

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE
PLAQUETAS DE CÃO SOB REFRIGERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO EM
DMSO 6%**

Diego Felipe Sánchez Arcila

**Belo Horizonte, MG
Escola de Veterinária - UFMG
2017**

Diego Felipe Sánchez Arcila

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE
PLAQUETAS DE CÃO SOB REFRIGERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO EM
DMSO 6%**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleuza Maria de Faria Rezende

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiola de Oliveira Paes Leme

**Belo Horizonte, MG
Escola de Veterinária - UFMG
2017**

S211a Sánchez Arcila, Diego Felipe, 1988-
Avaliação morfológica do concentrado autólogo de plaquetas em cães sob refrigeração e criopreservação em DMSO 6% / Diego Felipe Sánchez Arcila. – 2017.
48 p. : il.

Orientadora: Cleuza Maria de Faria Rezende
Coorientadora: Fabiola de Oliveira Paes Leme
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Teses. 2. Plaquetas (Sangue) – Teses. 3. Criopreservação – Teses.
4. Refrigeração – Teses. I. Rezende, Cleuza Maria de Faria. II. Leme, Fabiola de Oliveira Paes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

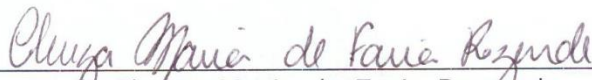
CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

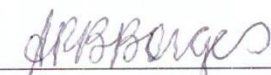
DIEGO FELIPE SÁNCHEZ ARCILA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 31 de Março de 2017, pela banca constituída pelos membros:



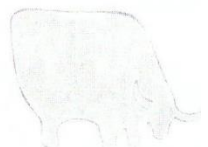
Prof^a. Cleuza Maria de Faria Rezende
Presidente - Orientador



Prof^a. Andréa Pacheco Batista Borges
Universidade Federal de Viçosa - UFV



Prof^a. Maristela Silveira Palhares
Escola de Veterinária - UFMG



AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Clara, por ser a pessoa que me incentiva e me apoia a cada dia para ser uma melhor pessoa e um melhor profissional, e me mostra que é possível alcançar o sucesso sem desistir por causa das dificuldades que possam surgir. Agradeço por todo seu esforço, sua paciência e por estar ao meu lado sempre que precisei.

Ao meu irmão, Milo, pelos conselhos, atos e palavras de apoio ao longo da minha vida, suficientes para tomar as melhores decisões e encaminhar o melhor possível minha vida. Agradeço também pelas múltiplas ajudas nas análises dos resultados, importantes para o desenvolvimento e finalização desta dissertação.

A Andre, por ter sempre as palavras perfeitas nos momentos de caos e desespero.

Aos meus avôs, Julia por seu carinho incondicional e José, que com seu apoio e conselho contribuiu na minha formação pessoal e acadêmica, sempre o recordarei.

À Profa. Cleuza, pela oportunidade que me deu de ser parte da sua equipe de trabalho, pelos múltiplos ensinamentos, por compartilhar todo seu conhecimento permitindo ampliar minhas perspectivas neste mundo da ortopedia e por promover o desejo de continuar em frente e ser um profissional melhor cada dia.

À Profa. Fabíola Paes Leme pela coorientação no projeto e sua contribuição nas correções.

À Profa. Maristela Silveira Palhares pela participação na minha banca de defesa e pelas correções.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, através do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação- PEC-PG, pelo governo brasileiro, agradeço a concessão da bolsa de estudos que possibilitou a execução desta dissertação e me permitiu estar nesta linda universidade.

À Bela, pela amizade, pelo amor, pela paciência, por ser a melhor companhia possível e por dar-me força, apoio e carinho nos momentos que mais precisei.

Agradeço também aos meus colegas e amigos Esteban e Santiago pela contribuição com seu trabalho para o desenvolvimento deste estudo.

Aos professores Benito Soto Blanco e Marilia Martins Melo pelo empréstimo dos equipamentos, dos materiais e do espaço do Laboratório de Toxicologia que permitiram a realização deste experimento.

Aos pacientes que doaram seu sangue, base fundamental para realizar este estudo e aos proprietários que me permitiram trabalhar com seus animais de estimação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. LITERATURA CONSULTADA	11
2.1 Fisiologia plaquetária: morfologia, funções e conceitos	11
2.2 Concentrados plaquetários (CAP e PRP).....	14
2.3 Processamento e obtenção dos concentrados plaquetários.....	15
2.4 Refrigeração de plaquetas.....	17
2.5 Criopreservação de plaquetas.....	17
2.6 Métodos de avaliação da qualidade plaquetária	20
2.7 Alterações plaquetárias por armazenamento	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Animais e delineamento experimental.....	23
4.2. Coleta de sangue.	24
4.3 Processamento a análise das amostras.	24
4.4 Refrigeração do concentrado plaquetário	24
4.5 Criopreservação do concentrado plaquetário.....	24
4.6 Análise e avaliação morfológica após refrigeração e congelamento.....	25
4.7 Análises estatísticas.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Contagem plaquetária.....	26
5.2 Recuperação plaquetária.	30
5.3 Volume plaquetário médio (MPV).....	31
5.4 Amplitude de distribuição plaquetária (PDW).....	33
5.5 Morfologia plaquetária.	35
5.6 Ativação plaquetária.	41
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores médios e intervalo interquartil das variáveis hematológicas nas amostras de sangue total, CAP fresco e refrigeradas/criopreservadas em cães.....	28
Tabela 2-	Valores médios e intervalo interquartil dos parâmetros morfológicos avaliados em microscopia óptica do conteúdo plaquetário do CAP fresco, refrigerado e criopreservado com DMSO 6% em cães.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Comparação da contagem média plaquetária ($\text{cel.}10^3/\mu\text{L}$) entre o sangue total (ST), o CAP fresco e o CAP conservado em cães.....	27
Figura 2-	Concentração plaquetária no CAP em cães antes e após a refrigeração e congelamento.....	29
Figura 3-	Porcentagem de recuperação plaquetária nos grupos R7, C7, C30 após refrigeração e congelamento do CAP em cães.....	30
Figura 4-	Valores do MPV no sangue total (ST), CAP fresco e o CAP refrigerado/congelado em cães: comparação entre as diferentes faixas etárias.....	32
Figura 5-	Valores do PDW no sangue total, CAP fresco e CAP refrigerado/congelado em cães: comparação entre as diferentes faixas etárias.....	34
Figura 6-	Esfregaço de CAP congelado por 30 dias.....	36
Figura 7-	Esfregaço de CAP congelado por 7 dias.	36
Figura 8-	Esfregaço de CAP fresco.....	37
Figura 9-	Esfregaço de CAP fresco.....	37
Figura 10-	Esfregaço de CAP refrigerado por 30 dias.....	38
Figura 11-	Esfregaço de CAP congelado por 30 dias.....	39
Figura 12-	Esfregaço de CAP congelado por 30 dias.....	40
Figura 13-	Porcentagem de ativação no CAP fresco e nos grupos R7, C7, C30.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD: ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose.
ADP: adenosina difosfato.
CAP: concentrado autólogo de plaquetas.
DMSO: dimetil sulfóxido.
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.
GF: fatores de crescimento.
G: gauge.
g: gauss.
GP: glicoproteína.
HES: hidroxietil amidos.
IGF: fator de crescimento semelhante a insulina.
mL: mililitro.
nm: nanômetro.
MPV: volume plaquetário médio.
PDAF: fator angiogênico derivado de plaquetas.
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas.
PDW: amplitude de distribuição plaquetária.
PLT: plaquetas.
PRP: plasma rico em plaquetas.
ST: sangue total.
TGF- β : fator de crescimento transformador beta.
VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as características morfológicas do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) no cão, após refrigeração e congelamento. Foram empregados 31 cães (20 fêmeas e 11 machos), de diferentes raças e idades, que se apresentaram no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para tratamento ortopédico com indicação de terapia celular. Foram coletados nove mL de sangue da veia jugular, dos quais sete foram depositados em tubos de 8,5 mL contendo ACD-A como anticoagulante para a obtenção do CAP e, dois mL em um tubo com EDTA para a contagem de plaquetas, determinação do volume plaquetário médio (MPV) e da amplitude de distribuição plaquetária (PDW). O sangue foi centrifugado a 191g durante seis minutos (única centrifugação) para a obtenção do CAP. Na amostra fresca foram avaliadas a contagem plaquetária, o MPV, o PDW e morfologia celular. A avaliação morfológica foi realizada a partir da contagem de 200 plaquetas sob microscopia óptica que foram classificadas quanto à sua forma em inativas (forma discóide), incertas (perda da forma discóide sem presença de pseudópodes) e ativadas (com emissão de pseudópodes). Quatro amostras de cada animal foram encaminhadas para conservação, sendo uma refrigerada a 4°C por sete dias, outra por 30 dias e mais duas armazenadas em freezer a -80°C no mesmo intervalo de tempo, utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) 6% como crioprotetor. Após este período, as amostras foram descongeladas em banho Maria a 37°C, e como as refrigeradas, foram submetidas às mesmas análises laboratoriais da amostra fresca. Verificou-se diferença entre as amostras fresca e conservadas quanto à contagem plaquetária, a concentração celular, ao MPV e ao PDW ($P < 0,05$), exceto no grupo refrigerado por 30 dias, que mostrou alterações morfológicas graves. No grupo congelado por sete dias, não se observou diferença quanto à porcentagem de ativação ($P > 0,05$). Os resultados obtidos levam a concluir que a criopreservação com DMSO 6% a -80°C por sete dias é uma opção favorável para a manutenção das concentrações plaquetárias e das características morfológicas do CAP em cães.

