

Criopreservação do plasma rico em plaquetas de equinos

[*Equine platelet-rich plasma cryopreservation*]

P. Fantini¹, M.S. Palhares^{2*}, M. Prades³, V.C. Macedo⁴, J.M. Silva Filho²,
F.O.P. Leme², J.U. Carmona⁵

¹Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG

²Escola de Veterinária – UFMG – Belo Horizonte, MG

³Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha

⁴Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais – Hemominas, MG

⁵Universidad de Caldas, Colômbia

RESUMO

Avaliou-se o congelamento do plasma rico em plaquetas (PRP) de equinos, a -196°C em nitrogênio líquido, utilizando-se como crioprotetor o DMSO em duas concentrações (3% e 6%), e, como ponto final, a avaliação da morfologia e da agregometria plaquetária. Foram utilizadas 12 amostras de PRP em duas repetições. Previamente ao congelamento, as amostras foram submetidas a um resfriamento lento (-0,07°C/minuto) até a temperatura final de 4-5°C. A criopreservação do PRP equino, incluindo um resfriamento lento a 4-5°C, previamente ao congelamento a -197°C em nitrogênio líquido, foi similar para as concentrações do crioprotetor DMSO a 3% ou 6%, quando avaliado o percentual de ativação e de agregação plaquetária.

Palavras-chave: equino, plasma rico em plaquetas (PRP), criopreservação, DMSO

ABSTRACT

Equine platelet-rich plasma (PRP) frozen at -196°C in liquid nitrogen using DMSO as a cryoprotectant in two different concentrations (3% and 6%) was evaluated, using platelet morphology and aggregometry as the final parameters. Twelve PRP samples were used in two repetitions. The samples were submitted to slow cooling prior to frozen (-0.07°C/minute) until they reached the temperature of 4-5°C. Platelet cryopreserved in 3% or 6% DMSO, presented similar efficacy when the percentage of activation and platelet aggregation was evaluated.

Keywords: Equine, platelet-rich plasma (PRP), cryopreservation, DMSO

INTRODUÇÃO

O armazenamento do plasma rico em plaquetas (PRP), incluindo a manutenção da viabilidade plaquetária e, assim, do seu efeito terapêutico, tem sido uma alternativa para a ampliação dessa terapia regenerativa. Há que se enfatizar que o tratamento envolve várias aplicações, tendo ainda como barreira a necessidade do preparo da amostra a cada aplicação. Desse modo, a utilização do PRP criopreservado poderia ser uma grande alternativa, por eliminar a necessidade de transporte do animal até os

centros de referência, visando à realização da terapia.

Na medicina veterinária, o PRP vem sendo utilizado em casos de desmíte e osteoartrite (Carmona *et al.*, 2009), no tratamento de lesões cutâneas (Carter *et al.*, 2003; López e Carmona, 2014), em tendinopatias e desmíte de suspensório (Argüelles *et al.*, 2008), fraturas em cães (Silva *et al.*, 2007), fraturas e lesões musculares (Carmona e López, 2011), úlcera de córnea (Merlini *et al.*, 2014; Teixeira, 2014) e laminite em equinos (Carmona *et al.*, 2012), com resultados satisfatórios e promissores.

Recebido em 23 de outubro de 2014

Aceito em 17 de agosto de 2015

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: maristelapalhares@gmail.com

A perda da viabilidade e a da função plaquetária resultam de períodos prolongados de resfriamento (Connor *et al.*, 1996) ou congelamento (Handin e Valeri, 1972). As plaquetas armazenadas sob tais condições diminuem a capacidade de agregação, em resposta ao estresse hipotônico, à retração do coágulo e à sua sobrevida (Handin e Valeri, 1972; Connor *et al.*, 1996), passando da forma discoide para a esférica e emissão de pseudópodes. Reid *et al.* (1999) demonstraram que danos na membrana plaquetária, durante a estocagem, estão diretamente relacionados à perda de função.

Durante o resfriamento, as membranas passam do estado líquido para o estado de gel, resultando em menor capacidade de reorganização e, conseqüentemente, perda da integridade (Reid *et al.*, 1999). As células desidratam e aumentam a sua densidade durante o congelamento. Por outro lado, durante o processo de re-hidratação, ao descongelamento, essas membranas se tornam transitoriamente permeáveis, permitindo a liberação de substâncias contidas em seu interior, quando ocorre a lise osmótica das plaquetas (Crowe *et al.*, 1998).

