendo alimentação de capim picado (*Pennisetum purpureum*), feno, sal mineral e água *ad libitum*. Dos oito equinos participantes, três eram machos e cinco eram fêmeas, com idades entre três e 23 anos. Dos oito muares participantes, cinco eram machos e três fêmeas, com idades entre três e 24 anos. Foram utilizadas duas repetições para cada animal.

3.2 Coleta e processamento

A coleta de sangue foi realizada por venopunção da jugular externa, utilizando-se agulha e tubos a vácuo (*Becton Dickinson*[®]). Em cada coleta, um total de nove tubos por animal era obtido, sendo um com anticoagulante EDTA, três com ACD e cinco com CS. As amostras foram homogeneizadas por inversão lenta dos tubos. Uma alíquota de sangue total em ACD e CS foi separada para análise conjunta com o sangue total obtido em EDTA.

O sangue coletado em ACD e CS foi imediatamente centrifugado após a coleta em centrífuga refrigerada (*Cientec CT-6000R*[®]), utilizando-se 131g, com 30 segundos de aceleração, 8 minutos de processamento e 120 segundos de frenagem, conforme descrito por Fantini (2014). O PRP foi aspirado a 4 mm acima da capa leucocitária, com auxílio de cateter 14 G sem mandril e seringa de 3,0 ml. Dos tubos de ACD, com volume total de 8,5 ml, aspirou-se 1,0 ml de PRP. Dos tubos de CS, com volume total de 4,5 ml, aspirou-se 0,6 ml de PRP. Realizou-se um *pool* do total de 3,0 ml de PRP obtido de cada anticoagulante e alicotado em flaconetes esterilizados, para as posteriores análises a fresco e criopreservado.

3.3 Avaliação das amostras de PRP

As amostras obtidas foram avaliadas em relação aos seus aspectos de composição celular e morfologia.

A contagem de plaquetas, hemácias e leucócitos foi realizada com auxílio de contador hematólogo automático com *software* veterinário calibrado para a espécie equina (*pocH-100Iv-Diff*[®]), tanto no sangue total quanto nas amostras já processadas em PRP. As plaquetas também foram contadas em câmara de Neubauer de acordo com o preconizado pelo fabricante. As amostras foram diluídas na proporção 1:200 no líquido de Rees-Eckert (*Laborclin*[®]) e homogeneizadas por 20 minutos. Após o preenchimento da câmara de Neubauer com auxílio de tubo capilar para

microhematócrito, a mesma foi mantida em repouso em Placa de Petri com algodão umedecido durante 30 a 40 minutos. A contagem foi realizada a seguir, nos 50 campos centrais da câmara, e o valor obtido multiplicado por 1000.

A análise de morfologia ocorreu em microscópio óptico de contraste de fases (*Olympus CBA*[®]). Na superfície de uma lâmina foram colocados 10 μ L da amostra, 10 μ L de formolsalina e 10 μ L do corante Ress-Eckert. Após homogeneização dos volumes previamente citados, cobriu-se a lâmina com lamínula, vedando-se as quatro laterais com esmalte. A lamínula foi dividida em 16 quadrantes iguais, e a leitura realizada nos quatro quadrantes diagonais, no sentido do canto superior esquerdo para o canto inferior direito. A análise morfológica foi realizada no aumento de 1000X, em imersão com óleo, e as plaquetas foram classificadas em estado inativado, incerto ou ativado, de acordo com adaptação da classificação proposta por Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990) em microscopia eletrônica. As plaquetas foram classificadas em estado inativado como aquelas em estado morfológico normal, apresentando-se levemente alongadas; estado incerto como aquelas se apresentando morfológicamente arredondadas; e plaquetas ativadas como aquelas nitidamente emitindo pseudópodes em sua morfologia. O total de células contadas (média de 190 células por lâmina) e sua classificação foram convertidas em porcentagem.

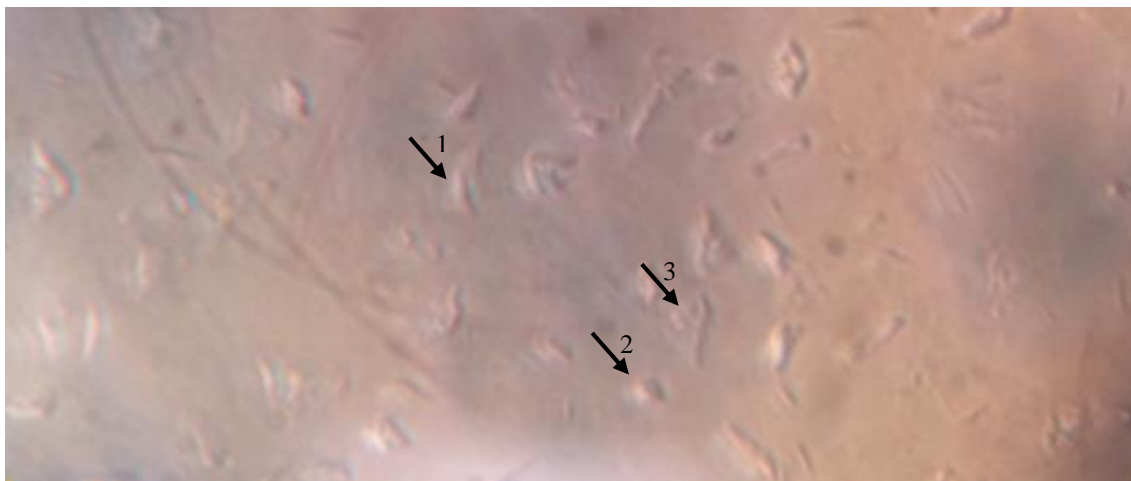


Figura 2. Análise morfológica plaquetária em formolsalina avaliada por microscopia óptica de inversão de fase. As setas numeradas indicam as diferentes classificações: 1: estado inativado; 2: estado incerto de ativação; 3: estado ativado (emissão de pseudópodes).

3.4 Criopreservação

As amostras de PRP foram acondicionadas em flaconetes estéreis com capacidade de 0,5 ml. Uma solução criopreservante de glicose a 5% e DMSO foi confeccionada, utilizando-se 70 ml de glicose e 30 ml de DMSO. Foram adicionados em 45 μ L de amostra de PRP, 5 μ L da solução criopreservante previamente descrita, chegando-se a uma concentração final de 3% de DMSO. Uma amostra controle de cada amostra, sem qualquer criopreservante, também foi submetida aos procedimentos descritos a seguir. Os flaconetes foram identificados e colocados em container de refrigeração desenvolvido para transporte de sêmen equino (Palhares, 1997) durante seis horas, respeitando-se uma curva de refrigeração de -0,04°C/min (Fig. 1). Em seguida, as amostras foram retiradas do container e congeladas via exposição em vapor de nitrogênio durante 20 minutos, 4 cm acima da linha delineada pelo nitrogênio líquido. Foi realizada em seguida a imersão das amostras em nitrogênio líquido e armazenamento a -196°C, durante um período de 10 dias. As amostras foram descongeladas por imersão em água a 37°C, durante 90 segundos.



Figura 3. Container utilizado para o resfriamento lento, pré-congelamento do PRP. A) Visão interior do container, com amostras prontas para refrigeração. B) Visão exterior do container utilizado no presente experimento

As amostras criopreservadas e seus respectivos controles, após o descongelamento, foram analisadas em aparelho hematológico para contagem leucocitária e plaquetária, na câmara de Neubauer para contagem plaquetária e avaliadas morfológicamente, conforme metodologia previamente descrita para as amostras frescas.

3.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, compreendendo um esquema fatorial 2 x 2 (duas espécies – equinos e muares – e dois anticoagulantes – ACD e CS) e avaliado em três tempos distintos (sangue total, PRP fresco e PRP criopreservado). A avaliação do anticoagulante, no sangue total, foi realizada em um esquema fatorial 3x2 [três anticoagulantes (ACD, CS e EDTA) e duas espécies (equinos e muares)].

Os dados foram tabulados no programa Excel[®] e analisados pelo programa estatístico SAS (2002). As variáveis contínuas foram testadas para a normalidade de distribuição, pelo teste de Shapiro-Wilk (SW). As variáveis apresentaram distribuição não paramétrica (SW < 0,05) mesmo após a transformação pelo Arcoseno \sqrt{x} ou Log (x+1). As médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (três ou mais comparações) ou pelo teste de Wilcoxon (duas comparações).

A significância estatística para todas as análises foi de 95% (P<0,05).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois animais, um equino e um muar, foram retirados da análise de dados de sangue total, PRP e criopreservação por apresentarem valores hematológicos extremamente discrepantes em relação aos outros equídeos. Os dados brutos desses animais encontram-se no Anexo 2.

4.1 Avaliação do sangue total: comparação dos anticoagulantes entre as espécies

Os resultados encontram-se descritos nas Tabs. 1 e 2. Os resultados estão dentro dos valores de referência para a espécie equina descritos por Grondin e Dewitt (2010). Parâmetros hematológicos utilizados para muares foram os preconizados por Dias (2014).

Tabela 1. Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas de série vermelha em amostras de sangue total (EDTA, ACD e CS) em equinos e muares

Variável	EDTA		ACD		CITRATO		PARÂMETROS	
	EQUINO	MUAR	EQUINO	MUAR	EQUINO	MUAR	EQUINO†	MUAR‡
RBC (cell x 10⁶/μL)	7,07 \pm 0,39 ^{ab}	7,92 \pm 0,41 ^a	5,96 \pm 0,31 ^c	6,43 \pm 0,38 ^{bc}	6,68 \pm 0,41 ^b	6,96 \pm 0,36 ^b	6,4-10,0	7,16 \pm 0,966
HGB (g/dL)	10,91 \pm 0,48 ^b	13,01 \pm 0,41 ^a	9,09 \pm 0,38 ^c	10,6 \pm 0,39 ^b	10,1 \pm 0,54 ^{bc}	11,36 \pm 0,39 ^b	11,0-17,0	13,56 \pm 1,622
HCT (%)	31,54 \pm 1,42 ^{bc}	38,41 \pm 1,26 ^a	26,21 \pm 1,15 ^d	31,35 \pm 1,28 ^{bc}	29,34 \pm 1,54 ^{cd}	33,6 \pm 1,13 ^b	32,0-47,0	9,93 \pm 2,17
MCV (fL)	45,21 \pm 1,16 ^b	49,64 \pm 1,7 ^a	44,48 \pm 1,09 ^b	49,66 \pm 1,61 ^a	44,51 \pm 1,14 ^b	49,26 \pm 1,69 ^a	37,0-59,0	
MCH (pg)	15,68 \pm 0,43 ^a	16,81 \pm 0,67 ^a	15,45 \pm 0,43 ^a	16,86 \pm 0,65 ^a	15,34 \pm 0,43 ^a	16,69 \pm 0,61 ^a	15,0-17,0	
MCHC (g/dL)	34,64 \pm 0,15 ^a	33,92 \pm 0,22 ^{bc}	34,72 \pm 0,21 ^a	33,87 \pm 0,27 ^{bc}	34,43 \pm 0,18 ^{ab}	33,81 \pm 0,19 ^c	30,0-36,0	
RDWSD (fL)	35,35 \pm 0,55 ^b	39,21 \pm 0,85 ^a	34,21 \pm 0,51 ^b	38,18 \pm 0,6 ^a	34,91 \pm 0,5 ^b	38,72 \pm 0,78 ^a		
RDWCV (%)	19,99 \pm 0,36 ^a	20,23 \pm 0,49 ^a	19,59 \pm 0,3 ^a	19,59 \pm 0,57 ^a	20,16 \pm 0,33 ^a	20,09 \pm 0,51 ^a	21,0-25,0	

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P < 0,05$). EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, ACD, citrato ácido dextrose, CITRATO, citrato de sódio, RBC, contagem de eritrócitos, HGB, concentração de hemoglobina, HCT, hematócrito, MCV, volume corpuscular médio, MCH, hemoglobina corpuscular média, MCHC, concentração de hemoglobina corpuscular média, RDWSD, largura da curva de distribuição de eritrócitos (desvio padrão), RDWCV, largura da curva de distribuição de eritrócitos (coeficiente de variação). †Parâmetros hematológicos de equinos por Grondin e Dewitt (2010); ‡Parâmetros hematológicos de muares por Dias (2014).