Palavras-Chave: cão, concentrado autólogo de plaquetas, , refrigeração, criopreservação, morfologia, ativação.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the morphological characteristics of autologous platelet concentrate (APC) in the dog, after refrigeration and freezing. Thirty-one dogs (20 females and 11 males) of different races and ages were submitted to the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) for orthopedic treatment with indication of cellular therapy. 9 mL of jugular vein blood were collected, seven mL were deposited in 8.5 mL tubes containing ACD-A as anticoagulant to obtain APC and two mL in one tube with EDTA for platelet count, mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDW). The blood was centrifuged at 191 g for 6 minutes (single centrifugation) to obtain APC. In the fresh sample, the platelet count, MPV, PDW and cell morphology were evaluated. The morphological evaluation was performed by counting 200 platelets under optical microscopy that were classified as inactive (discoid form), uncertain (loss of discoid shape without pseudopodia) and activated (with pseudopod emission). Four samples of each animal were sent for storage, one refrigerated at 4 ° C for seven days, one for 30 days and two stored in a freezer at -80 ° C in the same time interval using 6% dimethyl sulfoxide (DMSO) as cryoprotectant. After this period, the samples were thawed in a 37°C water bath and, as the refrigerated ones, were subjected to the same laboratory analysis as the fresh sample. There was a difference between fresh and preserved samples for platelet count, cell concentration, MPV and PDW ($P < 0.05$), except in the group refrigerated for 30 days, which showed severe morphological alterations. In the frozen group for seven days, no difference was observed in the percentage of activation ($P > 0.05$). The results obtained lead to the conclusion that cryopreservation with 6% DMSO at -80 ° C for seven days is a favorable option for the maintenance of platelet concentrations and the morphological characteristics of APC in dogs.

Keywords: canine, autologous platelet concentrate, refrigeration, cryopreservation, morphology, activation.

1. INTRODUÇÃO

As plaquetas foram descritas pela primeira vez graças às observações do patologista italiano Bizzozero no final do século XIX. Sua identificação por meio da microscopia óptica, não foi unicamente como corpúsculos dentro do corpo humano, senão também como parte importante na formação de trombos em áreas danificadas das paredes dos vasos (Harrison, 2005). Estas células têm sido amplamente usadas como fonte de fatores de crescimento (GF), que além de serem estruturas relevantes nos processos inflamatórios, imunológicos e de coagulação, têm um papel importante na reparação de tecidos lesionados (Blair e Flaumenhaft, 2009).

Pesquisas são constantemente realizadas buscando novos métodos para promover a cicatrização e o retorno à função normal dos tecidos após alguma lesão ou patologia degenerativa (Mei-Dan e Carmont, 2012). O desenvolvimento de métodos alternativos de terapia celular, como o concentrado plaquetário é uma opção de tratamento atrativa que favorece a reparação do tecido, aprimora o processo de recuperação após lesão em tecidos duros (mineralizados) ou moles, como também na cirurgia plástica ou cosmética em seres humanos (Harrison, 2005).

Embora de preparação mais simples e mais rápida que a terapia com células tronco, a preparação dos concentrados plaquetários, geralmente realizada no momento da aplicação (Schoenfeld *et al.*, 2006), exige disponibilidade do proprietário e do técnico. Isto pode ser um transtorno para aqueles que não podem esperar ou não querem internar seu animal de estimação. Outro fator a considerar é o maior tempo de envolvimento da equipe. A possibilidade de se manter o concentrado plaquetário na forma de banco de células poderia reduzir custos e tempo de preparo, o que tem levado a proposição de diferentes métodos de conservação. Graças à versatilidade e biocompatibilidade desta terapia, o estímulo para o estudo e uso terapêutico e científico continua em constante desenvolvimento (Anitua *et al.*, 2007).

A refrigeração e criopreservação plaquetária, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, tem sido investigada como um meio de armazenamento a longo prazo e de disponibilidade imediata dos produtos plaquetários (fatores de coagulação e de crescimento) para transfusão e tratamento de diferentes lesões, com função e viabilidade aceitáveis (Appleman *et al.*, 2009). Portanto, o objetivo deste experimento foi avaliar dois métodos para a conservação de plaquetas caninas, em diferentes períodos de tempo, analisando suas características, comparando-a com as plaquetas caninas frescas e verificar se o método de conservação resulta em um produto válido para terapia de regeneração celular.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Fisiologia plaquetária: morfologia, funções e conceitos

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados com forma discóide de aproximadamente 1-3 µm de diâmetro, provenientes de megacariócitos multinucleados localizados na medula óssea (Blair e Flaumenhaft, 2009; Boswell *et al.*, 2012). Estão rodeadas por uma membrana plasmática bilamelar composta por fosfolípidos que se estendem através dos vários canais da superfície ligados ao sistema canalicular e permitem o aumento da área superficial destas células. Através desta bicamada lipídica, glicoproteínas intrínsecas como a

glicoproteína (GP) IaIIa, GP Ib, GP IIbIIIa e GP IV são expostas e atuam como receptores plaquetários para a ativação e agentes inibidores (Blockmans *et al.*, 1995).

O citoesqueleto plaquetário está composto principalmente por filamentos de actina que constitui 15-20% do total de proteínas contidas na plaqueta. Esta membrana estabiliza a camada lipídica e regula a forma da membrana plasmática. Logo abaixo da membrana plaquetária se apresenta uma camada microtubular composta de tubulina, envolvida na manutenção da forma discóide das plaquetas inativas (Blockmans *et al.*, 1995).

As plaquetas circulantes que permanecem inativas, apresentam uma forma discóide com um sistema canalicular aberto. Estas células podem ser ativadas por substâncias endógenas ou exógenas, cujo processo é facilitado pelos filamentos de actina e miosina, sofrendo reestruturação do citoesqueleto (Boswell *et al.*, 2012).

Durante a ativação, as plaquetas tornam-se relativamente esféricas e apresentam pseudópodes pontiagudos como projeções volumosas na superfície a partir dos canalículos, incremento da superfície da membrana plasmática e rearranjo das organelas no centro da célula para posterior liberação do conteúdo dos grânulos (Würzinger *et al.*, 1980; Würzinger e Schmid-Schönbein, 1990). Durante este processo secretor, as membranas dos grânulos fundem-se com as da superfície de contato do sistema canalicular, com posterior difusão de proteínas da membrana granular interna como a P-selectina (Blockmans *et al.*, 1995; Boswell *et al.*, 2012).

A ativação plaquetária ocorre para ampliar a resposta inflamatória nas lesões existentes e assim, promover uma recuperação mais rápida e eficaz dos tecidos (Zandim *et al.* 2012).

As plaquetas possuem diferentes funções e estão envolvidas em vários processos incluindo hemostasia, retração do coágulo, contração e reparação dos vasos, inflamação, defesa do hospedeiro e inclusive crescimento e metástase tumoral (Harrison, 2005).

Estas células contêm múltiplos grânulos secretores, que são críticos para o funcionamento normal das plaquetas. Dentre os três tipos de grânulos plaquetários secretores -grânulos alfa, grânulos densos e lisosomais, os alfa são os mais abundantes (Blair e Flaumenhaft, 2009). Existem aproximadamente 50-80 grânulos alfa por plaqueta, que variam em tamanho de 200 a 500 nm. Compreendem 10% do volume da plaqueta numa proporção 10 vezes maior que os grânulos densos. O conteúdo dos grânulos alfa inclui proteínas de ligação de membrana que são expressas na superfície plaquetária e as proteínas solúveis que são liberadas no espaço extracelular (Blair e Flaumenhaft, 2009).

As plaquetas têm um papel fundamental na hemostasia e são fonte natural de fatores de crescimento (GF) que se encontram armazenados nos grânulos alfa. Dentre eles destacam-se aqueles derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator angiogênico derivado de plaquetas (PDAF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Wang e Avila, 2007). A liberação desses fatores é desencadeada pela ativação das plaquetas que pode ser feita por diferentes substâncias fisiológicas (trombina, tromboxano, colágeno, ADP, serotonina, epinefrina) e farmacológicas (sais de cálcio) que exercem seu efeito através da interação com receptores localizados na membrana plaquetária (Blockmans *et al.*, 1995).

A secreção ativa dos GF se inicia nos primeiros 10 minutos após a ativação plaquetária e mais de 95% dos GF pré-sintetizados são secretados durante a primeira hora. Portanto, é recomendado que o CAP seja usado no enxerto, retalho ou ferida imediatamente após a sua preparação. As plaquetas sintetizam e secretam GF adicionais pelos sete dias restantes do seu ciclo de vida.