A criopreservação de concentrados plaquetários vem sendo estudada, utilizando-se como crioprotetor o dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% ou 6% e armazenamento a -80°C ou -150°C (Handin e Valeri, 1972). O DMSO tem sido considerado o melhor crioprotetor de plaquetas de seres humanos (Slichter *et al.*, 2014). A adição do DMSO a 5% manteve a integridade da membrana no transcorrer do congelamento (Reid *et al.*, 1999). Crowley *et al.* (1974) avaliaram a forma e a estrutura de plaquetas após o congelamento, submetidas ao DMSO a 6% e observaram que um percentual de 60% das plaquetas manteve sua forma discoide característica, à microscopia eletrônica. Segundo Daly *et al.* (1979), o concentrado de plaquetas pode ser armazenado por mais de três anos, na presença do DMSO a 5% como crioprotetor e congelamento em vapor de nitrogênio líquido (-150°C), sem perda da função hemostática. Tem-se demonstrado que a utilização de plaquetas criopreservadas em DMSO é segura e bem tolerada em pacientes que receberam múltiplas transfusões, por não estar associada ao aumento do risco clínico quando comparada à transfusão

de plaquetas pelo método padrão (Slichter *et al.*, 2014).

Recentemente, em estudo de criopreservação do PRP de equinos, não foram observadas diferenças quanto ao número total, ao volume e à ativação das plaquetas, avaliadas em microscopia óptica, entre amostras frescas e congeladas a -80°C, utilizando-se o DMSO a 6%, durante 14 dias (Kwirant, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar o congelamento do PRP de equinos, submetido a duas concentrações de DMSO (3% ou 6%), em nitrogênio líquido a -196°C, tendo como ponto final a avaliação da morfologia e da agregometria plaquetária.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFMG, sob o protocolo nº 294/2013.

Foram utilizados 12 equinos, sem raça definida, clinicamente saudáveis, sendo sete fêmeas e cinco machos, na faixa etária de dois a 16 anos, utilizando-se duas repetições por animal. A temperatura ambiente média, nos dias de coleta, foi de 28,35°C (mínima de 22,5°C e máxima de 34,5°C).

A coleta de sangue foi realizada por venopunção da jugular, utilizando-se um tubo a vácuo contendo EDTA, para realização de hemograma, e três tubos contendo citrato sódico (CS) como anticoagulante, com capacidade de 4,5mL. O sangue em CS foi homogeneizado por inversão e posteriormente centrifugado a 133g durante oito minutos, acompanhado por dois minutos de frenagem. Aspirou-se 1,0mL da fração do PRP, 4mm acima da capa leucocitária, de cada tubo contendo CS, fazendo-se um *pool* da amostra de cada animal, com auxílio de uma seringa de 10mL e catéter 14G, o qual foi transferido para microtubos previamente autoclavados e identificados.

Uma alíquota sem DMSO foi separada para avaliação no tempo zero (à temperatura ambiente). Nas demais alíquotas, acrescentaram-se concentrações de 3% (30µL) ou 6% (60µL) de DMSO. As amostras foram submetidas a um resfriamento lento até 4-5°C, a uma taxa média

de resfriamento de $-0,07^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, em repouso, em um contêiner hermeticamente fechado, com capacidade de isolamento da temperatura ambiente, desenvolvido para o transporte de sêmen equino (Palhares, 1997), e avaliadas após seis horas de estocagem, ao atingirem a temperatura alvo ($5,05 \pm 0,39^{\circ}\text{C}$). As amostras resfriadas foram retiradas do contêiner, passadas as seis horas, e foram avaliadas, à temperatura ambiente, sem aquecimento prévio. As alíquotas a serem congeladas foram retiradas do contêiner e, dentro do mesmo microtubo, submetidas ao pré-congelamento em vapor de nitrogênio durante 20 minutos, a 4cm acima da superfície do nitrogênio, sendo a seguir submersas nele, a -197°C . As amostras congeladas foram avaliadas entre 15 e 30 dias após o congelamento, quando se utilizou um descongelamento em água a 37°C , durante 90 segundos, de acordo com pré-experimento realizado pela equipe. Imediatamente antes de cada análise, as amostras eram homogeneizadas por inversão do tubo. As amostras de PRP a fresco, resfriadas e congeladas, foram avaliadas quanto à composição celular, morfometria e agregometria.