Tabela 2. Valores médios \pm erro padrão das variáveis hematológicas de séries branca e plaquetária em amostras de sangue total (EDTA, ACD e CS) em equinos e muares

Variável	EDTA		ACD		CITRATO		PARÂMETROS	
	EQUINO	MUAR	EQUINO	MUAR	EQUINO	MUAR	EQUINO †	MUAR‡
LEU (cell x 10³/μL)	10,11 \pm 0,48 ^b	12,55 \pm 0,84 ^a	8,44 \pm 0,43 ^c	10,13 \pm 0,73 ^b	8,38 \pm 0,55 ^c	10,44 \pm 0,65 ^b	5,20-13,9	9,93 \pm 2,17
LINFpc (%)	30,3 \pm 3,67 ^a	33,06 \pm 2,37 ^a	29,2 \pm 3,77 ^a	33,75 \pm 3,5 ^a	31,52 \pm 3,82 ^a	34,19 \pm 2,36 ^a		43,15 \pm 9,64
OUTROSp (%)	69,7 \pm 3,67 ^a	66,94 \pm 2,37 ^a	70,8 \pm 3,77 ^a	66,32 \pm 3,52 ^a	68,48 \pm 3,82 ^a	65,81 \pm 2,36 ^a		
LINFtot (cell x 10³/μL)	3,03 \pm 0,38 ^{bc}	4,11 \pm 0,33 ^a	2,4 \pm 0,31 ^c	3,28 \pm 0,26 ^{bc}	2,6 \pm 0,36 ^c	3,52 \pm 0,27 ^{ab}	1,5-7,7	4,29 \pm 1,38
OUTROStot (cell x 10³/μL)	7,09 \pm 0,58 ^b	8,44 \pm 0,65 ^a	6,04 \pm 0,54 ^c	6,85 \pm 0,64 ^{bc}	5,78 \pm 0,59 ^c	6,91 \pm 0,52 ^{bc}		
PLT (cell x 10³/μL)	175,79 \pm 10,72 ^b	250,67 \pm 30,82 ^a	133,56 \pm 12,28 ^c	178,62 \pm 15,75 ^b	137,33 \pm 14,91 ^c	131,11 \pm 10,27 ^c	120,0-256,0	288,05 \pm 136,80
PDW (fL)	8,26 \pm 0,19 ^a	7,65 \pm 0,37 ^b	6,84 \pm 0,16 ^c	6,62 \pm 0,17 ^c	7,28 \pm 0,3 ^{bc}	7,18 \pm 0,36 ^{bc}		
VPM (fL)	7,54 \pm 0,15 ^a	7,2 \pm 0,21 ^b	6,82 \pm 0,12 ^{bc}	6,6 \pm 0,13 ^c	6,84 \pm 0,19 ^{bc}	6,84 \pm 0,23 ^{bc}		
PLCR (%)	3,6 \pm 0,93 ^a	4,96 \pm 1,85 ^a	1,96 \pm 0,53 ^a	2,06 \pm 0,6 ^a	2,08 \pm 0,8 ^a	3,7 \pm 1,75 ^a		

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P < 0,05$). EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, ACD, citrato ácido dextrose, CITRATO, citrato de sódio, LEU, contagem de leucócitos, LINFpc, porcentagem de linfócitos do total de leucócitos, OUTROSp, porcentagem de neutrófilos, monócitos e basófilos do total de leucócitos, LINFtot, linfócitos absolutos, OUTROStot, neutrófilos, monócitos e basófilos absolutos, PLT, contagem de plaquetas, PDW, largura da curva de distribuição de plaquetas, VPM, volume plaquetário médio, PLCR, índice de macrotrombócitos. †Parâmetros hematológicos de equinos por Grondin e Dewitt (2010); ‡Parâmetros hematológicos de muares por Dias (2014).

Em relação aos valores hematológicos obtidos em EDTA, a contagem total de leucócitos (LEU) mostrou-se superior ($P < 0,05$) em relação ao ACD e CS, tanto para equinos quanto para muares. O mesmo comportamento foi observado para a contagem de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB) e hematócrito (HCT). Todos os parâmetros supracitados obtiveram maiores valores médios quando avaliados no anticoagulante EDTA em relação ao ACD e CS ($P < 0,05$), para muares, corroborando com Zmigrodzka *et al.* (2012), que também obtiveram valores maiores para esses parâmetros em cães com sangue coletado em EDTA em relação ao CS. Nos equinos observou-se uma semelhança ($P > 0,05$) para os valores de RBC e HGB, entre o EDTA e CS, com superioridade do EDTA apenas sobre os valores obtidos para o ACD.

O efeito de diluição dos anticoagulantes ACD e CS é um fator a ser considerado nas amostras coletadas: o primeiro possui 1,5 ml de anticoagulante em um volume de 8,5 ml de capacidade do tubo coletor; o segundo, possui 0,5 ml de anticoagulante em 4,5 ml. O EDTA reveste o tubo de coleta, e não teria um volume capaz de causar uma diluição da amostra. Ao se realizar a multiplicação dos valores das médias pelos fatores de correção pertinentes a cada anticoagulante (1,18 para amostras coletadas em ACD e 1,11 para amostras em CS), observou-se a manutenção da contagem superior de LEU no EDTA. Este mesmo comportamento foi observado ao se avaliar a contagem plaquetária total, que se manteve superior no EDTA, assim como a maior largura de distribuição da curva plaquetária (PDW). No entanto, parâmetros como RBC, HGB e HCT tornam-se similares entre ACD e CS em relação ao EDTA após a correção do efeito da diluição. Apesar de haver essa diluição das amostras pelos anticoagulantes ACD e CS, especula-se também sobre outros fatores que possam estar interferindo nas diferenças observadas (Morales *et al.*, 2007). Vale ressaltar, que os aparelhos hematológicos automáticos são calibrados para leitura de sangue total em EDTA. Destaca-se também, a função do EDTA como quelante de cálcio. Essa função quelante do EDTA foi comparada à do CS por Bournazos *et al.* (2008), ao estudar agregados plaqueta-leucócito. Segundo os autores, esses agregados são compostos relativamente estáveis que, em seres humanos, possuem seus valores elevados nos casos de infarto do miocárdio e doenças coronárias, sendo um marcador da ativação plaquetária *in vivo* durante esses eventos. A formação do agregado é mediada predominantemente pelo cálcio e anticoagulantes quelantes de cálcio, em teoria, apresentariam menores valores desses agregados. Esses íons cálcio residuais, portanto, poderiam consequentemente influenciar na adesão plaquetária com monócitos e na contagem total de leucócitos. Bournazos *et al.* (2008) avaliaram essas interações via citometria de fluxo e concluíram, que a presença do CS contribui para subestimar os

agregados plaqueta-monócitos, uma vez que o mesmo indisponibiliza o cálcio para essa finalidade. O CS possui uma capacidade limitada de depleção de cálcio em relação ao EDTA, o que explicaria a maior contagem total leucocitária observada em sangue coletado com o mesmo.

Quimicamente, o EDTA também possui uma função quelante em relação a metais, como o ferro, tanto em sua ionização férrica quanto na ferrosa (Hasegawa *et al.*, 2011). Pressupõe-se que essa função traria maior estabilização a série vermelha, o que explicaria os maiores valores de HCT e RBC obtidos em EDTA em relação ao ACD, em equinos e muares e ao CS em muares. Como foi observada uma diminuição proporcional nos valores de HCT, RBC e HGB, nos diferentes anticoagulantes testados, os índices hematimétricos, MCV, HCM e CHCM, calculados a partir dos valores de HCT, RBC e HGB, não diferiram ($P > 0,05$) dentro de cada espécie na comparação dos anticoagulantes.

Em relação às espécies avaliadas, os muares apresentaram contagem total de leucócitos mais elevadas ($P < 0,05$) quando comparado aos equinos, independentemente do anticoagulante empregado. Os únicos parâmetros hematológicos de muares encontrados na literatura estão descritos no trabalho de Dias (2014). Gul *et al.* (2007) realizaram um estudo com equídeos paquistaneses hígidos e constataram uma maior contagem total de leucócitos em asininos, seguidos por muares e equinos, respectivamente. No entanto, outras ponderações podem ser feitas sobre os valores obtidos. No presente experimento, os muares eram advindos de um manejo extensivo, a maioria sem doma e sem aceitar cabresto, o que levou a necessidade de uma contenção mais incisiva, criando conseqüentemente um maior estresse durante a coleta de amostras nesses animais. O próprio transporte dos animais ao tronco para coleta, também levou os animais a desempenharem um exercício físico, o que pode ter contribuído para a contagem leucocitária mais elevada observada nos mesmos. Em seres humanos, Nieman e Nehsen-Cannarella (1994) relataram que exercícios físicos, mesmo que em curta duração, são capazes de causar uma perturbação na circulação do total de leucócitos e suas subpopulações, podendo influenciar em coletas sanguíneas realizadas posteriormente a esses eventos. Além dessas considerações, a liberação de noradrenalina devido ao estresse e/ou exercício físico, é determinante na magnitude da resposta simpática, que afeta diretamente a concentração leucocitária no sangue total (Davies *et al.*, 1974). Da mesma forma, Nabity e Ramaiah (2010) afirmam que agentes adrenérgicos tem a capacidade de induzir a mobilização leucocitária do compartimento vascular marginal para o circulante, resultando no evento denominado leucocitose fisiológica. Exemplos do estresse afetando diretamente o leucograma são descritos na medicina veterinária, no transporte de bovinos

(Paes *et al.*, 2012) e em cães submetidos a processos estéticos (De Oliveira *et al.*, 2013). Pusterla *et al.* (2006) determinam que, em equinos, estados fisiológicos (idade, raça, variações circadianas, exercício físico) e patológicas (estresse) interferem na contagem total e diferencial de leucócitos.

A contagem de plaquetas foi superior no EDTA, além de apresentarem maior PDW e maior volume plaquetário médio (VPM) neste anticoagulante. Esses valores superiores, no entanto, não são positivos. Visando a maior integridade plaquetária possível para a obtenção de um PRP de qualidade ou mesmo para análises hematológicas fidedignas, o EDTA se mostra prejudicial à manutenção da saúde plaquetária. Marx (2000) pontua que o EDTA tem a capacidade de fragmentação plaquetária, o que justificaria a maior contagem total observada quando comparada aos valores obtidos em ACD e CS. A contagem superestimada proporcionada pelo EDTA também pode interferir no cálculo de concentração plaquetária do PRP, subestimando a concentração atingida após a centrifugação e obtenção do composto.

Os valores de PDW e VPM maiores também refletem a maior heterogeneidade morfológica plaquetária, podendo-se inferir um maior grau de ativação no EDTA em relação aos demais anticoagulantes por esses parâmetros. Ahnadi *et al.* (2003) observaram a ultraestrutura plaquetária via microscopia eletrônica de transmissão e concluíram que plaquetas coletadas em EDTA apresentaram-se mais ativadas e com um conteúdo menor de grânulos intracelulares quando comparadas a amostras de sangue coletadas em citrato teofilina dipiridamole adenosina (CTDA).

Os tubos com os diferentes anticoagulantes possuem capacidades distintas: tubos em EDTA possuem 4,0 ml de capacidade; em CS, 4,5 ml; em ACD, 8,5 ml. Baseados nessas diferenças, Andreason *et al.* (2014) estudaram a interferência do tamanho do tubo de CS em relação a função e contagem plaquetárias em seres humanos, utilizando-se a técnica de impedância. Os autores observaram agregação plaquetária significativamente menor ao se utilizar tubos de menor volume. A contagem plaquetária manteve-se estável até 120 minutos pós-coleta em tubos de maior volume, e decaiu após 60 minutos pós-coleta em tubos de menor volume. No presente estudo, o anticoagulante CS não apresentou diferença entre as espécies em relação a contagem plaquetária, além de RBC e MCHC. Além disso, todas as contagens foram realizadas com intervalo inferior a uma hora, o que teoricamente não interferiria na contagem plaquetária ou justificaria as diferenças encontradas entre os anticoagulantes.