Posteriormente, os macrófagos que chegam na região, estimulados pelas plaquetas, assumem a função de regulação da cicatrização da ferida pela secreção de diferentes GF (Marx, 2004).

Várias pesquisas têm direcionado seus esforços na busca por índices hematológicos que avaliem a ativação plaquetária, uma vez que este processo provoca alterações morfológicas nas células. Parâmetros como o volume plaquetário médio (MPV) e a amplitude de distribuição plaquetária (PDW) são obtidos na rotina laboratorial utilizando-se contadores de células sanguíneas (Vagdatli *et al.*, 2010).

A literatura consultada apresenta divergências quanto a influência do sexo e da idade nos parâmetros plaquetários em pacientes humanos saudáveis. Conceitos e limitações semelhantes se apresentam nos estudos de pacientes caninos, abordando unicamente parâmetros como a contagem plaquetária e o MPV (Schneider e Mischke, 2016).

Dentre as características morfológicas, o MPV tem sido o índice de ativação mais extensamente estudado. Ele representa o tamanho da plaqueta e é considerado um marcador da função e da ativação plaquetária (Vagdatli *et al.*, 2010). O mecanismo responsável pelo aumento do MPV ainda não está completamente entendido. Tem sido sugerido que este incremento ocorre quando há mudança da forma da plaqueta, por efeito de algumas citocinas ou por resposta a certos agonistas como ADP ou colágeno (Jagroop *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002).

O incremento no tamanho plaquetário durante processos de resfriamento/congelamento é considerado como um indicador de lesões plaquetárias por armazenamento. Devido ao uso de aparelhos hematológicos para a medição do tamanho, um aumento no MPV pode ser causado por leitura de microagregados plaquetários, por aumento no volume celular, por alteração da forma discóide para esférica, pela extensão de pseudópodes ou pela presença de plaquetas com uma vida útil mais longa. Vários fatores podem, portanto, influenciar a contagem celular. Este incremento do MPV e a perda irreversível da forma discóide podem ser induzidos também pelo armazenamento prolongado sob refrigeração (4°C) ou congelamento (Guillaumin *et al.*, 2008). O resfriamento das plaquetas abaixo de 22°C induz ao aumento das concentrações de cálcio intracelular o que provavelmente contribui para a ativação das plaquetas (Park *et al.*, 2002).

O tamanho da plaqueta é considerado um dos marcadores determinantes da função destas células. Plaquetas grandes são potencialmente mais reativas e agregáveis, contêm mais grânulos densos e são metabólicamente e enzimaticamente mais ativas que as plaquetas pequenas. Estas expressam maiores concentrações de substâncias como tromboxanos (TXA₂), serotonina, betatromboglobulina (β -TG) e proteínas de superfície como P-selectina e glicoproteína III (Vagdatli *et al.*, 2010; Wiwanitkit, 2004; Johnson *et al.*, 2016)

Outros indicadores importantes para a avaliação quantitativa da variação do tamanho médio da população plaquetária e de seu volume, é o PDW (Carmona, 2006). A obtenção de um valor dentro dos parâmetros normais indica que as plaquetas, em sua maioria, são do mesmo tamanho. Quando estas células apresentam diferenças nas suas dimensões (anisocitose), devido ao aumento do número e tamanho dos pseudópodes, possivelmente o valor do PDW será afetado (Wiwanitkit, 2004, Miranda 2011). Os animais jovens têm tendência a apresentar aumento da liberação de plaquetas mediada por adrenalina, especialmente do baço, o que propicia alterações nas variáveis plaquetárias (Kley, 2001). O PDW parece ser um indicador mais específico de ativação de plaquetas que o MPV, uma vez que não aumenta durante uma simples distensão celular causada pelo aumento do volume das plaquetas. A avaliação de ambas variáveis (MPV e PDW) e o

aumento simultâneo dos seus valores podem predizer o processo de ativação mais eficientemente (Vagdatli *et al.*, 2010).

Ahnadi *et al.* (2003) e Landesberg *et al.* (2000) avaliaram a forma e as mudanças estruturais das plaquetas no sangue coletado com o anticoagulante EDTA, e observaram células fragmentadas, maior ativação e menor conteúdo de grânulos no interior das plaquetas, evidenciando mudanças no MPV e no PDW.

2.2. Concentrados plaquetários (CAP e PRP)

O conceito de terapia derivada das plaquetas surgiu no final da década de 1970 e início dos anos 80, quando foram descobertos vários GF que estão contidos nos grânulos alfa plaquetários (Textor, 2011).

Os concentrados plaquetários são utilizados para acelerar o processo de recuperação funcional dos tecidos. Foi preconizado para introduzir uma alta concentração de GF e outras moléculas biologicamente ativas nos tecidos danificados, na tentativa de otimizar o ambiente cicatricial e funcional da lesão (Anitua *et al.*, 2007; Arnoczky *et al.*, 2011). Este se caracteriza por conter elevada concentração de plaquetas que, quando ativadas, liberam GF, favorecendo a cicatrização por sua ação quimiotática, neovascular e mitogênica (Everts *et al.*, 2006). Seu uso para a modulação da cura óssea e do tecido mole tem gerado interesse no campo da cirurgia e no cuidado avançado de feridas (Smith e Roukis, 2009).

Concentrados plaquetários referem-se estritamente a uma fonte autógena de plaquetas de fácil aquisição e de baixo custo, com um número de plaquetas em uma concentração significativamente maior do que o sangue total. Se as plaquetas não são significativamente concentradas, o produto final não pode ser considerado como PRP (Textor, 2011). Há pouca informação a respeito da concentração ideal de plaquetas em valores absolutos no PRP. Segundo Marx *et al.* (1998) e Marx (2004), o concentrado ideal em seres humanos deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas que o observado fisiologicamente e um milhão ou mais de plaquetas por microlitro de plasma. Considera-se também na veterinária o termo “concentrado de plaquetas” como plasma com suspensões de plaquetas (viáveis) entre aproximadamente 400 a 600 mil plaquetas por microlitro (Silva *et al.*, 2011; Silva, 2012)

O concentrado de plaquetas é preparado a partir do sangue periférico que após coletado é submetido a centrifugação para se obter uma amostra com uma concentração alta de plaquetas. Estas plaquetas posteriormente sofrem um processo de degranulação para liberar GF com propriedades terapêuticas (Zhu *et al.*, 2013). O plasma contém citocinas, trombina, quimiocinas e outros GF e proteínas que estimulam a quimiotaxia, a proliferação celular, maturação, produção de moléculas de modulação inflamatória e atração de leucócitos (Roffi *et al.*, 2014).

O papel fisiológico das plaquetas no processo natural de cura tem estimulado a pesquisa deste tipo de concentrado como alternativa de tratamento para diversas alterações musculoesqueléticas (Smyth *et al.*, 2013). Ele propicia a neovascularização em tecidos com perfusão diminuída, proliferação e deposição de matriz extracelular. Os efeitos pró-regenerativos favorecem o processo de cicatrização em qualquer tipo de ferimento (Anitua *et al.*, 2007; Boswell *et al.*, 2012).

O primeiro uso clínico do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) e a padronização da técnica de preparo para uso como terapia na reconstrução óssea em odontologia humana, nas fases iniciais da consolidação, foram reportados por Marx *et al.* em 1998. No estudo, usou-se o preparado

plaquetário como suplemento a um enxerto de osso esponjoso na reconstrução de defeitos mandibulares amplos em humanos. O grupo tratado mostrou melhora significativa nas avaliações radiográficas e histológicas em relação à densidade óssea, em comparação com os enxertos realizados sem o concentrado de plaquetas (Marx *et al.*, 1998).

Embora a utilização do CAP para favorecer a formação óssea e cartilaginosa continue controversa, ele tem sido amplamente utilizado em procedimentos humanos e veterinários. Alguns estudos mostraram que o CAP pode ser usado para o tratamento de lesões musculoesqueléticas, como tendinites e desmites, assim como no tratamento de osteoartrite em cavalos (Argüelles *et al.*, 2006; Carmona, 2006), como terapia coadjuvante no tratamento das osteoartrose adquirida, osteocondrite dissecante da cabeça do úmero e como tratamento pós-cirúrgico da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães (Silva *et al.*, 2013).

A concentração ideal de cada componente celular no CAP continua sendo desconhecida. É difícil saber qual método de preparação é o mais indicado para cada caso. A evolução da tecnologia para se obter um concentrado plaquetário adequado para uso na medicina regenerativa depende do aprimoramento no entendimento da biologia plaquetária, leucocitária e no papel que estas células desempenham nos efeitos clínicos atribuídos para este tipo de terapias (Boswell *et al.*, 2012)

Quando o protocolo de tratamento envolve várias aplicações locais para se obter o efeito desejado, o CAP deve ser preparado no momento de cada aplicação, o que demanda tempo e equipamentos disponíveis. Uma alternativa seria armazenar o CAP para futuras aplicações (Schoenfeld *et al.*, 2006; Silva, 2012). Na medicina humana, os concentrados de plaquetas são armazenados nos bancos de sangue à temperatura ambiente, com agitação contínua, por no máximo 3-7 dias, devido à baixa viabilidade das plaquetas e ao risco de contaminação bacteriana pelas limitações de armazenamento de plaquetas sob condições dos bancos de sangue padrão (Devine e Serrano, 2010).