A contagem e a mensuração do volume das plaquetas bem como a contagem de hemácias e de leucócitos foram realizadas em contador hematológico (Abacus Jr., Diatron Group, Hungria). As plaquetas foram, também, contadas em câmara de Neubauer, de acordo com o protocolo estabelecido para a utilização do líquido de Hess-Ecker. Para tanto, as amostras foram diluídas a 1:200 no líquido de Hess-Ecker e homogeneizadas durante 20 minutos. Após o preenchimento da câmara de Neubauer, com auxílio de tubo capilar para micro-hematócrito, esta foi mantida em repouso, em placa de Petri, com algodão umedecido, durante 30 a 40 minutos. A contagem de plaquetas foi realizada nos 25 campos centrais da placa, nos dois retículos da câmara, sendo o valor obtido multiplicado por 1000.

De cada amostra do PRP foram produzidas duas extensões, coradas pela técnica de Romanowski (Panótico, Laborclin, Brasil), para posterior avaliação morfométrica das plaquetas. O percentual de ativação plaquetária foi avaliado por microscopia óptica, adaptado da classificação

proposta por Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990) para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão. As plaquetas foram classificadas em três estados morfológicos: 0- plaquetas normais (plaquetas alongadas); 1- estado de ativação brando ou incerto (plaquetas arredondadas); 2- plaquetas ativadas (plaquetas emitindo pseudópodes). Todas as contagens manuais foram realizadas pelo mesmo técnico.

A avaliação da função plaquetária foi realizada em dosagem única para cada repetição, por meio da agregometria, na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais - Hemominas, realizada por método turbidimétrico utilizando-se o agregômetro (PACKS-4 - Platelet Aggregation Chromogenic Kinetic System). Para esse propósito, as amostras de PRP foram acondicionadas em cubetas de plástico siliconizadas, contendo um magneto para a homogeneização. Como agente agregante, utilizou-se adenosina difosfato (Chrono-Log Corporation, Bio Top Medical, Reino Unido), na concentração final de $1000\mu\text{M}$, na proporção de $50\mu\text{L}$ de ADP para $450\mu\text{L}$ da amostra. Como parâmetro de agregação, foi utilizada a agregação máxima durante o período de 600 segundos, após o início da ativação plaquetária com o agente agregante. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi utilizado como o branco do sistema, sendo obtido após centrifugação do PRP a 1500g, durante 15 minutos.

Os dados foram submetidos a um esquema fatorial 2×3 , compreendendo duas concentrações de DMSO (3% ou 6%) e três momentos de avaliação, no transcorrer do processo de congelamento, incluindo o PRP a fresco, após o resfriamento e após o descongelamento, utilizando-se 12 animais e duas repetições por animal. As variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis apresentaram distribuição não paramétrica, mesmo após a transformação ($\log x + 1$ ou arcoseno \sqrt{x}), e foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis (três ou mais comparações) ou pelo teste de Wilcoxon (comparação de duas médias). As análises foram realizadas pelo programa *Statiscal Analyses System* (SAS, Version 9.0. Cary, Statistical Analysis System Institute), considerando-se a significância de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados do hemograma, em todas as análises, encontraram-se dentro dos parâmetros de normalidade descritos para equinos.

Nas análises realizadas em contador automático, por impedância, a concentração plaquetária média do sangue total, coletado em EDTA, foi de $154,96 \pm 6,57 \times 10^3 \text{PLT}/\mu\text{L}$, diferindo ($P < 0,05$) da contagem de plaquetas do PRP resfriado a 3% ou a 6%. Entretanto, as amostras de PRP fresco ($174,04 \pm 6,76 \times 10^3 \text{PLT}/\mu\text{L}$) e congelado, tanto a 3% quanto a 6% de DMSO, apresentaram maior concentração de plaquetas ($P < 0,05$)

comparadas ao valor do PRP resfriado a 3% ou a 6% (Tab. 1).