Apesar de o EDTA ser considerado o anticoagulante padrão para o hemograma, por manter condições ótimas para a contagem celular e diferencial de leucócitos, ele não preserva a ultraestrutura e capacidade funcional das plaquetas. Na presença do EDTA, o VPM aumenta em um padrão tempo-dependente. A exposição da plaqueta ao EDTA por períodos prolongados resulta em distorção de sua morfologia, incluindo dilatação do sistema canalicular, progressiva tendência a mudança de forma e aglutinação plaquetária. Todas estas transformações externas são compatíveis com ativação plaquetária.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os anticoagulantes em relação ao índice de macrotrombócitos (PLCR). Baumgarten *et al.* (2011), ao avaliarem sangue total ovino armazenado em temperatura ambiente e também refrigerado, observaram que os fatores que mais interferem para a agregação plaquetária são o tempo e a temperatura nos quais as plaquetas foram avaliadas pós-coleta (sendo submetida ou não à refrigeração), corroborando com Piccione *et al.* (2010) que observaram os mesmos pontos em sangue equino. Van der Meer e Korte (2011) também pontuam a importância da homogeneização da amostra para evitar a sedimentação plaquetária, que leva a ativação por contato, e também para evitar uma hipóxia local, com consequente queda do pH, causando alterações mitocondriais e apoptose celular. No presente estudo, as avaliações de sangue total nos três anticoagulantes estudados foram realizadas após homogeneização lenta por inversão dos tubos imediatamente após a sua coleta e prévia ao processamento, sendo sua análise imediata e no mesmo momento para as amostras, não havendo diferenças temporais na análise que pudessem causar diferenças entre os anticoagulantes. Observa-se, no entanto, um maior valor numérico para macrotrombócitos em muare (sem significância estatística, no entanto) quando comparada aos equinos, possivelmente ocasionado pela maior contagem plaquetária ($P < 0,05$) da espécie híbrida nos anticoagulantes EDTA e ACD.

4.2 Efeito do anticoagulante na obtenção do PRP em equinos e muare

Os resultados obtidos da centrifugação do sangue total em ACD e CS e consequente obtenção de seu respectivo PRP estão descritos na Tab. 3. As variáveis HBG, HTC, MCV, MHC, RDWCV e RDWSD foram removidas da tabela por não produzirem resultados no PRP. Como os parâmetros supracitados são diretamente relacionados com os eritrócitos e o PRP foi aspirado acima desta camada, não era esperado qualquer interferência desses parâmetros no composto obtido. No entanto, a contagem de eritrócitos (RBC) foi mantida. Observou-se diferença na

contagem de eritrócitos ($P < 0,05$) entre o PRP, obtido com o mesmo anticoagulante entre as diferentes espécies, porém, considerando-se dentro da mesma espécie, o anticoagulante utilizado não influenciou o número de eritrócitos ($P > 0,05$). A concentração de eritrócitos no PRP pode afetar a sua qualidade. Os protocolos de obtenção de PRP (centrifugação) reduzem ou eliminam a presença de eritrócitos no composto. Na maioria das vezes há uma pequena quantidade de eritrócitos remanescentes no PRP. *In vivo*, os eritrócitos liberam substâncias de ação vasodilatadora, como ATP e óxido nítrico, este capaz de mediar a intensidade de ação do IGF-1 em cartilagens. Outro componente dos eritrócitos é hemoglobina, uma metaloproteínase que sob condições de estresse oxidativo, libera o grupo heme que possui ação citotóxica. O ferro, outro constituinte eritrocitário, é catalisador de radicais livres, apesar de contribuir para a destruição de patógenos. Os radicais livres, no entanto, podem induzir a apoptose em reação à sinalização pró-inflamatória. Devido a essas capacidades destrutivas, é interessante que o PRP tenha em sua composição uma quantidade de eritrócitos limitada (Boswell *et al.*, 2012).

A concentração plaquetária obtida no PRP de muares foi maior em comparação com a espécie equina ($P < 0,05$). Esse parâmetro reflete a maior concentração observada no PRP em relação ao sangue total (1,42 vezes para equinos versus 2,00 vezes para muares, em ACD; e 1,39 vezes para equinos versus 2,69 vezes para muares, em CS), além de uma concentração maior de plaquetas no sangue total dos muares em relação aos equinos ($P < 0,05$). Fantini (2014) observou uma concentração plaquetária de 2,06 vezes em PRP de asininos utilizando como anticoagulante o ACD e um tempo de centrifugação de 10 minutos a 133 g. O aumento do tempo de centrifugação, para 15 minutos, promoveu maior concentração plaquetária, porém com evidências de maior ativação, corroborando com Andrade *et al.* (2008) que observaram a relação entre o maior tempo e rotações na centrifugação com a queda na qualidade dos parâmetros morfológicos plaquetários. Tempo e número de rotações na centrifugação interferem, portanto, na qualidade direta do PRP obtido, uma vez que esta é dependente da concentração plaquetária e manutenção das plaquetas em estado inativado (Fantini, 2014). No presente estudo, ilustrou-se a diferença de concentração plaquetária no PRP entre as espécies equina e muar, utilizando-se para ambas o mesmo protocolo. Pode-se inferir que espécies diferentes requerem protocolos específicos, visando a otimização da qualidade do PRP obtido. Os resultados obtidos por Fantini (2014) em asininos, com protocolo de centrifugação similar ao do presente estudo, ilustram a maior similaridade entre asininos e muares em comparação a muares e equinos. Aspectos hematológicos da espécie híbrida, aparentemente, são mais semelhantes aos de *Equus asinus*.

Tabela 3. Valores médios \pm erro padrão de parâmetros hematológicos de sangue total (EDTA, ACD e CS) e PRP e morfológicos de PRP, obtido em dois anticoagulantes (ACD e CS) e em duas espécies (equinos e muares)

Variável	EDTA		ACD				CITRATO			
	EQUINO	MUAR	EQUINO		MUAR		EQUINO		MUAR	
	TOTAL	TOTAL	TOTAL	PRP	TOTAL	PRP	TOTAL	PRP	TOTAL	PRP
RBC (cell x 10 ⁶ /μL)	7,07 \pm 0,39	7,92 \pm 0,41	5,96 \pm 0,31 ^b	0,03 \pm 0,00 ^d	6,43 \pm 0,38 ^{ab}	0,05 \pm 0,01 ^c	6,68 \pm 0,41 ^b	0,03 \pm 0,00 ^d	6,96 \pm 0,36 ^b	0,05 \pm 0,01 ^c
LEU (cell x 10 ³ /μL)	10,11 \pm 0,48	12,55 \pm 0,84	8,44 \pm 0,43 ^b	1,31 \pm 0,30 ^c	10,13 \pm 0,73 ^a	1,80 \pm 0,56 ^c	8,38 \pm 0,55 ^b	0,24 \pm 0,05 ^d	10,44 \pm 0,65 ^a	0,66 \pm 0,18 ^d
LINFpc (%)	30,3 \pm 3,67	33,06 \pm 2,37	29,20 \pm 3,77 ^b	85,62 \pm 3,63 ^a	33,75 \pm 3,50 ^b	84,11 \pm 4,73 ^a	31,52 \pm 3,82 ^b	91,58 \pm 4,04 ^a	34,19 \pm 2,36 ^b	84,33 \pm 5,69 ^a
OUTROSp (%)	69,7 \pm 3,67	66,94 \pm 2,37	70,80 \pm 3,77 ^a	14,38 \pm 3,63 ^b	66,32 \pm 3,52 ^a	15,89 \pm 4,73 ^b	68,48 \pm 3,82 ^a	8,42 \pm 4,04 ^b	65,61 \pm 2,36 ^a	15,17 \pm 5,69 ^b
LINFptot (cell x 10 ³ /μL)	3,03 \pm 0,38	4,11 \pm 0,33	2,40 \pm 0,31 ^b	1,14 \pm 0,27 ^c	3,28 \pm 0,26 ^{ab}	1,27 \pm 0,31 ^c	2,60 \pm 0,36 ^b	0,38 \pm 0,07 ^d	3,52 \pm 0,27 ^a	1,13 \pm 0,15 ^c
OUTROStot (cell x 10 ³ /μL)	7,09 \pm 0,58	8,44 \pm 0,65	6,04 \pm 0,54 ^a	0,16 \pm 0,07 ^b	6,85 \pm 0,64 ^a	0,53 \pm 0,26 ^b	5,78 \pm 0,59 ^a	0,02 \pm 0,02 ^c	6,91 \pm 0,52 ^a	0,23 \pm 0,08 ^b
PLT (cell x 10 ³ /μL)	175,79 \pm 10,72	250,67 \pm 30,82	133,36 \pm 12,28 ^c	189,21 \pm 11,59 ^b	178,62 \pm 15,75 ^b	357,71 \pm 29,84 ^a	137,33 \pm 14,91 ^c	191,29 \pm 11,62 ^b	133,11 \pm 10,27 ^c	357,86 \pm 35,75 ^a
PDW (fL)	8,26 \pm 0,19	7,65 \pm 0,37	6,84 \pm 0,16 ^{ab}	6,56 \pm 0,16 ^{bc}	6,62 \pm 0,17 ^{ab}	6,04 \pm 0,13 ^d	7,28 \pm 0,30 ^a	6,79 \pm 0,13 ^{ab}	7,18 \pm 0,36 ^{ab}	6,29 \pm 0,12 ^{cd}
VPM (fL)	7,54 \pm 0,15	7,2 \pm 0,21	6,82 \pm 0,12 ^{cd}	6,90 \pm 0,29 ^{bc}	6,60 \pm 0,13 ^d	6,79 \pm 0,11 ^{cd}	6,84 \pm 0,19 ^{cd}	7,51 \pm 0,10 ^a	6,84 \pm 0,23 ^{cd}	7,06 \pm 0,08 ^b
PLCR (%)	3,6 \pm 0,93	4,96 \pm 1,85	1,96 \pm 0,53 ^d	3,17 \pm 0,43 ^c	2,06 \pm 0,60 ^d	2,09 \pm 0,38 ^d	2,08 \pm 0,80 ^d	4,74 \pm 0,42 ^a	3,7 \pm 1,75 ^b	3,21 \pm 0,31 ^c
Neubauer (cell x 10 ³ /μL)				224,57 \pm 18,25 ^b		361,50 \pm 36,16 ^a		236,07 \pm 23,39 ^b		355,71 \pm 29,88 ^a
Morf Inativada (%)				43,10 \pm 3,43 ^a		45,10 \pm 4,06 ^a		43,67 \pm 4,51 ^a		45,30 \pm 3,59 ^a
Morf Incerta (%)				26,80 \pm 2,24 ^a		28,30 \pm 4,09 ^a		27,11 \pm 2,28 ^a		26,70 \pm 2,00 ^a
Morf Ativada (%)				30,10 \pm 2,58 ^a		26,60 \pm 1,83 ^a		29,22 \pm 3,92 ^a		28,00 \pm 3,73 ^a

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05). RBC, contagem de eritrócitos, LEU, contagem de leucócitos, LINFpc, porcentagem de linfócitos do total de leucócitos, OUTROSp, porcentagem de neutrófilos, monócitos e basófilos do total de leucócitos, LINFptot, linfócitos absolutos, OUTROStot, neutrófilos, monócitos e basófilos absolutos, PLT, contagem de plaquetas, PDW, largura da curva de distribuição de plaquetas, VPM, volume plaquetário médio, PLCR, índice de macrotrombócitos, Neubauer, contagem plaquetária manual realizada em câmara de Neubauer, Morf Inativada, plaquetas em estado morfológico inativado, avaliadas em microscopia óptica com inversão de fases e fixação com formolsalina, Morf Incerta, plaquetas em estado morfológico incerto, avaliadas em microscopia óptica com inversão de fases e fixação com formolsalina, Morf Ativada, plaquetas em estado morfológico ativado, avaliadas em microscopia óptica com inversão de fase e fixação com formolsalina.