2.3. Processamento e obtenção dos concentrados plaquetários

A facilidade de preparação, a biossegurança e os custos reduzidos, têm estimulado a pesquisa e o interesse da comunidade científica por este tipo de terapia (Anitua *et al.*, 2007). No entanto, mesmo com o aumento na demanda para seu uso, ainda não se tem um método padrão de obtenção do mesmo. Existem diferentes estudos e proposições de novas técnicas para produção de concentrados plaquetários, porém não há um consenso sobre o método de preparo mais eficaz (Klein *et al.*, 2011). Diversos protocolos foram propostos com o objetivo de concentrar um maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma (Marx, 2004; Carmona, 2006; Vendramin *et al.*, 2009).

Como a capacidade regenerativa deste tipo de preparações depende da quantidade de GF liberados pelas plaquetas, a viabilidade destas células vai determinar a qualidade do mesmo. A eficácia depende principalmente do cuidado no preparo e da prevenção da ativação precoce e consequente liberação dos GF. Quando as plaquetas são ativadas durante o processo de preparo, os GF são liberados para o plasma e a maior parte deles será descartada durante a preparação do concentrado diminuindo a eficiência do tratamento. (Lei *et al.*, 2009).

Uma das vantagens potenciais das preparações ricas em plaquetas é que elas são facilmente obtidas a partir do sangue total após um processo de centrifugação simples (Anitua *et al.*, 2007).

Três métodos diferentes têm sido descritos na medicina veterinária para a obtenção dos concentrados de plaquetas: o método do tubo (manual) com centrifugação única (Argüelles *et al.*,

2006; Silva *et al.*, 2011) ou com centrifugação dupla (Argüelles *et al.*, 2006), o método semi-automatizado (Textor, 2011) e o método de obtenção de plasma por aférese (automatizado) (Marx *et al.*, 1998). A obtenção pelo método manual é uma técnica simples e de baixo custo que não requer alta tecnologia para sua execução (Carmona, 2006).

O método do tubo utilizado comumente na medicina veterinária, baseia-se geralmente naqueles utilizados na medicina humana. Consiste na coleta de sangue autólogo em tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante, seguido de centrifugação e ativação das plaquetas (Argüelles *et al.*, 2006). No processamento pode-se realizar uma ou duas centrifugações do sangue total. Após a primeira centrifugação tem-se três camadas distintas. A camada superior corresponde ao plasma que contém as plaquetas, uma camada visível de leucócitos, conhecida como a camada flogística localizada adjacente ao plasma e outra camada, que corresponde aos eritrócitos. Este é um método confiável para se obter concentração plaquetária e potencial de níveis terapêuticos dos GF (Carmona, 2006).

Silva *et al.* (2011), utilizando ACD-A como anticoagulante, relataram um método efetivo para concentrar plaquetas caninas centrifugadas a uma velocidade de 191 g por 6 minutos e concluíram que a concentração obtida foi suficiente para produzir efeitos biológicos.

A ação dos leucócitos presentes nos concentrados de plaquetas continua controversa. Embora seja preconizada a diminuição deste grupo celular no concentrado de plaquetas, devido aos supostos efeitos deletérios das proteases e espécies reativas de oxigênio dos quais são reservatórios, e à resposta inflamatória que produz em alguns tecidos, como a superfície articular, também são considerados como fonte de citocinas e enzimas que podem ser importantes para a prevenção de infecções e melhor cicatrização de lesões dérmicas (Boswell *et al.*, 2012; Filardo *et al.*, 2012). Os macrófagos são células essenciais para o desbridamento do tecido ligamentar danificado e para liberação de citocinas que auxiliam no processo de reparação tecidual (Boswell *et al.*, 2012).

Têm sido realizadas pesquisas para avaliar os efeitos da velocidade e do tempo da centrifugação para se determinar a ativação plaquetária. Melhores resultados são obtidos em amostras centrifugadas a baixa velocidade (100g). Contudo, o risco de contaminação por hemácias e leucócitos na centrifugação é ligeiramente superior a 100g. O aumento da velocidade de centrifugação resulta em aumento significativo da concentração de plaquetas e diminuição da contaminação com outras células sanguíneas e redução do MPV e PDW. Processos de centrifugação entre 100-250 g levam à expressão do marcador de ativação plaquetária P-selectina a ser significativamente menor nos CAP (11%-15%) do que nas amostras de plasma, independentemente do anticoagulante utilizado (Söderström *et al.*, 2016).

A utilização da aceleração e frenagem adequada durante o processo de preparação evitará a ação abrupta da força de centrifugação sobre as células, minimizando a ativação e o dano plaquetário (Andrade *et al.*, 2008).

Vários tipos de anticoagulantes são usados para preparar o CAP. Lei *et al.* (2009) estudaram as alterações na morfologia e a extensão da ativação espontânea das plaquetas com diferentes anticoagulantes. Neste estudo, quando comparados com heparina e citrato, os anticoagulantes compostos de ACD (Ácido Cítrico, citrato de sódio e dextrose) e CTAD (solução tamponada de citrato, teofilina, adenosina e dipiridamo) mantiveram a integridade plaquetária por mais tempo, reduziram a ativação espontânea, aumentaram a quantidade de GF liberados e, conseqüentemente, melhoraram a eficácia das plaquetas na estimulação da proliferação celular, sendo considerados como os anticoagulantes mais apropriados para a produção do concentrado plaquetário.

2.4. Refrigeração de plaquetas

O armazenamento de plaquetas a temperatura de 22°C sob agitação constante por cinco dias é considerado como um método adequado para conservar concentrados plaquetários e manter suas propriedades funcionais. Entretanto, a busca por melhores condições de armazenamento culminou no estudo da refrigeração a 4°C que inibe o crescimento bacteriano, reduz as taxas metabólicas deletérias para plaquetas armazenadas a temperatura ambiente e facilita o transporte (Beaujean, 2000; Montgomery *et al.*, 2013, Johnson *et al.*, 2016). A adição de produtos que propiciem a proteção da membrana, das proteínas plaquetárias e que reduzam a ativação induzida pelo frio, possibilita a conservação das plaquetas até nove dias com resultados satisfatórios (Beaujean, 2000), muito embora os relatos de Reid *et al.* (1999) mostrem diminuição gradual da integridade da membrana com perda total da estrutura aos sete dias.

Tem sido sugerido que a baixa temperatura modifica as plaquetas. Demonstrou-se que a exposição a temperaturas frias provoca diminuição do repouso celular, alterações na forma e aumento da ativação plaquetária. O frio induz aumento na concentração do cálcio intracelular contribuindo para a ativação das plaquetas humanas (Tablin *et al.*, 2001). Laufer *et al.* (1979) reportaram que o resfriamento de plaquetas entre 0-4°C resultou no aumento do tamanho plaquetário e que o aquecimento a 37 °C, restaurou seu tamanho inicial dentro de duas horas posteriores. Foi proposto que esta alteração de tamanho seria devido a uma reorientação do feixe marginal dos microtúbulos (Park *et al.*, 2002). As plaquetas armazenadas no frio por mais de 24 horas também sofrem fusão e secreção de seus grânulos densos, lisossômicos e alfa, processo que imita a ativação fisiológica, pelo que se considera que têm um efeito clínico mínimo (Tablin *et al.*, 2001).

Embora alterações da forma das plaquetas se tornem evidentes apenas à temperaturas abaixo de 15°C, análises bioquímicas específicas mostram que as alterações do citoesqueleto e o aumento da resposta aos mediadores de ativação são detectáveis quando a temperatura reduz abaixo dos 37°C (Hoffmeister *et al.*, 2003, Johnson *et al.*, 2016).

Uma cadeia de eventos leva à ativação plaquetária a baixas temperaturas, iniciando-se com a passagem dos lipídeos da membrana plaquetária através de uma transição de fase fosfolipídica, entre 10 e 20°C, tornando esta estrutura permeável (Stoll e Wolkers, 2011). Esta transição fosfolipídica é observada nos principais componentes da membrana, o sistema tubular denso (um análogo do retículo sarcoplasmático do músculo, que serve como um depósito de Ca²⁺ delimitado pela membrana) e a membrana plasmática. A passagem por esta transição está correlacionada com as mudanças de forma durante a refrigeração ou congelamento, que são completamente reversíveis até cerca de 24 horas. Após este tempo, tornam-se irreversíveis e as plaquetas tornam-se fisiologicamente ativadas (Tablin *et al.*, 2001).

Kattlove *et al.* (1972) descreveram como desvantajoso para transfusão, o uso de plaquetas armazenadas a temperaturas inferiores a 6°C pois apresentam curto tempo de sobrevivência *in vivo*. Entretanto, seu emprego é justificado em pacientes com sangramento ativo, devido à preservação da função em relação às plaquetas armazenadas à temperatura ambiente.