Valores superiores para as contagens plaquetárias avaliadas em câmara de Neubauer foram encontrados em todas as amostras, independentemente da concentração de DMSO utilizada. A maior concentração de plaquetas ($P < 0,05$) foi observada nas amostras a fresco, em relação às resfriadas ou congeladas (Tab.1), independentemente do percentual de DMSO. Além disso, a contagem plaquetária do PRP resfriado, submetido a 6% de DMSO, foi menor ($P < 0,05$) quando comparada aos tratamentos avaliados.

Tabela 1. Número de plaquetas (média \pm erro-padrão) de acordo com o método de contagem, no sangue total, em EDTA e no plasma rico em plaquetas (PRP) fresco, após resfriamento e congelamento em DMSO a 3 e 6%

Forma da contagem plaquetária	Número de plaquetas ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)					
	Sangue Total	PRP	PRP Resfriado	PRP Resfriado	PRP Congelado	PRP Congelado
		Fresco	3%	6%	3%	6%
Câmara de Neubauer	-	272,0 \pm 11,69Aa	215,71 \pm 11,10Ab	138,38 \pm 10,55Ac	219,45 \pm 16,28Ab	192,29 \pm 13,75Ab
Contador automático*	154,96 \pm 6,57a	174,04 \pm 6,76Ba	121,21 \pm 11,17Bb	125,54 \pm 11,12Bb	169,27 \pm 10,09Ba	188,48 \pm 13,23Ba

Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si ($P < 0,05$). *Contador automático por impedância: Abacus Jr., Diatron Group, Hungria.

A avaliação morfológica em microscopia óptica permitiu a mensuração do percentual de ativação plaquetária. Observa-se, na Tab. 2, um menor percentual médio de ativação plaquetária nas amostras a fresco ($P < 0,05$), em relação às amostras tratadas com DMSO, excetuando-se a observada no tratamento PRP com 3% de DMSO e resfriada, com resultado similar.

Adicionalmente, quando se consideraram as plaquetas em estado de ativação incerta (plaquetas em estado de ativação reversível), observou-se um maior percentual, nas amostras resfriadas a 3%, cujos resultados diferiram ($P < 0,05$) dos observados no PRP fresco e nas amostras congeladas, independentemente do percentual de DMSO. Vale salientar, ainda, a similaridade ($P > 0,05$) entre os PRP resfriados, embora aquele resfriado com 6% de DMSO não tenha diferido ($P > 0,05$) de nenhuma das amostras avaliadas.

Tabela 2. Morfologia plaquetária no plasma rico em plaquetas (PRP) fresco, acrescido de DMSO 3% ou 6%, resfriado lentamente e congelado a -196°C , (média \pm erro-padrão)

Plaqueta ¹	PRP Fresco	PRP Resfriado (%)		PRP Congelado (%)	
		3% de DMSO	6% de DMSO	3% de DMSO	6% de DMSO
Inativada	23,83 \pm 1,58Ba	0,54 \pm 0,32Cb	0,5 \pm 0,24Cb	0,14 \pm 0,10Cb	0,00Bb
Incerta	56,0 \pm 2,14Ab	66,88 \pm 4,47Aa	60,63 \pm 3,27Aab	56,36 \pm 4,12Ab	46,0 \pm 5,97Ab
Ativada	20,17 \pm 2,8Bc	32,58 \pm 4,54Bbc	38,88 \pm 3,32Bab	43,5 \pm 4,17Ba	54,0 \pm 5,97Aa
Agrupamento					
Incerta + Inativada	79,83 \pm 2,80Aa	67,42 \pm 4,54Ab	61,13 \pm 3,32Ac	56,50 \pm 4,17Acd	46,00 \pm 5,9Ad
Ativada	20,17 \pm 2,80Bd	32,58 \pm 4,54Bc	38,88 \pm 3,32Bb	45,50 \pm 4,17Bab	54,0 \pm 5,97Aa

¹Plaqueta inativada, apresenta forma alongada ou discoide; plaqueta incerta, plaqueta em estado incerto de ativação, apresenta forma arredondada; plaqueta ativada, apresenta emissão de pseudópodes. Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si ($P < 0,05$).