O anticoagulante, no entanto, não apresentou efeito significativo na contagem plaquetária do PRP, tanto em equinos quanto em muares, corroborando com Giraldo *et al.* (2015), que testaram o efeito das soluções anticoagulantes ACD-A, ACD-B e CS na contagem plaquetária e liberação de FC em PRP equino. No presente trabalho, no entanto, houve efeito ($P < 0,05$) dos anticoagulantes nos parâmetros PDW e VPM, não observado em Giraldo *et al.* (2015). Maiores PDW e VPM foram observados em CS quando comparados com o ACD, o que revela uma maior capacidade do ACD em preservar a integridade plaquetária quando comparado ao CS.

A determinação precisa do número de plaquetas presente no PRP é fundamental, uma vez que todas as mensurações referentes a sua qualidade partem dessa premissa. A contagem plaquetária no PRP foi realizada tanto em contador celular automático, quanto em câmara de Neubauer (Tab. 4).

Tabela 4. Valores médios \pm erro padrão de contagens plaquetárias realizadas em aparelho hematológico pocH-100Iv-Diff® e contagem manual em câmara de Neubauer, de PRP obtido nos anticoagulantes ACD e CS, para as espécies equina e muar.

	ACD		CS	
	EQUINO	MUAR	EQUINO	MUAR
Automático (cell x 10³/μL)	189,21 \pm 11,59 ^{Ab}	357,71 \pm 29,84 ^{Aa}	191,29 \pm 11,62 ^{Ab}	357,86 \pm 35,75 ^{Aa}
Neubauer (cell x 10³/μL)	224,57 \pm 18,25 ^{Ab}	361,50 \pm 36,16 ^{Aa}	236,07 \pm 23,39 ^{Ab}	355,71 \pm 29,88 ^{Aa}

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem ($P < 0,05$).

Algumas limitações dos aparelhos hematológicos de rotina são descritas, a saber: primeiramente, um pacote veterinário (*Veterinary Package*) deve ser adquirido, uma vez que o aparelho deve ser capaz de discernir hemácias e plaquetas pelo tamanho, que são variáveis entre as espécies domésticas; os *clumps* plaquetários são contados como uma única plaqueta, subestimando a contagem real; o PRP é opticamente mais claro, podendo causar a aspiração incompleta pelo aparelho, que realizará uma contagem de pouca acurácia; o PRP pode exceder o número máximo a ser contado pelo aparelho hematológico, requerendo, portanto, uma diluição da amostra de acordo com o limite linear do aparelho; aparelhos de hematologia são calibrados para operar nos limites do sangue total, criando dúvidas nas contagens referentes a parâmetros existentes no PRP (Woodell-May *et al.*, 2005). No presente estudo, essas limitações foram levadas em consideração e controladas: a presença de *clumps* plaquetários foi minimizada com o processamento

imediatamente das amostras pós-coleta e homogeneização adequada; os valores plaquetários obtidos encontraram-se dentro da linearidade limite do aparelho conforme preconizada pelo fabricante, não sendo necessário a realização de diluições; o aparelho utilizado controla sua aspiração por volume (15µL para cada amostra) e não leva em consideração a coloração e opacidade da amostra, não havendo erros de aspiração devido a menor opacidade do PRP em relação ao sangue total; o aparelho possui *software* veterinário para a espécie equina, calibrado para o tamanho celular ímpar da espécie; o aparelho foi validado para a contagem plaquetária realizando-se conjuntamente a contagem em câmara de Neubauer conforme empregado Vendruscolo *et al.* (2012) e Fantini *et al.* (2016). De acordo com os dados ilustrados na Tab. 4, não houve diferença ($P>0,05$) entre as contagens plaquetárias do PRP realizadas no aparelho hematológico e manual, via câmara de Neubauer.

A redução leucocitária foi observada em todas as espécies e anticoagulantes empregados, sendo de 6,44 vezes na espécie equina no anticoagulante ACD; 5,62 vezes em muarees em ACD; 34,9 vezes em equinos em CS e 15,8 vezes em muarees em CS. O protocolo utilizado consistiu em uma centrifugação única, reconhecida por ser de maior simplicidade técnica, menos susceptível a erros de processamento, e capaz de não concentrar grande quantidade de leucócitos, quando comparada a protocolos de centrifugação dupla (Nagata *et al.*, 2010; Filardo *et al.*, 2011). Especula-se, no entanto, sobre o papel desempenhado pelos leucócitos no PRP. Nagata *et al.* (2010) destacam os efeitos deletérios dos mesmos, uma vez que há a liberação de proteases e oxigênio reativo, promovendo a liberação prematura dos FC. Filardo *et al.* (2011) relatam reações adversas inflamatórias em pacientes humanos com osteoartrite submetidos a injeções intra-articulares de PRP contendo leucócitos em sua composição. McCarrel *et al.* (2012) ressaltam o efeito negativo dos leucócitos em explantes tendíneos, uma vez que os mesmos contribuíram para a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α), promovendo maior atraso na cicatrização. Apesar de leucócitos serem positivamente correlacionados com a expressão de citocinas catabólicas e negativamente com a expressão de matriz óssea, eles possuem função imunomodulatória capaz de acelerar o reparo tecidual (Bendinelli *et al.*, 2010; Fontenot *et al.*, 2012). Outros autores também relatam efeitos positivos da presença de leucócitos nos compostos de PRP. Um desses efeitos seria o preventivo à infecções, justificado pelo fato de leucócitos serem fontes de citocinas e enzimas. A síntese de PDGF e VEGF por essas células também é benéfica, além de contribuir para estimular a liberação de FC pelas plaquetas (Andrade *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; Filardo *et al.*, 2011; Fontenot *et al.*, 2012). Zimmermann *et*

al. (2003) afirmam que leucócitos contribuem substancialmente para a concentração de FC no PRP.

A análise morfológica das plaquetas no PRP está apresentada na Tab. 5. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) na ativação celular de plaquetas no PRP fresco, independentemente da espécie ou anticoagulante empregado. Entretanto, o percentual de células inativadas foi superior ($p<0,05$), quando comparada com a soma das plaquetas com ativação incerta e inativada, tanto em equinos quanto em muares, independentemente do anticoagulante utilizado. É desejável que o PRP contenha plaquetas com a sua estrutura da forma mais preservada possível, garantindo-se a integridade dos grânulos α e a conseqüente viabilidade dos FC presentes em seu interior (Textor e Tablin, 2012).

Tabela 5. Valores médios \pm erro padrão de parâmetros morfológicos avaliados em microscopia óptica de inversão de fases e fixação com formolsalina do conteúdo plaquetário de PRP fresco obtido em dois anticoagulantes (ACD e CS) e em duas espécies (equina e mular).

	ACD		CS	
	EQUINO	MUAR	EQUINO	MUAR
Incerta + Inativada (%)	69,00 \pm 2,58 ^{Aa}	73,40 \pm 1,83 ^{Aa}	70,78 \pm 3,91 ^{Aa}	72,00 \pm 3,73 ^{Aa}
Ativada (%)	30,1 \pm 2,58 ^{Ba}	26,60 \pm 1,83 ^{Ba}	29,22 \pm 3,92 ^{Ba}	28,00 \pm 3,73 ^{Ba}

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem ($P<0,05$).

O protocolo de centrifugação única utilizado no presente trabalho também pode ser correlacionado com a morfologia observada. A baixa rotação empregada contribuiu para a manutenção da viabilidade morfológica plaquetária, uma vez que a força de centrifugação está diretamente correlacionada com a ativação plaquetária (Andrade *et al.*, 2008). Além disso, o controle sobre as velocidades de aceleração e frenagem empregadas na centrifugação, é fator relevante na indução da ativação plaquetária, como relatado por DeLong *et al.* (2012).

4.3 Criopreservação do PRP em equinos e muares

Segundo Tablin *et al.* (2008), o desenvolvimento e viabilidade de um produto rico em plaquetas congelado seria de grande valia para veterinários de campo. Usado como adjuvante em tratamentos clínicos alcançar-se-ia, dessa forma, a ampliação do uso do PRP como terapia regenera-

tiva. Os resultados obtidos dos parâmetros hematológicos após a criopreservação do PRP de equinos e muares estão descritos na Tab. 6.

A contagem leucocitária total foi superior ($P < 0,05$) no PRP congelado, independentemente do anticoagulante ou da espécie. O PRP congelado dos muares apresentou maior contagem leucocitária, quando comparado ao do equino ($P < 0,05$), nos dois anticoagulantes utilizados. O aumento da contagem leucocitária total no PRP congelado em relação ao fresco se deu em conjunto com o aumento da porcentagem e contagem absoluta de linfócitos observada. Hem (1976) ao congelar linfócitos de ratos utilizando DMSO observou maior sensibilidade de linfócitos B em relação aos T ao processo de criopreservação, baseando-se no aumento de linfócitos T após o congelamento. A justificativa estaria no controle da curva de resfriamento, que predisporia alguns tipos celulares a maiores danos. O autor também pressupôs o papel do DMSO como supressor de alguns tipos celulares. Jaksztat *et al.* (2004) constataram haver efeito do congelamento de secreções pulmonares sobre os leucócitos. Segundo os autores, a fragilidade de algumas células congeladas é maior do que em outras, sendo os linfócitos capazes de manterem-se morfológicamente mais intactos do que outros leucócitos. Balint *et al.* (2006) comprovou a dependência da qualidade celular obtida após congelamento com a curva controlada de refrigeração, demonstrando a melhora na recuperação de plaquetas e linfócitos de seres humanos com a utilização da mesma. Os autores fazem também uma consideração em relação a concentração de DMSO empregada: leucócitos requerem maiores concentrações do crioprotetor em relação as plaquetas, efeito este denominado pelos autores como “requerimento criobiológico”. Farrugia *et al.* (1996), ao observarem o efeito do congelamento em células vermelhas e leucócitos de seres humanos, contataram um menor conteúdo de células leucocitárias granulocíticas no congelamento. Os autores pontuam que substâncias criopreservantes (como glicerol e DMSO) podem alterar a membrana celular leucocitária, além de promover mudanças no núcleo e o extravazamento de conteúdo nuclear para fora da célula, causando a formação de *clumps* leucocitários. No presente trabalho, o PRP fresco utilizado para comparação de parâmetros hematológicos também recebeu a solução crioprotetora, havendo a possibilidade de formação de *clumps* não lidos pelo aparelho hematológico durante essa fase.

A contagem plaquetária após a criopreservação é um dos principais pilares na avaliação da qualidade do PRP criopreservado obtido. A contagem plaquetária encontra-se descrita na Tab. 7. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na contagem plaquetária automática ao se comparar

o PRP fresco e o congelado dentro de cada espécie, para cada anticoagulante. Tal fato comprova uma boa preservação da quantidade plaquetária durante o procedimento de criopreservação, sendo o primeiro passo para a viabilização do uso do potencial terapêutico do PRP após o seu descongelamento. Observou-se diferença ($P < 0,05$) entre as espécies, não havendo efeito do anticoagulante empregado. A contagem plaquetária total superior dos mueres foi também observada no PRP fresco sem adição de solução criopreservante e no sangue total, independentemente do anticoagulante empregado (Tab. 3), exceto em sangue total coletado em CS, no qual não houve diferença entre as espécies ($P > 0,05$).

Tabela 6. Valores médios \pm erro padrão de parâmetros hematológicos de PRP fresco e congelado (ambos com crioprotetor DMSO e glicose 5%) obtidos de equinos e muaras, de acordo com o anticoagulante (ACD e CS).