2.5. Criopreservação de plaquetas

A criopreservação tem sido adotada como um método válido para o armazenamento de plaquetas a longo prazo e disponibilidade imediata para diferentes aplicações (Appleman *et al.*, 2009). Tem sido considerado um método que permite a manutenção das qualidades do CAP durante o tempo necessário para o tratamento. O armazenamento a longo prazo por congelamento permite

umentar o tempo de vida dos concentrados plaquetários dos atuais cinco dias até dois ou três anos (Valeri *et al.*, 2003).

O objetivo básico dos métodos de criopreservação é minimizar as lesões e destruição das células durante o processo de congelamento-descongelamento. A criolesão poderia resultar na desidratação celular extensa e/ou cristalização intracelular da água (dano mecânico). Para que a criopreservação seja efetiva é necessário o uso de um agente crioprotetor que penetre rapidamente na membrana da plaqueta e diminua o gradiente osmótico entre o espaço intra e extracelular (Balint *et al.*, 2002; Landi *et al.*, 2004).

As plaquetas são consideradas como elementos que respondem favoravelmente ao processo de congelamento-descongelamento desde que sejam adicionados à amostra crioprotetores adequados e utilizadas temperaturas pertinentes para realizar a criopreservação (Balint *et al.*, 2002). Elas são fragmentos celulares, com pequenos compartimentos intracelulares, o que sugere que os requerimentos para a estabilização por este procedimento sejam menos rigorosos do que seriam com células nucleadas (Tablin *et al.*, 2001).

A criopreservação dos concentrados plaquetários é uma tarefa trabalhosa e onerosa que requer vários passos para adicionar e, em certos casos, remover o crioprotetor. Além disso, alguns autores consideram que o manejo requerido no processo está associado com a ativação e perda da função plaquetária. Estas razões parecem contribuir para as limitações do uso generalizado da técnica (Landi *et al.*, 2004)

A influência do crioprotetor, da sua concentração e do método de congelamento na redução da quantidade e qualidade das plaquetas criopreservadas tem sido reportada em diversos estudos, porém o procedimento de criopreservação ideal ainda não foi definido (Balint, *et al.*, 2002). Enquanto uma metodologia padrão não for estabelecida, o dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotetor parece ser o mais recomendado e eficaz para a realização dos processos de criopreservação de plaquetas (Bock, 1995).

No estudo realizado por Taylor (1981) foram utilizados dois agentes crioprotetores intracelulares, DMSO e glicerol, e dois extracelulares, hidroxietilamido (HES) e dextran. As plaquetas foram avaliadas de acordo com a recuperação pós-descongelamento, segundo a resposta ao choque hipotônico e à captação de serotonina, parâmetros úteis para se estabelecer condições ótimas de armazenamento. O resultado mostrou que o HES e o dextran não são bons agentes crioprotetores para o armazenamento a longo prazo. As plaquetas criopreservadas em glicerol demonstraram baixo rendimento e pobre viabilidade *in vitro* quando comparadas com as criopreservadas em DMSO 5%, com congelamento de 1°C/min a -80°C e descongelamento em banho Maria a 37°C. O autor concluiu que destes, o DMSO é o crioprotetor mais adequado para uso em processos de congelamento. Embora muitas plaquetas possam ser perdidas durante todo o processo de lavagem do produto, ele atua sobre a permeabilidade da membrana plasmática das células.

De modo geral, as técnicas empregadas na criopreservação dos concentrados de plaquetas utilizam DMSO na proporção final de 5% ou 6%, congelamento não programado e estocagem em freezer mecânico a -80°C com taxas de congelamento lentas (1°C/min), temperatura conhecida por ser suficientemente baixa para inibir a formação de cristais de gelo dentro da célula (Valeri *et al.*, 1986; McLellan e Day, 1995). Nesta concentração o crioprotetor não é tóxico para as células, embora as plaquetas inevitavelmente mostrem comprometimento das funções *in vitro* e encurtamento da sobrevida em comparação com as plaquetas frescas (Landi *et al.*, 2004;

Appleman *et al.*, 2009). Durante o congelamento e graças ao DMSO, as plaquetas congeladas apresentam menos ativação após armazenamento, assim como uma expressão aumentada de P-selectina após estimulação com agentes ativadores, como trombina (Reid *et al.*, 1999).

Os agentes crioprotetores, como o DMSO, atuam sobre a permeabilidade da membrana plasmática das células, diminuem a energia de ativação necessária para o transporte de água durante o processo de congelamento e atuam também na solidificação do líquido sem formação de cristais de gelo no interior das células processo conhecido como *vitrificação* (Hunt, 2011; Stoll e Wolkers, 2011). Quando uma solução é levada a temperaturas abaixo do ponto de congelamento, produz-se um aumento na concentração dos solutos intracelulares, como a água, o que leva à posterior formação de gelo. O DMSO limita o aumento destes solutos, substituindo-os na parte intra e extracelular, diminuindo a formação de gelo e formando um sistema característico com propriedades de um sólido e estrutura molecular de um líquido (Hunt, 2011; McLellan e Day, 1995).

Uma abordagem alternativa tem sido chamada “vitrificação sem equilíbrio”. Isto depende da utilização de taxas de resfriamento extremamente elevadas, baseada na imersão direta em nitrogênio líquido, em associação com concentrações mais baixas de crioprotetor para evitar a nucleação do gelo. No entanto, isto produz um estado pouco estável que pode levar à desvitrificação e cristalização do gelo no aquecimento. Apesar do risco de dano celular, esta abordagem tem sido aplicada com sucesso em diferentes células e tecidos, incluindo embriões, sangue do cordão umbilical e células-tronco mesenquimais derivadas do âmnio (Hunt, 2011).

As alterações na morfologia plaquetária durante o armazenamento em DMSO se inicia no momento da adição do agente crioprotetor à suspensão, antes do congelamento. As células são expostas a um ambiente hiperosmótico e reduzem de volume por causa do efeito osmótico da água intracelular e aumentam novamente quando o DMSO permeia e a água entra na célula. Nos casos onde o processo de remoção do crioprotetor é realizado, a célula intumescida pelo DMSO intracelular se vê exposta a uma solução relativamente hipo-osmótica e novamente reduz de tamanho. Estas mudanças no gradiente osmótico podem causar danos celulares irreversíveis (Gao *et al.*, 1999).

Os estudos também sugerem que o DMSO impede a lise e a formação de agregados devido à inibição da ativação espontânea e subsequentemente agregação plaquetária (Cetin *et al.*, 2001).

Têm sido criados métodos alternativos para diminuir a quantidade do DMSO utilizada para criopreservação. O uso de soluções de armazenamento como o ThromboSol, uma mistura de amilorida, adenosina, nitroprussiato de sódio associado ao DMSO, permite o emprego deste último a uma concentração de 2%, mantendo as características para a inibição da ativação plaquetária prematura e melhora da função celular, porém sem melhora significativa na sobrevivência das plaquetas caninas quando comparado com o método padrão de DMSO a 6% (Landi *et al.*, 2004; Appleman *et al.*, 2009).

Apesar dos procedimentos de criopreservação disponíveis, ainda existem dificuldades a serem solucionadas em relação ao procedimento de congelamento. Ainda não foi determinada a melhor velocidade de esfriamento durante o processo de conservação. Alguns autores sugerem que a velocidade ótima de resfriamento durante o congelamento é de 1°C/min., embora para outros seja de 2-3°C/min. (Balint, 2002). Este resfriamento lento é necessário para permitir a saída suficiente de água, minimizando a possibilidade de formação intracelular de gelo, o que resulta muito

provavelmente quando utilizadas altas taxas de resfriamento (10°C/min). (McLellan e Day, 1995; FAO, 2012). Recomenda-se também, o uso de taxas de congelamento controlado, o que permite manter a qualidade e quantidade das plaquetas recuperadas (Balint, 2002).

Pequenas quantidades de partículas intracelulares de gelo podem permanecer no final do processo de congelamento, o que exige cuidado durante a fase de aquecimento. Taxas de aquecimento lento permitem cristalização da água dentro e fora da plaqueta provocando lesões celulares, enquanto uma taxa de aquecimento rápido, permite o degelo sem causar alterações na plaqueta (McLellan e Day, 1995).

A recuperação *in vitro* de plaquetas é definida como a porcentagem de plaquetas que sobrevivem após a conservação (Appleman *et al.*, 2009), podendo ser determinada pela fórmula descrita por Valeri *et al.* (1986): Recuperação plaquetária *in vitro* (%) = número total de plaquetas do concentrado refrigerado ou descongelado / número total plaquetário do concentrado pre-refrigerado ou pré-congelado. A literatura na medicina humana e veterinária reporta uma recuperação do 60 a 70%, onde os valores obtidos dependem da temperatura utilizada, duração do armazenamento e procedimento de coleta do sangue (Guillaumin *et al.*, 2008).