Criopreservação do plasma...

A função plaquetária, avaliada pela capacidade de agregação máxima, alcançada dentro de um período de 600 segundos, foi superior ($P<0,05$) nas amostras a fresco, em relação a todas as

amostras avaliadas, que não diferiram entre si ($P>0,05$), excetuando-se o PRP resfriado com 3% de DMSO, cujos valores foram superiores ($P<0,05$) aos demais tratamentos (Tab. 3).

Tabela 3. Percentual máximo de agregação plaquetária, realizada na presença do ADP como agente agregante (média \pm erro-padrão)

	PRP Fresco	PRP Resfriado		PRP Congelado	
		3% de DMSO	6% de DMSO	3% de DMSO	6% de DMSO
Média	71,89 \pm 3,47a	40,63 \pm 4,0b	25,24 \pm 3,6c	23,73 \pm 2,49c	22,98 \pm 2,57c
Mediana	77,5	36,60	22,95	24,10	20,45
Mínimo	27,7	11,80	0	7,70	3,20
Máximo	92,7	90,90	73,60	60,50	47,70
CV	23,61	48,29	69,84	50,30	54,72

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($P<0,05$).

Na Tab. 4, estão apresentados os percentuais de redução da agregação máxima, considerando-se o PRP fresco como valor inicial (100%). Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os

tratamentos para essa variável, embora todos tenham diferido ($P<0,05$) dos valores do PRP fresco.

Tabela 4. Percentual de redução da agregação plaquetária máxima inicial, considerando-se o plasma rico em plaquetas (PRP) fresco como valor inicial, realizada na presença do ADP 10% como agente agregante

	Fresco	Resfriado		Congelado	
		DMSO 3%	DMSO 6%	DMSO 3%	DMSO 6%
Média	100,0a	56,50b	34,04b	35,10b	33,77b
Erro-padrão	0	4,57	5,08	4,48	4,38
Mediana	100,0	53,18	32,25	31,97	28,79
Mínimo	100,0	22,71	0	8,31	3,58
Máximo	100,0	99,32	125,60	103,24	97,15
CV	0	39,64	73,16	61,24	63,49

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

Na ausência da citometria de fluxo, verificou-se, no presente estudo, que a contagem plaquetária em câmara de Neubauer apresentou-se como um método confiável e de grande relação custo-benefício. Vale enfatizar, nesse momento, o elevado custo do citômetro de fluxo e a necessidade de constante padronização, que, associados, limitam o seu uso rotineiro e a aplicação comercial em procedimentos de baixo valor agregado. A técnica manual também foi escolhida por Vendruscolo *et al.* (2012), quando da avaliação de diferentes protocolos de obtenção do PRP descritos na literatura.

As plaquetas são contadas individualmente, quando da contagem manual. Por outro lado, os equipamentos automáticos podem identificar agregados de plaquetas como uma única

plaqueta, podendo subestimar os valores encontrados (Marx *et al.*, 1998). Além disso, vale salientar a maior contagem plaquetária observada em câmara de Neubauer nas amostras congeladas em relação às amostras resfriadas com 6% de DMSO. As amostras de PRP congeladas apresentaram maior concentração de plaquetas ($P<0,05$) quando comparadas às amostras resfriadas, na contagem pela técnica de impedância, e maior contagem de plaquetas ativadas ($P<0,05$), quando comparadas às amostras resfriadas com 3% de DMSO observadas na microscopia óptica. Entretanto, os achados não coincidiram entre as técnicas de contagem manual das plaquetas. Esse fato pode ser atribuído às limitações da contagem pelo método automatizado, já que o equipamento realiza a contagem por meio de um único parâmetro, que é o volume celular (Harrison *et al.*, 2000), diferentemente da citometria de fluxo

(Kunicka *et al.*, 2000). Possivelmente, essas plaquetas ativadas foram contadas pelo método automático de impedância por apresentarem maior volume. Segundo Böck *et al.* (1995), a criopreservação gera um aumento no volume plaquetário médio. Porém, tanto a diminuição quanto o aumento do volume plaquetário médio são sinais indicativos de lesão plaquetária. Primeiramente ocorre diminuição devido à fragmentação ou formação de micropartículas e posteriormente aumento, decorrente do aumento do volume celular.