VARIÁVEIS	ACD				CS			
	EQUINO		MUAR		EQUINO		MUAR	
	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)
LEU (cell x 10 ³ /μL)	1,19 \pm 0,28 ^b	1,90 \pm 0,34 ^a	1,14 \pm 0,24 ^b	3,61 \pm 1,25 ^a	0,21 \pm 0,04 ^c	0,55 \pm 0,12 ^c	0,57 \pm 0,15 ^c	1,56 \pm 0,34 ^{ab}
RBC (cell x 10 ⁶ /μL)	0,03 \pm 0,00 ^d	0,06 \pm 0,01 ^c	0,05 \pm 0,00 ^c	0,13 \pm 0,02 ^b	0,03 \pm 0,00 ^d	0,15 \pm 0,07 ^a	0,04 \pm 0,01 ^{cd}	0,12 \pm 0,01 ^b
LINFpc (%)	84,31 \pm 3,83 ^c	96,18 \pm 1,05 ^a	85,73 \pm 4,69 ^c	93,16 \pm 3,40 ^{ab}	94,23 \pm 1,29 ^{ab}	96,27 \pm 1,07 ^a	84,36 \pm 4,58 ^c	87,54 \pm 4,17 ^{bc}
OUTROSpC (%)	15,69 \pm 3,83 ^a	3,82 \pm 1,05 ^b	14,63 \pm 4,69 ^a	6,84 \pm 3,40 ^b	5,08 \pm 1,29 ^b	3,73 \pm 1,07 ^b	15,64 \pm 4,58 ^a	12,46 \pm 4,17 ^a
LINFptot (cell x 10 ³ /μL)	1,08 \pm 0,27 ^b	1,85 \pm 0,33 ^a	0,95 \pm 0,14 ^b	3,37 \pm 1,12 ^a	0,40 \pm 0,06 ^c	0,73 \pm 0,14 ^{bc}	0,83 \pm 0,13 ^b	1,50 \pm 0,33 ^{ab}
OUTROStot (cell x 10 ³ /μL)	0,18 \pm 0,08 ^a	0,05 \pm 0,03 ^b	0,27 \pm 0,13 ^a	0,52 \pm 0,44 ^a	0,00 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,19 \pm 0,06 ^a	0,23 \pm 0,10 ^a
PDW (fL)	6,81 \pm 0,19 ^b	8,88 \pm 0,44 ^a	6,31 \pm 0,17 ^c	8,88 \pm 0,60 ^a	7,09 \pm 0,19 ^b	9,76 \pm 0,49 ^a	6,24 \pm 0,12 ^c	8,92 \pm 0,42 ^a
VPM (fL)	7,34 \pm 0,13 ^b	8,61 \pm 0,23 ^a	6,97 \pm 0,11 ^c	8,60 \pm 0,31 ^a	7,61 \pm 0,12 ^b	9,06 \pm 0,49 ^a	6,96 \pm 0,10 ^c	8,66 \pm 0,19 ^a
PLCR (%)	4,41 \pm 0,62 ^d	13,16 \pm 1,79 ^b	2,78 \pm 0,34 ^e	12,92 \pm 2,46 ^b	6,22 \pm 0,69 ^c	17,67 \pm 1,85 ^a	2,88 \pm 0,40 ^e	14,09 \pm 1,48 ^{ab}

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem ($P < 0,05$). WBC, contagem de leucócitos, RBC, contagem de eritrócitos, LINFpc, porcentagem de linfócitos do total de leucócitos, OUTROSpC, porcentagem de neutrófilos, monócitos e basófilos do total de leucócitos, LINFtot, linfócitos absolutos, OUTROStot, neutrófilos, monócitos e basófilos absolutos, PDW, largura da curva de distribuição de plaquetas, VPM, volume plaquetário médio, PLCR, índice de macrotrombócitos.

Tabela 7. Contagem plaquetária em aparelho hematológico e câmara de Neubauer de PRP fresco e congelado (ambos com crioprotetor DMSO e glicose 5%) obtidos de equinos e muaras, de acordo com o anticoagulantes (ACD e CS).

VARIÁVEIS	ACD				CS			
	EQUINO		MUAR		EQUINO		MUAR	
	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO (DMSO+GLI)	CONGELADO (DMSO+GLI)
PLT AUTOM	163,07 ± 10,91 ^b	188,62 ± 18,86 ^{Bb}	307,58 ± 31,39 ^a	342,46 ± 50,56 ^{Aa}	176,50 ± 15,23 ^b	156,39 ± 22,00 ^{Bb}	319,64 ± 32,82 ^a	335,14 ± 34,58 ^{Aa}
PLT NEU- BAUER		273,00 ± 18,52 ^{Aa}		303,69 ± 41,96 ^{Aa}		229,64 ± 26,94 ^{Aa}		276,64 ± 35,67 ^{Aa}

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúscula na coluna diferem (P<0,05).

A manutenção da contagem plaquetária, no entanto, não deve ser analisada como padrão único para determinação da qualidade do PRP. A morfologia celular também deve ser avaliada (Tab. 8). Shrivastava (2009) relata que ao ser exposta a baixas temperaturas, a plaqueta sofre mudanças morfológicas de discóide para esférica e há o aparecimento de projeções na superfície (pseudópodes). Nota-se, já nas análises dos parâmetros hematológicos, a diferença ($P < 0,05$) entre os índices VPM e PDW entre as amostras frescas e criopreservadas, independentemente da espécie e anticoagulante empregado. O aumento do volume celular plaquetário e da sua curva de distribuição plaquetária nas amostras criopreservadas podem ser interpretados como indicadores de alterações morfológicas, demonstrando uma maior heterogeneidade da população plaquetária estudada. Tanto o PDW quanto o VPM apresentaram valores superiores ($P < 0,05$) no PRP congelado quando comparados com o PRP fresco, para o mesmo anticoagulante, apesar da semelhança entre as espécies ($P > 0,05$). Da mesma forma, observa-se o aumento de macrotrombócitos (PLCR) nas amostras de PRP congelado em relação a sua matriz a fresco ($P < 0,05$). Como as amostras foram mantidas congeladas durante 10 dias sem manipulação, especula-se que a formação de macrotrombócitos ocorreu estimulada pela sedimentação celular. Van der Meer e Korte (2011) comprovaram que a agitação suave de compostos plaquetários armazenados auxilia não só na distribuição de oxigênio, mas também na prevenção da ocorrência de sedimentação plaquetária, fator importante a ser considerado também na ativação dessas células estimulada pelo contato. No presente estudo, não se sabe, no entanto, quanto essa sedimentação contribuiu para as alterações morfológicas plaquetárias observadas.

A correlação de Spearman, dentro de cada grupo do PRP criopreservado, entre o PDW e VPM foi positiva e forte, com o coeficiente de determinação (r) variando de 0,96 a 0,99 e $P < 0,001$. A relação direta do PDW com o VPM, é descrita em seres humanos saudáveis (Buttarello e Plebani, 2008). Esta relação se mantém nos pacientes com trombocitopenia por destruição periférica, em que ambos os parâmetros se encontram elevados, enquanto nas trombocitopenias por deficiência de produção, o PDW aumenta e o VPM diminui. A dispersão do volume plaquetário (PDW) depende do processo de produção plaquetária pela fragmentação do citoplasma do megacariócito (Buttarello e Plebani, 2008).

Entretanto, na avaliação do VPM, uma correlação inversamente proporcional à contagem plaquetária foi encontrada, como já descrito por outros autores (Bain, 1985). Existe uma hipótese teórica que a produção plaquetária seja regulada para manter uma “massa plaquetária” (produto da contagem plaquetária e o VPM) circulante constante (Thompson e Jakubowski, 1988). No

presente estudo, esse achado pode ser explicado pela metodologia de análise, uma vez que o VPM se relaciona a massa plaquetária. O aumento de MVP nas condições em que ocorre aumento do turnover plaquetário provavelmente é mediado pela ação de citocinas (IL-6 e 11 e trombopoetina), que atuam na ploidia do megacariócito levando à produção de plaquetas maiores (Buttarello e Plebani, 2008).

Constatou-se o aumento das células em estado ativado, independente da espécie ou anticoagulante empregado, em relação ao seu comparativo fresco. A viabilidade plaquetária está relacionada com a sua composição celular, estrutura e capacidade funcional. No entanto, o desafio em se criopreservar plaquetas recai exatamente sobre a dificuldade de preservação desses mesmos parâmetros. (Shrivastava, 2009). Mesmo havendo a correta condução do protocolo de criopreservação, a crioinjúria é uma realidade (Balint, *et al.*, 2002).

Na tentativa de se minimizar o processo de crioinjúria, a taxa de resfriamento controlado empregada no processo de criopreservação é de fundamental importância. Caso taxas muito velozes sejam empregadas, haverá a propensão de formação de cristais de gelo intracelulares, causadores de lesões mecânicas de membrana (Landi *et al.*, 2004; Balint *et al.*, 2006). No presente estudo, a taxa de resfriamento empregada foi lenta, de $-0,04^{\circ}\text{C}/\text{min}$, similar a empregada por Fantini *et al.* (2016), que mantiveram uma taxa de resfriamento de $-0,07^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na criopreservação de PRP equino.

Tabela 8. Valores médios \pm erro padrão de parâmetros morfológicos avaliados em microscopia óptica de inversão de fases e fixação com formolsalina do conteúdo plaquetário de PRP fresco e criopreservado obtido em dois anticoagulantes (ACD e CS) e em duas espécies (equina e muar).

MORFOLOGIA PLAQUETÁRIA	ACD				CS			
	EQUINO		MUAR		EQUINO		MUAR	
	FRESCO	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO	CONGELADO (DMSO+GLI)	FRESCO	CONGELADO (DMSO+GLI)
INATIVADA INCERTA (%)	+ 69,90 \pm 2,58 ^{Aa}	32,00 \pm 1,90 ^{Bb}	73,40 \pm 1,83 ^{Aa}	29,25 \pm 2,82 ^{Bb}	70,78 \pm 3,92 ^{Aa}	28,79 \pm 2,11 ^{Bb}	72,00 \pm 3,73 ^{Aa}	30,50 \pm 2,50 ^{Bb}
ATIVADA (%)	30,10 \pm 2,58 ^{Bb}	68,00 \pm 1,90 ^{Aa}	26,60 \pm 1,83 ^{Bb}	70,75 \pm 2,82 ^{Aa}	29,22 \pm 3,92 ^{Bb}	71,21 \pm 2,11 ^{Aa}	28,00 \pm 3,73 ^{Bb}	69,50 \pm 2,50 ^{Aa}

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúscula na coluna, diferem ($P < 0,05$).

Além da taxa de resfriamento, a adição do crioprotetor é indispensável para a manutenção da saúde celular, pois o mesmo atua diretamente na diminuição do gradiente osmótico entre o espaço extra e intracelular (Balint *et al.*, 2002). Na literatura, o DMSO desponta como a melhor opção de crioprotetor, devido a sua penetração rápida na membrana, possuindo efeito inibitório superior a outros crioprotetores na ativação plaquetária (Lozano *et al.*, 1999; Landi *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2011). Vários autores citam a predominância das concentrações de DMSO em 3 e 6% (Valeri *et al.*; 1974; Brodthagen *et al.*, 1985; Lozano *et al.*, 1999; Cetin *et al.*, 2001; Balint *et al.*, 2002; Valeri *et al.*, 2005; Hornsey *et al.*, 2008; Appleman *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Dumont *et al.*, 2013). No presente estudo, utilizou-se como crioprotetor uma solução de DMSO a 3% diluído em glicose. Optou-se pela adição de glicose ao meio, uma vez que a disponibilidade do combustível metabólico é crucial para a viabilidade de células criopreservadas (Shrivastava, 2009). Deve-se evitar que as plaquetas entrem em processo de glicólise anaeróbica, que conduz ao acúmulo de ácido lático e consequente queda de pH. A perda de viabilidade morfológica ocorre em pH menor do que 6,0 ou maior do que 7,5. O meio deve, portanto, possuir capacidade tampão eficaz o suficiente para controlar o pH dentro de faixas aceitáveis pela plaqueta (Shrivastava, 2009; Tynngård, 2009). A glicose, nesse aspecto, possui efeitos benéficos diretos para a criopreservação plaquetária, pois fornece o combustível celular e atrasa ou impede o início da glicólise anaeróbica. No entanto, ela pode também prejudicar o equilíbrio osmótico do ambiente ao qual está sendo adicionada. Foi realizado uma avaliação em osmômetro de PRP sem criopreservante, PRP com DMSO a 3% e PRP com DMSO 3% diluído em glicose 5% (dados não mostrados). O PRP puro obteve osmolaridade menor quando comparado às amostras com DMSO e DMSO com glicose. No entanto, entre as amostras com criopreservante, a diferença de osmolaridade entre as amostras com e sem adição de glicose foi pequena, porém sendo maior nas amostras com adição de glicose. No presente estudo, a ativação plaquetária converteu-se de uma média aproximada de 30% nas amostras frescas para 70% nas amostras congeladas, semelhante entre espécies e anticoagulantes ($P > 0,05$). Esses resultados são inferiores aos obtidos por Fantini *et al.* (2016), que obtiveram 43% de ativação plaquetária e manutenção de 35% do valor inicial de agregação após congelamento de PRP equino utilizando DMSO a 3%. Pressupõe-se que a adição da glicose possa ser responsável por essa diferença, uma vez que a metodologia entre os dois trabalhos foi similar.