Porcentagens satisfatórias de recuperação plaquetária podem ser obtidos após tempos prolongados de congelamento. Valeri *et al.* (1986) mostraram que as plaquetas caninas armazenadas em congeladores mecânicos a -80°C por períodos de dois anos ou mais, apresentam valores de recuperação pós-congelamento semelhantes aos valores das plaquetas congeladas a -80°C por menos de dois anos, muito embora tenha sido observada deterioração celular. De forma similar, Shepherd *et al.* (1984) obtiveram resultados promissores na recuperação celular após três meses de armazenamento do CAP a -196°C, onde a média para as plaquetas recuperadas foi do 88% (77-96%), indicando que o processo de congelamento foi um método adequado para se obter uma recuperação plaquetária satisfatória.

2.6 Métodos de avaliação da qualidade plaquetária

A qualidade das plaquetas pode ser avaliada por suas características morfológicas, metabólicas, bioquímicas e pelas respostas de ativação e agregação.

A morfologia das plaquetas frescas e congeladas é avaliada classificando-as como plaquetas esféricas com formação de pseudópodes (ativadas), discóides (inativadas) ou incertas (plaquetas que perderam a forma discóide e não tem uma forma claramente definida). Estas avaliações devem ser feitas por um único patologista certificado (Appleman *et al.*, 2009) em microscopia óptica, microscopia de contraste de fase e em microscopia eletrônica do CAP (Landi *et al.*, 2004).

A avaliação metabólica é feita a partir da aferição do estado ácido/base – eletrolítico do meio plasmático. No procedimento bioquímico considera-se comumente a aferição do pH, a concentração de glicose e lactato, o conteúdo de difosfato de adenosina (ADP) e a desidrogenase láctica extracelular (LDH). Todas estas análises são realizadas num analisador bioquímico automatizado (Landi *et al.*, 2004; Appleman *et al.*, 2009).

A avaliação da ativação das plaquetas é realizada pela análise da expressão da P-selectina, uma molécula de adesão contida nos grânulos alfa, que em resposta a um estímulo inflamatório ou agente trombótico leva a sua translocação para a superfície celular, tornando-a um indicativo

adequado para avaliar a ativação plaquetária. Esta análise é feita por meio de citometria de fluxo (Ritchie *et al.*, 2000).

O estudo da agregação plaquetária se inicia através do emprego de diferentes agonistas, como o colágeno, a trombina, o ADP, a convulsina, a Y-trombina (Appleman *et al.*, 2009) ou os sais de cálcio, como cloreto e o gluconato, sendo posteriormente avaliada no agregômetro (Blockmans *et al.*, 1995).

2.7. Alterações plaquetárias por armazenamento

As lesões plaquetárias por armazenamento são descritas como a soma das alterações deletérias que conduzem a danos progressivos na estrutura e função das plaquetas que surgem no intervalo entre a coleta do sangue e o tempo em que as plaquetas são transferidas para um receptor (Guillaumin *et al.*, 2008; Shrivastava, 2009).

Estas lesões são influenciadas por fatores como o tempo e a temperatura de armazenamento. Perda da viabilidade plaquetária é uma consequência do congelamento ou prolongados períodos de armazenamento a 4°C (Reid *et al.*, 1999). Plaquetas conservadas em temperaturas inferiores a 4°C apresentam alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais conhecidas como “lesões por armazenamento a frio” (Gao *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 2013).

A exposição a estas temperaturas provoca diminuição do estado de inativação celular, alterações na forma e aumento da ativação e agregação plaquetária (Laufer *et al.*, 1979; Xiao *et al.*, 2000; Reddoch *et al.*, 2014). Nas amostras congeladas, as alterações dependem também do tipo de crioprotetor utilizado, da velocidade de descongelamento e da realização ou não de lavagem para remoção do crioprotetor (Guillaumin *et al.*, 2008; Ohto e Nollet, 2011).

O processo de criopreservação dos concentrados de plaquetas tem sido considerado como um procedimento que afeta a função plaquetária e seu tempo de vida, modifica o padrão de liberação dos GF, favorece o acúmulo de citocinas pirogênicas e incrementa o risco de proliferação bacteriana (Roffi *et al.*, 2014). Dois eventos irreversíveis contribuem para o desenvolvimento destas lesões, a reorganização da ultraestrutura no citoesqueleto plaquetário e as alterações da membrana plasmática (Reid *et al.*, 1999).

As plaquetas são extremamente sensíveis ao frio e quando mantidas a temperaturas inferiores a 20°C, estas células mudam rapidamente da forma discóide normal para uma forma esférica com múltiplos pseudópodes (Tablin *et al.*, 2001). O resfriamento por si só não leva ao surgimento de mudanças associadas com a ativação plaquetária ou com alterações morfológicas (Hoffmeister *et al.*, 2003). As mudanças na forma são decorrentes do aumento na rede de filamentos de actina (G-actina e F-actina) e despolimerização do anel microtubular que sustenta a membrana (Montgomery *et al.*, 2013). O aumento do cálcio intracelular leva à associação da miosina com os filamentos de actina durante o processo de ativação, permitindo a contração e centralização das organelas e a formação de pseudópodes (Würzinger *et al.*, 1980).

As membranas são as primeiras estruturas a evidenciar as lesões plaquetárias após o processo de resfriamento ou criopreservação, que levará posteriormente à ativação destas células. A transição de fase da membrana, também conhecida como “mudança de fase do lipídio”, induzida pelo resfriamento/congelamento, leva ao aumento na permeabilidade e posterior separação lateral de fase dos componentes da membrana da plaqueta. Pode ocorrer exposição da camada lipídica interna sobre a membrana exterior, reconhecida pelos macrófagos como sinal para iniciar o

processo de remoção das plaquetas (Tablin *et al.*, 2001; Balint *et al.*, 2002). Segue-se uma mudança na forma da plaqueta, ocorre aumento do cálcio citosólico e agrupação de microdomínios de membrana (*rafts*) específicos de fosfolipídeos, colesterol e proteínas, os quais são formados na membrana plasmática atuando como plataformas de sinalização, que leva à distribuição anormal dos receptores de membrana, alterações na transdução do sinal e por fim, ao estímulo da ativação plaquetária, imitando aquela induzida por trombina (Tablin *et al.*, 2001; Balint *et al.*, 2002; Stoll e Wolkers, 2011).

No estudo do Balint *et al.* (2002), após um processo de criopreservação controlado com DMSO 6%, as plaquetas com morfologia discóide, apresentavam uma configuração ultraestrutural inalterada, mantendo intactos os microtúbulos e o sistema canalicular aberto com mínimo dano da membrana. As plaquetas esféricas, mostraram densidade citoplasmática menor, com mudança da sua estrutura interior em comparação com outras formas, manifestado por uma localização marginal dos grânulos e outras organelas citoplasmáticas.

Os distúrbios metabólicos desempenham um papel importante na perda da viabilidade das plaquetas com relação às lesões celulares por armazenamento. As alterações associadas podem ser causadas por processos bioquímicos ligados à necrose, como dano mitocondrial, expansão do plasma e membranas das organelas, falha metabólica, lise e liberação de LDH. A morte celular por necrose e apoptose ou processos multifatoriais, podem contribuir na apresentação destas lesões (Ohto e Nollet, 2011).

Temperaturas baixas (<4°C) e ultrabaixas (até -196°C) comumente levam à diminuição do número de plaquetas. As células que sobrevivem a estas temperaturas mostram marcada deterioração morfológica, com perda das propriedades ultraestruturais, mudança nos receptores de GP (Ib, IIb/IIIa), suprarregulação dos marcadores plaquetários (P-selectina, anexina V), mudança na fluidez da membrana, resposta alterada aos agentes ativadores, redução da habilidade de agregação e nas etapas finais da conservação, agregação espontânea. Em transfusões estas plaquetas serão menos efetivas do que as plaquetas frescas e poderiam ativar a coagulação *in vivo*, devendo ser utilizadas unicamente quando as plaquetas frescas não estão disponíveis (Kattlove *et al.*, 1972; Beaujean, 2000; Balint *et al.*, 2002; Montgomery *et al.*, 2013).

Praticamente todos os distúrbios são devidos ao congelamento/descongelamento. O uso do DMSO ou o processo de lavagem induzem alterações mínimas (Cetin *et al.*, 2001). O congelamento plaquetário causa mudanças patológicas, como a perda da glicoproteína de superfície Ib, diminuição da capacidade de adesão e mudança na forma e ativação (Bock, 1995; Xiao *et al.*, 2000). Alguns pesquisadores têm usado ciclos de congelamento/descongelamento como um método de ativação plaquetário em estudos *in vitro*, uma vez que o efeito deste procedimento danifica fisicamente as membranas de plaquetas e, portanto, inicia a liberação do conteúdo dos grânulos e desencadeia o processo de ativação (Roffi *et al.*, 2014).

Roffi *et al.* (2014) relataram que a quantidade dos fatores de crescimento (GF) liberados no concentrado de plaquetas congelado em avaliações imediata e sete dias após, não foram as mesmas do concentrado fresco. O TGF- β 1 (fator de crescimento transformante) e o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), mostraram resultados similares ou ligeiramente inferiores após o congelamento em relação ao plasma fresco. Nenhuma diferença significativa foi detectada para VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular). Situação diferente foi descrita para o HGF (fator de crescimento de hepatócitos), que mostrou maiores valores no concentrado fresco em relação ao congelado. Ocorre redução da capacidade das plaquetas para induzir uma resposta

aos agentes de agregação, sugerindo uma perda geral na capacidade para tornar-se ativada por várias substâncias agonistas.