Fragmentos de eritrócitos, micrócitos e complexos imunológicos podem ser erroneamente contados como plaquetas, excedendo o seu número real em casos de trombocitopenia. Segundo Nagata *et al.* (2010), os contadores automáticos levam a resultados não fidedignos, principalmente em casos de trombocitopenia. Em contrapartida, algumas macroplaquetas e plaquetas gigantes são discriminadas como eritrócitos devido ao aumento do volume (Harrison *et al.*, 2000; Briggs *et al.*, 2007).

A contagem manual de plaquetas apresentou algumas dificuldades, mesmo com o treinamento do leitor prévio ao início do experimento, sendo mais difícil para as amostras utilizando DMSO a 6%. A diferença de osmolalidade e a consequente perda de água para o meio podem ter respondido por uma redução do volume, responsável, possivelmente, pelo maior dano causado à membrana das plaquetas, uma vez que foram observadas plaquetas mais danificadas e menores, o que dificultou a contagem plaquetária. As amostras resfriadas utilizando DMSO a 6% apresentaram menor contagem ($P < 0,05$) plaquetária, em câmara de Neubauer, que as demais amostras. Além de requerer um protocolo demorado e pouco prático, essa contagem exigiu um longo treinamento na fase pré-experimental e, por sua subjetividade, apresentou elevado coeficiente de variação (CV: 21 - 37%), sobretudo nas amostras utilizando DMSO a 6%. Entretanto, essas características não tornam o procedimento manual insatisfatório, gerando apenas algumas discordâncias, que podem ser resolvidas na presença de profissionais experientes, quando da realização dos exames (Borges e Siqueira, 2009).

Há pouca informação a respeito da concentração ideal de plaquetas em valores absolutos no PRP. Segundo Marx *et al.* (1998), o PRP ideal deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas que o observado fisiologicamente. A concentração absoluta de plaquetas é extrapolada, geralmente, de trabalhos realizados em seres humanos, desconsiderando-se as variações interespecíficas no que se refere à fisiologia e a características das plaquetas. No protocolo utilizado para a obtenção do PRP, no presente estudo, utilizou-se uma única centrifugação do sangue a 133g, durante oito minutos, quando se obteve 1,75 vez o valor inicial de plaquetas no sangue total, considerando-se a técnica manual de contagem. Esses resultados corroboram os de Tamimi *et al.* (2007), que relataram um menor incremento de plaquetas, inferior a duas vezes o valor inicial, em protocolos de única centrifugação. Vendruscolo *et al.* (2012) compararam 10 diferentes protocolos descritos na literatura e também não alcançaram os valores indicados por Marx *et al.* (1998). Fontenot *et al.* (2012) estimaram que concentrações plaquetárias superiores a 250.000 PLT/ μ L, no PRP, seriam clinicamente relevantes. No presente estudo, observou-se um valor similar à sua estimativa, considerando-se a contagem manual em câmara de Neubauer (272.000 PLT/ μ L), corroborando ainda com Feldman *et al.* (2000), que relatam uma concentração de plaquetas no PRP de equinos variando entre 100.000 e 350.000 PLT/ μ L.

A avaliação morfológica das plaquetas requer um treinamento do avaliador, visando à identificação de mudanças no formato das plaquetas observadas, em razão de serem estruturas extremamente pequenas. A classificação das PLT utilizadas, adaptada de Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990), foi realizada considerando-se os seus eixos X e Y. Por essa metodologia, classificou-se como inativadas as que se apresentavam discoides ou fusiformes com importante diferença entre os tamanhos dos eixos; ativação incerta, quando havia aproximação entre os tamanhos dos eixos X e Y e mudança do formato para esférico; e ativadas, quando foram observadas emissões de pseudópodes (Fig. 1). A exposição das plaquetas a baixas temperaturas causa alteração da morfologia discoide para esférica e aparecimento de pseudópodes. As alterações estruturais que