É importante ressaltar a variabilidade individual presente em fatores que influenciam diretamente na qualidade do PRP, tanto em sua fração fresca quanto na criopreservada. Essa variabilidade

é comprovada pelo alto CV de parâmetros (dados não demonstrados) como WBC, RBC, VPM, PDW e PLCR em amostras submetidas ao mesmo protocolo. A premissa de que o PRP é uma terapia personalizada é verídica, uma vez que cada paciente possui parâmetros próprios em sangue total que irão ser refletidos naqueles obtidos no PRP. A qualidade da criopreservação será também uma consequência da qualidade manifestada no PRP fresco. Respostas variadas à terapia com PRP relatadas na literatura são devidas não somente aos diferentes protocolos e métodos de obtenção do composto, mas também às particularidades na composição celular inerente a cada indivíduo. Fatores como idade, gênero, raça e espécie merecem maiores estudos, na tentativa de elucidar essas variabilidades na qualidade do PRP. Ressalta-se que dois animais (um equino e um muar) foram retirados da análise de dados, por apresentarem resultados extremamente discrepantes em relação aos outros animais.

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento na avaliação dos diferentes anticoagulantes para a confecção de PRP e criopreservação do composto em equinos e muares, pode-se obter as seguintes conclusões:

- A contagem de plaquetas com utilização dos anticoagulantes ACD e CS, no sangue total, como referência inicial para a produção do PRP, é mais fidedigna do que a contagem de plaquetas no EDTA para a produção do PRP. Apesar disso, pelas alterações celulares produzidas pelo ACD e CS o anticoagulante EDTA deve ser o padrão utilizado para a avaliação da saúde animal pelo hemograma;
- Baseando-se na premissa de que a presença leucocitária é deletéria à qualidade do PRP, o anticoagulante CS mostrou-se mais eficiente na redução de leucócitos totais em relação ao ACD, em ambas as espécies;
- O CS provou-se melhor anticoagulante para a confecção de PRP em muares, uma vez que proporcionou maior concentração plaquetária;
- O protocolo empregado na obtenção do PRP foi mais adequado para a espécie muar em relação à equina, uma vez que proporcionou maior concentração plaquetária em muares;

- A criopreservação foi responsável por causar lesão plaquetária, uma vez que amostras criopreservadas apresentaram quantidade significativamente maior de células em estado morfológico de ativação.
- Por não haver diferenças significativas entre a qualidade do PRP criopreservado obtido entre os diferentes anticoagulantes empregados (principalmente em parâmetros morfológicos plaquetários), sugere-se o CS como melhor anticoagulante na obtenção do PRP em equinos e muares.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de estratégias que promovam a regeneração tecidual é um esforço atual de instituições clínicas e científicas ao redor do mundo, principalmente no que diz respeito ao PRP. Aplicações clínicas são necessárias para validar os efeitos biológicos do PRP, fresco e criopreservado, especialmente em muares, que mostraram particularidades hematológicas em relação aos equinos. A criopreservação permanece um desafio para a viabilização da terapia com PRP, uma vez que a manutenção da qualidade plaquetária após a sua exposição ao frio tem significativa queda.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELLANET I., PRADES, M. Intra-articular platelet rich plasma (PRP) therapy: evaluation in 42 sport horses with OA. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association*, Guarujá, Brasil, Setembro, 2009.

AHNADI, C. E.; SABRINAH, C. E.; LEPINE, M. et al. Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the Advia 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy. *Thromb Haemost*, v. 90, p. 940-948, 2003.

ÁLVAREZ, M. E.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J. U. Monitoring bacterial contamination in equine platelet concentrates obtained by the tube method in a clean laboratory environment under three different technical conditions. *Equine Vet J*, v. 42, p. 63-67, 2010.

- ANDERSON, W.S. Fertile Mare Mules. *J of Hered*, v. 30, p. 62-65, 1939.
- ANDRADE, M. G. S.; BRANDÃO, C. J. F.; SÁ, C. N. et al. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 105, p. e5-e12, 2008.
- ANDREASEN, J. B.; PISTOR-RIEBOLD, T. U.; KNUDSEN, I. H., et al. Evaluation of different sized blood sampling tubes for thromboelastometry, platelet function, and platelet count. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, v. 52, n. 5, p. 701-706, 2014.
- ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M., et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J of Orthop Res*, v. 23 p.281-286, 2005.
- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A. T. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends in Biotech*, v. 24, p. 227-234, 2006.
- ANITUA, E.; ALKHRAISAT, M. H.; ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J of Control Rel*, v. 157, p. 29-38, 2012.
- APPLEMAN, E. H.; SANCHAIS, B. S.; PATEL, R., et al. Cryopreservation of canine platelets. *J Vet Intern Med*, v. 23, p. 138-145, 2009.
- ARAÚJO, N.A. *Origem histórica do jumento doméstico: suas raças*. Patos de Minas, Ed. Grafipress, 1 ed, 311 p., 2010.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.U.; PASTOR, J. et al. Evaluation of single and Double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci* v. 81, p.237-245, 2006.
- AUBUCHON, J. P.; HERSCHEL, L.; ROGER, J. et al. Preliminary validation of a new standard of efficacy for stored platelets. *Transf*, v. 44, p. 36-41, 2004.
- BAIN, B. J. Platelet count and platelet size in males and females. *Scandinavian Journal of Haematology*, v. 35, p. 77-79, 1985.

- BAKSH, N.; HANNON, C. P.; MURAWSKI, C. D. et al. Platelet-Rich Plasma in Tendon Models: A Systematic Review of Basic Science Literature. *Arth: The J of Arth and Rel Surg*, v. 29, p. 596-607, 2013.
- BALINT, B.; VUCÉTIĆ D.; TRAJKOVIC-LAKIC, Z. et al. Quantitative, functional, morphological and ultrastructural recovery of platelets as predictor for cryopreservation. *Haematol*, v. 32, p. 363-375, 2002.
- BALINT, B.; VUCETIC, D.; DRASKOVIC, B. et al. Microprocessor-controlled vs. “dump-freezing” platelet and lymphocyte cryopreservation: a quantitative and qualitative comparative study. *Vojnosanit Pregl*, v. 63, p. 261-270, 2006.
- BAUMGARTEN, A.; WILHELMI, M.; GANTER, M. et al. Changes of platelet function and blood coagulation during short-term storage of CPDA-1-stabilised ovine blood. *Res in Vet Sci*, v. 91, p. 150-158, 2011.
- BEAUJEAN, F. Dernières mises au point concernant la conservation des concentrés de plaquettes à 4°C. *Tranfus Clin Biol*, v.7, p.457-461, 2000.
- BENDINELLI, P.; MATTEUCCI E.; DOGLIOTTI, G. et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-κB inhibition via HGF. *J Cell Physiol*, v. 225, p. 757-766, 2010.
- BENNET, N. T.; SCHULTZ, G. S. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *The Am J of Surg*, v. 165, p. 728-737, 1993.
- BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A. et al. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports*, v. 21, p. 554-561, 2011.
- BOSWELL, S. G.; COLE, B. J.; SUNDMAN, B. S. et al. Platelet-Rich Plasma: A Milieu of Bioactive Factors. *Arthrosc*, v. 28, p. 429-439, 2012.
- BOUDREAUX, M. K. Thrombopoiesis. In: Weiss D. J.; WARDROP, K. J. (eds). *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Iowa, Wiley-Brackwell, 2010. p. 56-60.

- BOURNAZOS, S.; RENNIE, J; HART, S. P. et al. Choice of anticoagulant critically affects measurement of circulating platelet-leukocyte complexes. *Art, thromb, and vasc boil*, v. 28, p. 2-3, 2008.
- BROECKX, S.; ZIMMERMAN, M.; CROCETTI, S. et al. Regenerative Therapies for Equine Degenerative Joint Disease: A Preliminary Study. *Plos One*, v. 9, p. 1-11, 2014.
- BROTHAGEN, U. A.; ARMITAGE, W. J.; PARMAR, N. Platelet cryopreservation with glycerol, dextran, and mannitol: recovery of 5-Hydroxytryptamine uptake and Hypotonic Stress Response. *Cryobiol*, v. 22, p. 1-9, 1985.
- BRUNSO, L.; SEGURA, D.; MONREAL, L. et al. The secretory mechanisms in equine platelets are independent of cytoskeletal polymerization and occur through membrane fusion. *Platelets*, v. 21, p. 658-666, 2010.
- BURN, C.C.; DENNISON, T.D.; WHAY, H.R. Relationships between behavior and health in working horses, donkeys, and mules in developing countries. *Applied Animal Behav Sci*, v. 126, p. 109-118, 2010.
- BUTTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts - State of the art. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 130, p. 104-116, 2008.
- CAMAC, R. Introduction and origins of the donkey. In: SVENDSEN, E.D. *The professional handbook of the donkey*. 3 ed. London: White Books, 1997. Cap 1, p. 9-18.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C. SAMÚDIO, I. J. Autologous Platelet Concentrates as an Adjunctive Treatment for Chronic Laminitis in a Mare with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. *Jour Equi Vet Sci* v. 33, n. 3, p.191 -195, 2013.
- CARMONA, J. U.; RÍOS, E.; VILAR, J. M. et al. Effect of two anticoagulants on the cell count and platelet activation parameters from bovine platelet rich plasma. *Archi de med vet*, v. 46, p. 375-380, 2014.
- CASTILLO, T. N.; POULIOT M. A.; KIM, H. J. et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *The American Journal of Sports Medicine*, v. 39, n. 2, p. 266-271, 2011.

- CETIN, M.; ESER, B.; ER, O. et al. Effects of DMSO on platelet functions and P-selectin expression during storage. *Transf and Apher Sci*, v. 24, p. 261-267, 2001.
- CRANE, M. Medical In: SVENDSEN, E.D. *The professional handbook of the donkey*. 3 ed. London: White Books, 1997. Cap 2, p. 19-36.
- DAVIES, C. T.; FEW, M. J.; FOSTER, K. G., et al. Plasma catecholamine concentration during dynamic exercise involving different muscle groups. *European Journal of Applied Physiology*, v. 32, p. 195-206, 1974.
- DE ALUJA, A. S.; BOUDA, J.; LÓPEZ, A. C. et al. Valores bioquímicos em sangue de burros antes y después del trabajo. *Veterinaria México*, Ciudad de Mexico, v.32, p.271-278, 2001.
- DE OLIVEIRA, L. H., DE LIMA, T.; MIKAEL, L. D. et al. Avaliação do leucograma como indicador de estresse em cães (*Canis familiaris*) da raça poodle submetidos a processo de higienização e tosa atendidos em “pet shops” no município de patos-PB. *Acta Vet Basil*, v. 7, p. 43-45, 2013.
- DELONG, J. M.; RUSSELL, R. P.; MAZZOCCA, A. D. Platelet-Rich Plasma: The PAW classification system. *Arthr: The J of Arthr and Relat Surgv*. v. 28, p. 998-1009, 2012.
- DIAS, D. C. Hematologia e bioquímica sérica em muare. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2014, 102 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências).
- DUARTE, P. C.; MIRANDA, A. L. S.; KASSEM, I. G. et al. Associação do PRP ao tratamento convencional na laceração de tendão extensor digital longo. In: XV Conferência Anual ABRAVEQ, Campos do Jordão, maio/2014.
- DUMONT, L. J.; CANCELAS, J. A.; DUMONT, D. F. et al. A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers. *Transf*, v. 53, p. 128-137, 2013.

- EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotech*, v. 27, p. 158-167, 2008.
- EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for wound healing. *Plast and Reconst Surg*, v. 114, p. 1502-1508, 2003.
- FANTINI, P. Plasma Rico em Plaquetas: Padronização em equídeos, criopreservação e efeito terapêutico na desmiste do ligamento supraespinhoso de equinos, Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 2014, 114 p. (Tese, Doutorado em Ciência Animal).
- FANTINI, P.; PALHARES, M. S.; PRADES, M. et al. Criopreservação do plasma rico em plaquetas de equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 68, p. 73-81, 2016.
- FAZIO, E.; MEDICA, P.; CRAVANA, C. et al. Comparative endocrinological responses to short transportation of Equidae (*Equus asinus* and *Equus caballus*). *Anim Sci J*, v. 84, p. 258-263, 2013.
- FERRUGIA, A.; SHEA, N.; KNOWLES, S. et al. Cryopreservation of red blood cells: Effect of freezing on red cell quality and residual lymphocyte immunogenicity. *J Clin Pathol*, v. 46, p. 742-745, 1993.
- FILARDO, G.; KON, E.; RUIZ, M. T. P. et al. Platelet-Rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, v. 20, p. 2082-2091, 2011.
- FONTENOT, R. L.; SINK, C. A.; WERRE, S. R. et al. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Can Vet J*, v. 53, p. 1266-1272, 2012.
- GADER, A. G. M. A.; GHUMLAS, A. K. A.; HUSSAIN, M. F. et al. The ultrastructure of camel blood platelets: A comparative study with human, bovine and equine cells. *Platelets*, v. 19, p. 51-58, 2008.

- GAO, D. Y.; NEFF, K.; XIAO, H. Y. et al. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I: Platelet activation during cold storage (at 22°C and 8°C) and cryopreservation. *Cryobiol*, v. 38, p. 225-235, 1999.
- GARDNER, F. H. Platelet preservation problems. *Cryobiol*, v. 5, p. 42-48, 1968.
- GIRALDO, C. E.; LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M. E. et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res*, v. 9, p. 1-10, 2013.
- GIRALDO, C. E.; ÁLVAREZ, M. E.; CARMONA, J. U. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research*, v. 11, p. 1-7, 2015.
- GIRARDI, A.M. Parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. Dissertação. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2012.
- GRONDIN, T. M.; DEWITT, S. F. Normal hematology of the horse and donkey. In: Weiss D. J.; WARDROP, K. J. (eds). *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Iowa, Wiley-Brackwell, 2010. p. 821-828.
- GUL, S.T.; AHMAD, M; KHAN, A. et al. Haemato-Biochemical observations in apparently healthy equine species. *Pakistan Vet J*, v. 27, p. 155-158, 2007.
- GUPTA, A.K.; VARSHEY, J.P.; UPPAL, P.K. Comparative studies on biochemical indices in different breeds of equines. *Indian Vet J*, v.71, p. 26-30, 1994.
- HANDIN, R. I.; VALERI, C. R. Improved viability of previously frozen platelets. *Blood* v.40, p. 509-513, 1972.
- HARRIS, N. L.; HUFFER, W. E., VON STADE, E. et al. The Effect of Platelet-Rich Plasma on Normal Soft Tissues in the Rabbit. *J Bone Joint Surg Am*, v. 94, p. 786-793, 2012.

- HASEGAWA, H.; RAHMAN, I., M. M.; KIROSHITA, S. et al. Separation of dissolved iron from the aqueous system with excess ligand. *Chemosph*, v. 82, p. 1161-1167, 2011.
- HEM, E. Freezing of Rat Lymphocytes. I. The Effects of Dimethyl Sulfoxide and Freezing on the Phytohemagglutinin – and Pokeweed Mitogen-Responding Lymphocyte Subpopulation. *Cryobiol*, v. 13, p. 134-141, 1976.
- HENZE, A.; AUMER, F., GRABNER, A. et al. Genetic differences in the serum proteome of horses, donkeys and mules are detectable by protein profiling. *Brit J of Nut*, v. 106, p. 170-173, 2011.
- HORNSEY, V. S.; MCMILLAN, L.; MORRISON, A. et al. Freezing of buffy coat-derived, leukoreduced platelet concentrates in 6 percent dimethyl sulfoxide. *Transf*, v. 48, p. 2508-2514, 2008.
- JAKSTAT, E.; HOLZ, O.; PAASCH, K. et al. Effect of freezing sputum samples on flow cytometric analysis of lymphocyte subsets. *Eur Respir J*, v. 24, p. 309-312, 2004.
- JOHNSON, L. N.; WINTER, K. M.; REID, S. et al. Cryopreservation of buffy-coat derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. *Cryobiol*, v. 62, p. 100-106, 2011.
- JOHNSON, L.; COOREY, C. P.; MARKS, D. C. The hemostatic activity of cryopreserved platelet is mediated by phosphatidylserine-expressing platelets and platelet microparticles. *Transf*, v. 54, p. 1917-1926, 2014.
- JONES, W.E.; JOHNSEN, D.W. A fertile female mule. *J of Equi Vet Sci*, v. 5, p. 87-90, 1985.
- LANDI, E. P.; ROVERI, E. G.; OZELO, M. C. et al. Effects of platelet concentration in collecting and freezing dry platelets concentrates. *Transf and Aph Sci*, v. 30, p. 205-202, 2004.
- LASSEN E. D.; SWARDSON, C. J. Hematology and Hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. *Vet Clin of North Am: Equi Pract – Clin Pathol*. v. 2, p. 351-388, 1995.

- LINDEMANN, S.; TOLLEY, N. D.; DIXON, D. A. et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *The J of Cell Biol*, v. 154, 2001.
- LOZANO, M. L.; RIVERA, J.; CORRAL, J. et al. Platelet cryopreservation using a reduced dimethyl sulfoxide concentration and second-messenger effectors as cryopreserving solution. *Cryobiol*, v. 39, p. 1-12, 1999.
- MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.85, p.638-646, 1998.
- MARX, R. E. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma preparation [discussion]. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 58, p. 300-301, 2000.
- MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 62, p. 489-496, 2004.
- MCCARREL, T. M.; MINAS, T.; FORTIER, L. A. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*, v. 94, p. 141-148, 2012.
- MCFARLAND, D. C.; ZHANG, C.; THOMAS, H. C. et al. Confounding effects of platelets on flow cytometric analysis and cell-sorting experiments using blood-derived cells. *Intern Society for Analytl Citol, Cytom Part A*, v. 69A, p. 84-94, 2005.
- MEYERS, K. M.; HOLMSEN, H.; SEACHORD, C. L. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J of Physiol*, v. 43, p. 454-461, 1982.
- MODY, M.; LAZARUS, A. H.; SEMPLE, J. W. et al. Preanalytical requirements for flow cytometric evaluation of platelet activation: choice of anticoagulant. *Transf Med*, v. 9, p. 147-154, 1999.
- MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G. A. C. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, v. 33, p. 381-394, 2003.

- MORALES, F.; COUTO, C.G.; IAZBIK, M. C. Effects of 2 Concentrations of Sodium Citrate on Coagulation Test Results, von Willebrand Factor Concentration, and Platelet Function in Dogs. *J of Vet Intern Med*, v. 21, p. 472-475, 2007.
- NABITY, M. B.; RAMAIAH, A. K. Neutrophil Structure and Biochemistry. In: FELDMAN, B.; ZINKL, J.; JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary haematology*. 6 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 40, p. 263-267.
- NAGATA, M. J. H.; MESSORA, M. R.; FURLANETO, F. A. C. et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous Platelet-Rich Plasma: An experimental study in rabbits. *Eur J of Dent*, v. 4, p. 395-402, 2010.
- NIEMAN, D. C., & NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L. The immune response to exercise. *Seminars in Hematol*, v. 31, p. 166 – 179, 1994.
- O'SHAUGHNESSEY, K.; MATUSKA, A.; HOEPPNER, J. et al. Autologous protein solution prepared from the blood of osteoarthritic patients contains an enhanced profile of anti-inflammatory cytokines and anabolic growth factors. *J of Orthop Res*, v. 32, p. 1349-1355, 2014.
- PAES, P. R. O.; GONÇALVES, R. C.; BARIONI, G. et al. O leucograma como indicador de estresse no desmame e no transporte rodoviário de bovinos da raça Nelore. *Semina: Ciênc Agr, Londrina*, v. 33, p. 305-312, 2012.
- PAES LEME, F. O.; WURZINGER, L. J.; VASCONCELOS, A. C. et al. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 58, p. 149-157, 2006.
- PALHARES, M. S. Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I. Características termodinâmicas e funcionais; II. Desempenho reprodutivo das éguas inseminadas, Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 1997, 246p. (Tese, Doutorado em Reprodução)
- PANDE, I.; BAJPAI, V. K.; CHANDRA M. et al. Platelet ultrastructural morphology and its relevance in essential hypertension. *Inter J of Cardiol*, v. 41, p. 13-20, 1993.

- PELAGALLI, A.; BELISARIO, M. A.; TAFURI, S. et al. Adhesive Properties of Platelets from Different Animal Species. *J Comp Path*, v. 128, p. 127-131, 2003.
- PFISTERER, H.; MICHMAYR, G.; WEBER, F. In vivo survival of rabbit platelets by rapid freezing and thawing. *Blut*, v. 19, p. 347-350, 1969.
- PICCIONE, G.; CASELLA, S.; GIANETTO, C. et al. Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse. *J of Equi Vet Sci*, v. 30, p. 371-375, 2010.
- PRITCHARD, J.C., LINDBERG, A.C., MAIN, D.C.J. et al. Assessment of the welfare of working horses, mules and donkeys, using health and behavior parameters. *Prevent Vet Med*, v. 69, p. 265-283, 2005.
- PUSTERLA, N.; WATSON, J. L.; WILSON, W. D. Diagnostic Approach to Infectious Respiratory Disorders. *Clin Techn in Equi Pract*, v. 5, p. 174-186, 2006.
- RAMIREZ, S. GAUNT, S.D., MCCLURE J. et al. Detection and effects on platelet function of anti-platelet antibody in mule foals with experimentally induced neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J of Vet Intern Med*, v. 13, p. 534-539, 1999.
- RAYNEL, S.; PADULA, M. P.; MARKS, D. C. et al. Cryopreservation alters the membrane and cytoskeletal protein profile of platelet microparticles, *Transf*, v. 10, p.1-11, 2015.
- RIBEIRO, C.S.; MARTINS, E.A.N.; RIBAS, J.A.S. et al. Avaliação de constituintes séricos em equinos e muarees submetidos à prova de resistência de 76 km, no Pantanal do Mato Grosso, Brasil. *Cienc Rural*, v. 34, p. 1081-1086, 2004.
- RINALDUCCI, S; ZOLLA, L. Biochemistry of storage lesions of red cell and platelet concentrates: A continuous fight implying oxidative/nitrosative/phosphorylative stress and signaling. *Transf and Apher Sci*, v. 52, p. 262-269, 2015.
- SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is Platelet-Rich Plasma the perfect enhancement factor? A current review. *The Internat J of Oral & Maxillof Implants*, v. 18, p. 93-103, 2003.