O CAP congelado pode ser menos sensível ao cloreto de cálcio do que o fresco, por não liberar a quantidade total de GF armazenados nos grânulos alfa. Apesar dessas diferenças na liberação dos GF, o fresco e o congelado não diferem na habilidade de induzir proliferação celular ou produção de matriz extracelular e sua secreção em culturas de condrócitos e sinoviócitos (Roffi *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as alterações das plaquetas após refrigeração e criopreservação com DMSO 6% e posterior descongelamento ao sete e 30 dias.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a concentração plaquetária e os efeitos dos métodos de conservação sobre esta variável
- Avaliar as características morfológicas das plaquetas por microscopia óptica e os indicadores de ativação celular (MPV, PDW) antes e depois da conservação.
- Identificar a porcentagem de ativação celular após a refrigeração e congelamento do concentrado plaquetário.
- Determinar o melhor tempo de refrigeração e/ou congelamento para conservar as plaquetas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFMG, sob o protocolo nº 17/2016.

4.1. Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 33 cães, de diferentes raças, distribuídos em 22 fêmeas com idade entre nove e 158 meses e 11 machos na faixa etária dos sete a 146 meses, massa corporal entre cinco e 50 Kg, clinicamente sadios no momento da coleta do sangue e negativos para leishmaniose e erliquiose. Os animais se apresentaram para tratamento cirúrgico com indicação de terapia com concentrado autólogo de plaquetas (CAP). A temperatura ambiente média nos dias de coleta entre os meses de junho a outubro, foi de 25°C (14-29°C).

O CAP obtido de cada animal foi aleatoriamente dividido em cinco alíquotas: plasma fresco, plasma para refrigeração por sete dias (R7), plasma para refrigeração por 30 dias (R30), plasma para congelamento por sete dias (C7) e plasma para congelamento por 30 dias (C30). Os grupos foram distribuídos como descrito a seguir:

- Concentrado autólogo de plaquetas (CAP) submetido a refrigeração, composto pelos grupos:

- R7: refrigerado por sete dias.

- R30: refrigerado por trinta dias.
- Concentrado autólogo de plaquetas (CAP) submetido a congelamento em DMSO 6%, composto pelos grupos:
 - C7: congelamento por sete dias.
 - C30: congelamento por trinta dias.

Em todos os grupos foi feita a avaliação do CAP fresco como controle.

4.2. Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada por venopunção da veia jugular, utilizando-se um tubo a vácuo contendo EDTA para a obtenção do hemograma e determinação dos valores celulares basais de cada paciente. Também, foram utilizados em média três tubos por animal com capacidade de 8,5 mL, contendo 1,5 mL de uma solução ACD-A (citrato trissódico 22 g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L) como anticoagulante para obtenção do CAP.

4.3 Processamento e análise das amostras

O sangue foi mantido a temperatura ambiente por 8-10 minutos até a centrifugação. Os tubos com ACD-A foram homogeneizados por inversão e posteriormente centrifugados (*Sislab/basic*) a 191 g durante seis minutos, acompanhado por um minuto de frenagem. Neste momento foram obtidas três camadas celulares e foi aspirado o CAP localizado cerca de 4 mm acima da camada leucocitária. Com auxílio de uma seringa de 3 mL e cateter 20G, aspirou-se em média 0,5 mL da fração do CAP, que foi transferido para cinco tubos tipo *Eppendorf* diferentes, cada um devidamente rotulado com o nome do paciente e o tempo de conservação (R7, R30, C7, C30). O momento inicial foi atribuído ao plasma fresco; R7, a amostra refrigerada por sete dias; C7, amostra congelada por sete dias; R30, amostra refrigerada por 30 dias e C30, amostra congelada por 30 dias. Cada um dos recipientes foi levado para análise, à temperatura ambiente, em contador hematológico (*Poch-100 iV Diff, Sysmex Brasil*) e realizada a contagem plaquetária, volume plaquetária médio (MPV) e amplitude de distribuição plaquetária (PDW).

4.4 Refrigeração do concentrado plaquetário

Duas das cinco amostras obtidas (R7 e R30) foram levadas para a geladeira e submetidas a um resfriamento até 4°C, para posteriormente serem avaliadas aos sete e aos 30 dias após refrigeração.

4.5 Criopreservação do concentrado plaquetário

Outras duas alíquotas (C7 e C30) foram submetidas a criopreservação. O CAP fresco foi disposto em criotubos (*TPP*, previamente esterilizados) de 1,2 mL com fechamento rosqueado, no qual acrescentou-se uma quantidade específica de DMSO suficiente para atingir uma concentração de 6%. Os criotubos foram colocados em freezer até alcançar uma temperatura de -80°C. Estas amostras foram inicialmente colocadas dentro de um recipiente de isopor de 22x12x12 cm com tampa, por quatro horas para permitir o congelamento gradativo. Após este tempo foram retiradas do recipiente e colocadas na prateleira de alumínio que suporta as amostras diretamente dentro do freezer. Estas amostras foram descongeladas aos sete e 30 dias em banho Maria a 37°C, durante 5 minutos, para posterior análise, como já descrito.

4.6 Análise e avaliação morfológica das plaquetas após refrigeração e congelamento

Imediatamente antes de cada análise, as amostras foram homogeneizadas por inversão do tubo e mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos para então se proceder a realização dos testes laboratoriais correspondentes.

Após a centrifugação do sangue no tubo com ACD-A, foi feita uma inspeção visual, para analisar a presença de um turbilhamento de plaquetas na parte superior da camada leucocitária, considerado como indicativo semiquantitativo do grau de forma discóide das plaquetas no plasma, como reportado por Devine e Serrano (2010), que indica a presença de células inativadas.

As amostras fresca, resfriada e congelada, foram avaliadas quanto à composição celular, morfometria e morfologia.

Uma alíquota de plasma fresco foi utilizada para realizar dois esfregaços e determinar por microscopia óptica a morfologia e a porcentagem de ativação plaquetária. O processo de coloração foi baseado na técnica de Romanowski, realizado com corante *Diff Quick* (Laborclin[®], Brasil). Das outras quatro alíquotas (R7, C7, R30, C30) foram produzidos também dois esfregaços e realizado o mesmo procedimento de coloração da primeira alíquota. A porcentagem de ativação plaquetária foi avaliada por microscopia óptica, após a contagem de 200 plaquetas, adaptado da classificação proposta por Würzinger e Schmid-Schönbein (1990) para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão. As plaquetas foram classificadas em três estados morfológicos: 0- plaquetas normais ou *inativadas* (discóides ou alongadas); 1- plaquetas em estado inicial de ativação ou *incerto* (arredondadas, sem presença de pseudópodes); 2- plaquetas *ativadas* (esféricas emitindo pseudópodes). Todas as contagens manuais foram realizadas pelo mesmo técnico.

4.7 Análises estatísticas

Os dados foram distribuídos em quatro grupos: refrigerado, por sete dias e por 30 dias, e congelado, por sete dias e congelado por 30 dias.

As variáveis foram testadas para a normalidade de distribuição pelo teste D'Agostino Pearson ($AP < 0,05$). As variáveis apresentaram distribuição não normal mesmo após a transformação pelo Arcoseno \sqrt{x} ou Log $(x+1)$. As médias foram comparadas utilizando o teste não paramétrico de Friedman para comparações múltiplas de três ou mais grupos pareados com a correção de Dunn. A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad/Prism 6.01. O valor de p menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

Para realizar as comparações entre as diferentes idades e as variáveis valor basal plaquetário, MPV (volume plaquetário médio) e PDW (amplitude de distribuição plaquetária) e contagem plaquetária (PLT), os pacientes foram divididos em três faixas etárias diferentes: sete a 33 meses, 34 a 77 meses e 78 a 158. Também foram realizadas comparações entre sexos para as diferentes variáveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de diminuir o desconforto que pode gerar a constante ida e vinda do paciente e do proprietário ao Hospital Veterinário para realizar a coleta do sangue para a terapia celular com

plaquetas, busca-se uma forma de armazenamento viável de amostras de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) do mesmo paciente e assim, agilizar a execução da aplicação e reduzir o desconforto que produz a estadia do animal no hospital por várias horas para o procedimento. O uso do CAP fresco exige contenção e manipulação do paciente para a coleta de sangue que pode provocar lesão dos vasos por reiteradas abordagens, associado ainda ao tempo de espera enquanto se processa a amostra para a aplicação. Com uma única coleta de sangue pode-se obter a quantidade de sangue necessária para realizar a criopreservação suficiente para o tratamento, que consta de três aplicações em intervalos de 15 dias, de acordo com o protocolo proposto por Silva (2012).