ocorrem no citoesqueleto são principalmente causadas pela formação de microvesículas, mediada pela calpaina, uma protease dependente de cálcio que degrada proteínas da membrana plasmática como a actina, a qual corresponde a 15-20% do total das proteínas da membrana (Wiedmer *et al.*, 1990). A classificação utilizada permitiu inferir que percentual de plaquetas iniciou suas modificações em direção à ativação e aquelas cuja ativação é irreversível. Plaquetas em estado incerto de ativação possuem uma alteração reversível; assim, o percentual de plaquetas com ativação incerta é somado àquele de inativadas, pois essas ainda são capazes de liberar o conteúdo dos seus grânulos (Wurzinger e Schmid-Schönbein, 1990). Nas amostras resfriadas a 3% de DMSO, as PLT em estado incerto de ativação apresentaram diferença ($P < 0,05$) quando comparadas às dos demais grupos, exceto àquele resfriado com 6% de DMSO. Ambos os grupos apresentaram um percentual superior a 60% de PLT aptas a liberarem os fatores de crescimento de seus grânulos, o que não foi observado nas amostras congeladas, independentemente da concentração de DMSO. Porém, não há na literatura uma definição do percentual de ativação ideal para o

PRP a ser aplicado. Por outro lado, as amostras congeladas utilizando o DMSO a 6% não apresentaram nenhuma plaqueta em estado inativado. Possivelmente, ocorreu a destruição das plaquetas pela diferença de osmolalidade e pela ruptura da membrana no momento do descongelamento.

Optou-se pela utilização do citrato de sódio como anticoagulante, neste estudo, diante dos resultados de um estudo piloto de agregometria, quando não se observou agregação com o ACD (ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose). Também foram testados sem sucesso os agentes agregantes ATP, adrenalina e ristocetina. Os valores obtidos na agregação plaquetária foram maiores que os encontrados por Piccione *et al.* (2010), devido, provavelmente, à menor concentração final de ADP utilizado por esses autores (0,5 e 1 μ M). Além disso, os valores percentuais obtidos por esses autores para a agregação máxima foram de 39,17 \pm 9,32 e 56,02 \pm 7,96, com uma e seis horas, respectivamente, à temperatura ambiente, e de 47,76 \pm 6,56 e 48,6 \pm 8,35, às seis e 24 horas, respectivamente, quando do resfriamento a 8°C, utilizando ADP na concentração final de 1,0 μ M.



Figura 1. Esfregaço de PRP, corado em panótico e avaliado em microscopia óptica, em aumento de 1000x. Observar plaqueta inativada, com forma alongada ou discoide (setas brancas curvas); plaqueta em estado incerto de ativação, com forma arredondada (setas brancas); plaqueta ativada, com presença de pseudópodes (setas pretas). (Técnica adaptada de Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990), para a microscopia óptica).

O protocolo proposto para o congelamento, utilizando-se previamente o resfriamento lento à taxa de $-0,07^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, com o propósito de minimizar a desorganização da camada fosfolipídica, durante o choque pelo frio, permitiu a manutenção na porcentagem da diminuição da agregação máxima entre os tratamentos. A diminuição no percentual de agregação plaquetária foi de aproximadamente 40%, não diferindo entre os tratamentos ($P < 0,05$). Apesar de Slichter *et al.* (2014) terem demonstrado que as plaquetas criopreservadas em DMSO podem prevenir eventos hemorrágicos em pacientes trombocitopênicos, há necessidade da realização de estudos para a avaliação da eficácia do PRP criopreservado nas terapias regenerativas em equinos.

CONCLUSÃO

A criopreservação do PRP equino, incluindo um resfriado lento a $4-5^{\circ}\text{C}$, previamente ao congelamento a -197°C em nitrogênio líquido, foi similar para as concentrações do crioprotetor DMSO a 3% ou 6%, quando avaliado o percentual de ativação e de agregação plaquetária.