- SAS – Statistical Analysis System -, Institute Inc., Cary, NC, USA. V. 9.0 (TS MO), 2002.
- SEGURA, D.; MONREAL, L; PÉREZ-PUJOL, S. et al. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *J Vet Intern Med*, v. 20, p. 581-588, 2006.
- SHRIVASTAVA, M. The platelet storage lesion. *Transfand Apher Sci*, v. 41, p. 105-113, 2009.
- SLICHTER, S. J.; JONES, M.; RANSOM, J. et al. Review of in vivo studies of Dimethyl Sulfoxide cryopreserved platelets. *Transf Med Rev*, v. 28, p. 212-225, 2014.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Plaquetas. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap 4., p. 186-212.
- TEXTOR, J. Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. *Vet Clin Equine* v.27, p.275-298, 2011.
- TEXTOR, J. A.; TABLIN, F. Activation of equine platelet-rich plasma: comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Vet Surg*, v. 41, p. 784-794, 2012.
- TEXTOR J. A., TABLIN F.: Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. *Vet Surg*. v.42, p. 499-510, 2013.
- THEORET, C. L. The pathophysiology of wound repair. *The Vet Clin of North Am Equi Pract* v.21, p.1-13, 2005.
- THOMPSON, C. B.; JAKUBOWSKI, J. A. The Pathophysiology and Clinical Relevance of Platelet Heterogeneity. *J. Am. Soc. Hemat.*, v. 72, p. 1-8, 1988
- TORRES, A. Di P.; JARDIM, W. R. Jumentos e Muares. In: TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. *Criação de cavalos e de outros equinos*. 1 ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1977. p. 431-479.

- TSUZUKI, N.; OSHITA, N.; SEO, J. et al. Effect of Platelet-rich plasma-incorporated gelatin hydrogel microspheres and subchondral drilling on equine cartilage defects. *J of Equi Vet Sci*, p. 820-824, 2014.
- TYNNGÅRD, N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. *Transf and Apher Sci*, v. 41, p. 97-104, 2009.
- VALERI, C. R.; FEINGOLD, H.; MARCHIONNI, L. D. A simple method for freezing human platelets using 6% Dimethylsulfoxide and storage at -80°C. *Blood*, v. 43, p. 131-136, 1974.
- VALERI, C. R.; RAGNO, G.; KHURI, S. Freezing human platelets with 6 percent dimethyl sulfoxide with removal of the supernatant solution before freezing and storage at -80°C without postthaw processing. *Transf*, v. 45, p. 1890-1906, 2005.
- VAN DER MEER, P. F.; KORTE, D. Platelet preservation: Agitation and containers. *Transf and Apher Sci*, v. 44, p. 297-304, 2011.
- VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em medicina equina. *Pesq Vet Bras*, v. 32, p.106-110, 2012.
- WOODELL-MAY, J. E.; RIDDERMAN, D. N.; SWIFT, M. J. et al. Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a Hematology Analyser and preparation techniques for counting. *The J of Craniofac Surg*, v. 16, p. 749-756, 2005.
- WURZINGER, L J.; SCHMID-SCHÖNBEIN, H. The role of fluid dynamics in triggering and amplifying haemostatic reactions in thrombogenesis. *Blood Flow Large Art.*, v. 15, p.215-226, 1990.
- YOKOMURO, M.; EBINE, K.; SHIROMA, K. et al. Safety and efficacy of autologous platelet transfusion in cardiac surgery: comparison of cryopreservation, blood collection on the day before surgery, and blood collection during surgery. *Cryobiol*, v. 38, p. 236-242, 1999.

ZIMMERMANN, R.; ARNOLD, D.; STRASSER, E. et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*, v. 83, p. 283-289, 2003.

ZMIGRODZKA, M.; WINNIKA, A.; GUZERA, M. Comparison of the influence of EDTA-K3 and sodium citrate on haematology analysis in healthy dogs. *Polish J of Vet Sci*, v. 15, p. 391-392, 2012.

ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 351 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Criopreservação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua comparação entre muare e equinos”, que tem como responsável Maristela Silveira Palhares, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 19/11/2014. Este certificado espira-se em 19/11/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 351 / 2014, related to the Project entitled “Platelet Rich Plasma (PRP) cryopreservation and its comparison between mules and equines. ”, under the supervision of Maristela Silveira Palhares, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 19/11/2014. This certificates expires in 19/11/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 19/11/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2: DADOS BRUTOS ANIMAIS E7 E M1

Animal	Esp	Anticoag	T	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	LYM p	OTHER pc	LYMtot	OTHERtot	RDWSD	RDWCV	PDW	MPV	PLCR	Neub	Mrest	Minc	Mativ
M1	M	EDTAtot	1	10,6	10	14,9	43,5	43,4	14,9	34,3	6*	28,3	71,7	3	7,6	36,1	21,8	*	*	*				
M1	M	ACDtot	1	8,7	7,94	11,8	33,9	42,7	14,9	34,8	228	29,1	70,9	2,5	6,2	35,5	21,5	6,5	6,1	0				
M1	M	CITtot	1	9	8,88	13,2	38,4	43,2	14,9	34,4	112	33,8	66,2	3	6	36,3	22,1	7	6,1	0				
M1	M	PRPACD	1	2,9	0,07	0	0				434	66,1	33,9	1,9	1			6,1	6,7	1,2	157	48	24	28
M1	M	PRPCIT	1	0,1	0,06	0	0				513							5,8	6,6	1,5	196	42	26	32
M1	M	PRPACDcc	1	2,4	0,06	0	0				394	71,8	28,2	1,7	0,7			5,9	6,7	2,1				
M1	M	PRPCITcc	1	0,1	0,06	0	0				433							6,1	6,8	2,4				
M1	M	EDTAtot	3	8,5	10,1	15,1	44,3	43,7	14,9	34,1	5*	24,5	75,5	2,1	6,4	36	21,8	*	*	*				
M1	M	ACDtot	3	8,8	8,56	12,8	36,7	42,9	15	34,9	180	23,4	76,6	2,1	6,7	35,8	21,4	6	5,8	0				
M1	M	CITtot	3	6,1	8,72	12,9	38	43,6	14,8	33,9	42	35,5	34,5	2,2	3,9	35,9	21,5	7,7	6,2	0				
M1	M	PRPACD	3	0,9	0,03	0	0				415	96	4	0,9	0			5,5	6,2	0,6	508	57	16	37
M1	M	PRPCIT	3	0,3	0,06	0	0				400							6,3	7	3,3	524	46	40	14
M1	M	PRPACDcc	3	0,8	0,04	0	0				359	94,3	5,7	0,8	0			5,9	6,6	2				
M1	M	PRPCITcc	3	0,3	0,05	0	0				345							6,2	6,8	3,3				
M1	M	PRPACDDC	1	0,3	0,19	0	0,2				451							10	9,1	18,2	159	10	34	54
M1	M	PRPCITDG	1	0,3	0,15	0	0,1				407*	89,3*	10,7*	0,3*	0*			9*	8,6*	12,3*	296	10	44	46
M1	M	PRPACDC	1	0,3	0,05	0	0				127*	88,4*	11,6*	0,3*	0*			7,9*	8,5*	12*	296	26	17	57
M1	M	PRPCITC	1	1,8	0,16	0	0,2				392*	84,9*	15,1*	1,5*	0,3*			9,9*	8,9*	15,5*	440	3	25	72
M1	M	PRPACDDC	3	2,5	0,11	0	0,1				491	96,8	3,2	2,4	0,1			6,8	7,3	5,3	376	4	22	74
M1	M	PRPCITDG	3	0,3	0,1	0	0,1				284*	89,8*	10,2*	0,3*	0*			8,3*	8,4*	13,5*	417	10	10	80
M1	M	PRPACDC	3	0,9	0,11	0	0,1				396	94,3*	5,7*	0,8*	0,1*			7,9	8	7,4	492	3	22	75
M1	M	PRPCITC	3		0,12	0	0,1				292*							9,7*	8,8*	13,2*	420	0	28	72
E7	E	EDTAtot	2	6,5	7,1	13,1	37,5	52,8	18,5	34,9	77	29,7	70,3	1,9	4,6	39,9	18,7	10,2	8,8	12,6				
E7	E	ACDtot	2	5,1	5,99	11,1	31,1	51,9	18,5	35,7	55	28,2	71,8	1,4	3,7	37,7	18,2	11,4	8,6	15,2				
E7	E	CITtot	2	5,6	6,46	11,6	33,6	52	18	34,5	64	27,7	72,3	1,6	4	39	18,5	9,7	8,2	10				
E7	E	PRPACD	2	0,7	0,03	0	0				98	97,8	2,2	0,7	0			8,5	8,4	9,4	88			
E7	E	PRPCIT	2	0,2	0,03	0	0				86							8,9	8,9	12,1	108			
E7	E	PRPACDcc	2	0,6	0,03	0	0				83	94,4	5,6	0,6	0			8,8	8,5	11,7				
E7	E	PRPCITcc	2	0,2	0,02	0	0				78							8,6	8,5	11,7				
E7	E	EDTAtot	4	5,9	7,41	13,6	38,5	52	18,4	35,3	89	31,9	68,1	1,9	4	39,2	18,6	8,7	7,9	5,8				
E7	E	ACDtot	4	5	6,24	11,3	32	51,3	18,1	35,3	51	30,3	69,7	1,5	3,5	37,1	17,9	9,2	7,9	8				
E7	E	CITtot	4	4,9	6,55	11,7	34,1	52,1	17,9	34,3	84	33,1	66,9	1,6	3,3	38,5	18,5	8,6	7,8	6,8				
E7	E	PRPACD	4	0,7	0,03	0	0				106	98	2	0,7	0			8,1	8,2	7,4	227	38	18	44
E7	E	PRPCIT	4	0,1	0,03	0	0				100							8,8	8,5	10,3	187	36	24	40
E7	E	PRPACDcc	4	0,6	0,03	0	0				95	96,9	3,1	0,6	0			9,5	8,8	13				
E7	E	PRPCITcc	4	0,1	0,03	0	0				91							9	8,8	13,3				
E7	E	PRPACDDC	2	8,1	0,12	0	0,1				206	97,7	2,3	7,9	0,2			11,8	10,1	25,3	119	11	29	60
E7	E	PRPCITDG	2	0,3	0,03	0	0				82*	79,4*	20,6*	0,2*	0,1*			10,5*	9,4*	19,6*	237	3	23	74
E7	E	PRPACDC	2	6,9	0,12	0	0,1				182	96	4	6,6	0,3			13,8	10,8	34	172	6	22	72
E7	E	PRPCITC	2	0,3	0,03	0	0				72							12,4	10,1	26,8	161	3	26	71
E7	E	PRPACDDC	4	0,6	0,06	0	0				109	97	3	0,6	0			11,4	10,2	24,1	151	3	19	78
E7	E	PRPCITDG	4	0,3	0,06	0	0				110	90,4*	9,6*	0,3*	0*			11,1	10,2	24	174	7	19	74
E7	E	PRPACDC	4	1	0,07	0	0				105	96,1	3,9	1	0			13,7	11	36,2	162	5	15	80
E7	E	PRPCITC	4	0,2	0,06	0	0				86							16,7	11,5	42,8	104	2	22	76

Legenda: Esp: espécie; T: tempo; EDTAtot: sangue total em EDTA; ACDtot: sangue total em ACD; CITtot: sangue total em Citrato; PRPACD: PRP em ACD; PRPCIT:PRP em Citrato; PRPACDcc: PRP fresco em ACD com criopreservante; PRPCITcc: PRP fresco em Citrato com criopreservante; PRPACDDG: PRP em ACD com DMSO e glicose; PRPCITDG: PRP em Citrato com DMSO e glicose; PRPACDC: PRP em ACD criopreservado controle; PRPCITC: PRP em Citrato criopreservado controle; WBC: Contagem de leucócitos; RBC: Contagem de eritrócitos; HGB: Concentração de hemoglobina; HCT: Hematócrito; MCV: Volume Corpuscular Médio; MCH: Hemoglobina Corpuscular Média; MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT: Contagem de plaquetas; LYM pc: % de linfócitos do total de leucócitos; OTHER pc: % de neutrófilos, monócitos e basófilos do total de WBC; RDWSD: Largura da curva de distribuição de eritrócitos, desvio padrão; RDWCV: Largura da curva de distribuição de eritrócitos, coeficiente de variação; PDW: Largura da curva de distribuição de plaquetas; MPV:Volume plaquetário médio; PLCR: Índice de macrotrombócitos; Neub: Contagem manual na câmara de Neubauer; Mrest: Morfologia no Formol Salina: Resting; Minc: Morfologia no Formol Salina: Incerta; Mativ: Morfologia no Formol Salina: Ativada