AGRADECIMENTOS

À Capes, pela concessão de bolsa para estudo no exterior, e ao Instituto de Terapia Regenerativa de Tecidos da Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha; à Fapemig e ao CNPq, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.U.; CLIMENT, F. *et al.* Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in Five horses. *Vet. Rec.*, v.162, p.208-211, 2008.
- BRIGGS, C.; HARRISON, P.; MAC, H. Continuing development with the automated platelet count. *Int. J. Lab. Hem.*, v.29, p.77-91, 2007.
- BÖCK, M.; SCHLEUNING, M.; HEIM, M.U. *et al.* Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function. *Transfusion*, v.35, p.921-924, 1995.
- BORGES, L.F.; SIQUEIRA, L.O. Validação da tecnologia 5 diff do analisador hematológico Symex SX-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.31, p.247-251, 2009.
- CARMONA, J.U.; LOPES, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropátias em caballos. *Arch. Med. Vet.*, v.41, p.175-179, 2009.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *J. Equine Vet. Sci.*, v.31, p.506-510, 2011.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I.J. Autologous platelet concentrates as na adjunctive treatment for chronic laminitis in a maré with pituitary pars intermédia dysfunction. *J. Equine Vet. Sci.*, v.33, p.191-195, 2012.
- CARTER, C.A.; JOLLY, D.G.; WORDEN, C.E. *et al.* Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.*, v.74, p.244-255, 2003.
- CONNOR, J.; CURRIE, L.M.; ALLAN, H. *et al.* Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4°C and treated with second-messenger effectors. *Transfusion*, v.36, p.691-698, 1996.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; OLIVER, A.E. *et al.* The role of vitrification in anhydrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, v.60, p.73-103, 1998.
- CROWLEY, J.P.; RENE, A.; VALERI, R. Changes in platelet shape and structure after freeze preservation. *Blood*, v.44, p.599-603, 1974.
- DALY, P.A.; SCHIFFER, C.A.; AISNER, J. *et al.* Successful transfusion of platelets cryopreserved for more than 3 years. *Blood*, v.54, p.1023-1027, 1979.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p
- FONTENOT, R.L.; SINK, C.A.; WERE, S.R. *et al.* Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Can. Vet. J.*, v.53, p.1266-1272, 2012.

- HANDIN, R.I.; VALERI, C.R. Improved viability of previously frozen platelets. *Blood*, v.40, p.509-513, 1972.
- HARRISON, P.; HORTON, A.; GRANT, D. *et al.* Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br. J. Haematol.*, v.108, p.228-235, 2000.
- KUNICKA, J.E.; FISCHER, G.; MURPHY, J. *et al.* Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.114, p.283-289, 2000.
- KWIRANT, L.A.A. *Criopreservação do plasma rico em plaquetas (PRP) de equinos*. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- LÓPEZ, C.; CARMONA, J.U. Platelet-rich plasma as an adjunctive therapy for the management of a severe chronic distal limb wound in a foal. *J. Equine Vet. Sci.*, v.34, p.1128-1133, 2014.
- 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.
- MERLINI, N.B.; FONZAR, J.F.; PERCHES, C.S. *et al.* Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.1742-1750, 2014.
- NAGATA, M.J.H.; MESSORA, M.R.; FURLANETO, F.A.C. *et al.* Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: na experimental study in rabbits. *Eur. J. Dent.*, v.4, p.395-402, 2010.
- 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. 1997. 246f. Tese (Doutorado em Reprodução) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- PICCIONE, G.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C. *et al.* Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse, *J. Equine Vet. Sci.*, v.30, p.371-375, 2010.
- REID, T.J.; VICENT, F.L.; ESTEBAN, G. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. *Cryobiology*, v.38, p.209-224, 1999.
- SILVA, S.B.; FERRIGNO, C.R.A.; STERMAN, F.A. *et al.* Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. *Ciênc. Rural*, v.37, p.1045-1051, 2007.
- SLICHTER, S.J.; JPNES, M.; RANSOM, J. *et al.* Review of In Vivo Studies of Dimethyl Sulfoxide Cryopreserved Platelets. *Transfus. Med. Rev.*, v.28, p.212-225, 2014.
- STATISCAL Analyses System – SAS. Version 9.0. Cary: SAS Institute, 2004.
- TAMIMI, F.M.; MONTALVO, S.; TRESGUERRES, I. *et al.* A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.65, p.1084-1093, 2007.
- TEIXEIRA, K. Uso de plasma rico em plaquetas no tratamento de ulcerações corneanas superficiais em equinos. 2014. 71f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- 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. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.32, p.106-110, 2012.
- WIEDMER, T.; SHATTIL, S.J.; CUNNINGHAM, M. *et al.* Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. *Biochemistry*, v.29, p.623-632, 1990.
- 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.