A coleta de sangue realizada inicialmente com agulha 22G e seringa de 10 mL mostrou-se desvantajosa pois verificou-se que obter sangue para cinco tubos diferentes, significava realizar cinco punções da veia jugular. A contenção dos pacientes na maioria das ocasiões era dificultosa, o que ocasionava a perda do vaso, levando a novas punções e algumas vezes inviabilizando o uso da amostra por coleta inadequada. Em contrapartida, a substituição pela coleta em tubos a vácuo (vacutainer®) 21G facilitou a coleta da quantidade necessária de sangue com mínimo estresse, bem como uma coleta mais uniforme para todos os animais.

Dois animais (fêmeas) foram descartados do experimento devido à presença de doença infecciosa (leishmaniose) que pode alterar significativamente a contagem plaquetária e pela impossibilidade de concentração das plaquetas, cujos valores foram menores do que os valores basais do sangue total. Sendo assim, utilizou-se amostras de 31 cães.

Considerando-se os diferentes fatores que podem influenciar o CAP, dentre eles o sexo e a idade, verificou-se que muito embora a proporção entre machos e fêmeas neste estudo, tenha sido de 1:2, não se verificou diferença entre os sexos nas variáveis avaliadas.

Entretanto, ao se considerar as três faixas etárias, observou-se diferença ($P < 0,05$) entre as variáveis MPV e PDW no sangue total e no CAP, mas não na contagem plaquetária basal, apresentando-se os maiores valores nos pacientes na faixa etária compreendida entre os sete e 33 meses.

Schneider e Mischke (2016) relataram em pacientes jovens (seis-24 meses) maiores valores na contagem plaquetária e nas variáveis pré-analíticas como PDW e MPV. Ainda na atualidade, nos estudos em seres humanos e em cães, verifica-se discrepâncias quanto as informações disponíveis sobre a influência do sexo e da idade sobre os parâmetros plaquetários, sendo as informações limitadas unicamente para a PLT e ao MPV. Na rotina clínica, geralmente no momento da coleta do sangue, os animais mais jovens são mais agitados. Isto pode levar ao aumento da liberação de plaquetas mediada por adrenalina, especialmente do baço, o que propicia alterações nas variáveis plaquetárias, principalmente aquelas que tem relação com o tamanho destas células (Kley, 2001).

5.1. Contagem plaquetária

Nas análises realizadas em contador automático, o valor médio plaquetário do sangue total, coletado em EDTA, foi $302,8 (171-405) \times 10^3/\mu\text{L}$. O CAP fresco, após centrifugação apresentou um valor de $790,2 (446-888,9) \times 10^3/\mu\text{L}$, diferindo da contagem observada no sangue total ($P < 0,0001$) (Fig. 1, Tab.1).

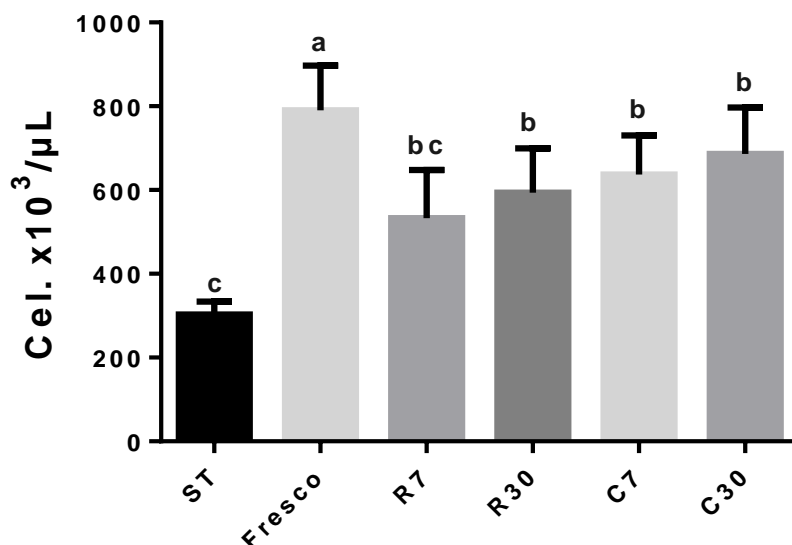


Figura 1. Comparação da contagem média plaquetária (cel.10³/μL) entre o sangue total (ST), o CAP fresco e o CAP conservado em cães.

As barras mostram a à média ± erro padrão da distribuição da contagem plaquetária nos grupos estudados. Letras diferentes entre as barras diferem (P<0,05). Diferenças foram calculadas a partir do Friedman Test para múltiplas comparações. ST: Sangue total. R7: refrigerado por sete dias; R30: refrigerado por 30 dias; C7: criopreservado por sete dias; C30: criopreservado por 30 dias.

O PRP é uma fração de plasma obtido de sangue autólogo que possui uma concentração de plaquetas três a cinco vezes superiores aos níveis basais do sangue (Marx *et al.*, 1998; Marx, 2004; Textor, 2011; Filardo *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013). Neste estudo, entretanto, a concentração média obtida foi 2,84 vezes, inferior, portanto, ao valor considerado como PRP (Fig. 2, Tab.1). Como relatado por Silva *et al.* (2011, 2013) a denominação do produto final obtido neste trabalho deve ser concentrado autólogo de plaquetas (CAP) que, segundo o referido autor, apresenta efeito biológico satisfatório e pode ser empregado como terapia celular.

Uma das vantagens potenciais das preparações ricas em plaquetas é que elas são facilmente obtidas a partir do sangue após centrifugação simples (Anitua *et al.*, 2007), como também observado neste trabalho, e tem particular influência na regeneração de alterações ósseas e dos tecidos moles (Smith e Roukis, 2009, Smyth *et al.*, 2013) constituindo-se portanto, numa alternativa de terapia celular promissora.

Mas apesar de ser uma técnica relativamente simples e de fácil execução, vários fatores podem influenciar a qualidade dos concentrados de plaquetas e diferentes estudos foram e continuam sendo realizados à procura do melhor método para concentração plaquetária, melhor velocidade e tempo de centrifugação. Diferentes protocolos e proposições para se produzir um CAP de qualidade com maior número de plaquetas viáveis são encontrados na literatura, mas não há ainda um protocolo padrão definido (Marx, 2004; Vendramin *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2011; Textor, 2011; Zhu *et al.*, 2013). Neste estudo por exemplo, a centrifugação a 191 g por 6 minutos se mostrou efetiva para concentrar as plaquetas e proporcionou porcentagens maiores (184%) do que a obtida por Silva *et al.* (2011) quando avaliou o método do tubo com centrifugação única à mesma velocidade e tempo para concentrar plaquetas caninas (concentração 49,4%).

Tabela 1. Valores médios e intervalo interquartil das variáveis hematológicas nas amostras de sangue total, CAP fresco e refrigeradas/criopreservadas em cães.

VARIÁVEL	SANGUE TOTAL	FRES CO	REFRIGERAÇÃO		CRIOPRESERVAÇÃO		
			R7	R30	C7	C30	
MPV (fL)							
7-33 meses	12,43 (10,83-14,1) ab	11,33 (10,59-12,33) b	14,23 (12,7-15,08) a	11,57 (10,73-12,45) b	11,49 (10,4-12,5) b	13,44 (11,35-16,45) ab	
34-77 meses	11,15 (10,1-11,78) b	10,99 (9,79-11,97) b	14,01 (12,73-15,08) a	11,72 (10,7-12,88) ab	13,35 (10,93-15,38) ab	12,76 (11,15-13,78) ab	
78-158 meses	11,08 (10,02-12,1) bc	10,97 (10,06-11,51) c	14,07 (11,85-15,7) ab	10,74 (9,99-11,3) c	15,07 (13,05-17,05) a	14,37 (12,3-15,35) a	
PDW (%)							
7-33 meses	14,51 (11,45-16,68) ab	12,08 (10,79-12,8) b	17,68 (15,53-20,55) a	11,61 (8,72-14,85) b	19,28 (14,5-23,23) a	15,39 (7,26-21,43) ab	
34-77 meses	12,13 (10,25-13,25) b	10,85 (9,27-11,83) b	18,27 (16,05-20,4) a	13,1 (10,98-15,08) ab	15,4 (11,1-17,45) ab	13,39 (10,29-17,53) ab	
78-158 meses	12,24 (10,1-13,65) ab	11,13 (10,02-11,83) b	17,22 (13,85-20,95) a	11,05 (8-13,05) ab	18,81 (14-23,65) a	16,26 (10,44-20,2) ab	
PLT (x10³/μL)	302,8 (171-405) c	790,2 (446-888,9) a	532,8 (110-667) bc	593,6 (281-798) b	637,2 (280-833) b	686 (313-807) b	
CONCENTRAÇÃO (vezes)	--	2,84 (1,94-3,15) a	1,72 (0,7-2,6) b	2,03 (1,2-2,5) b	2,26 (1,5-2,8) b	2,32 (1,5-2,7) b	
ATIVAÇÃO (%)	--	21,47 (10-30) b	74,42 (29-100) a	-----	40,76 (21-65) b	78,48 (73,5-89) a	
RECUPERAÇÃO PLT (%)	--	--	62,27 (22,19-88,6) a	76,1 (51,83-97,56) a	81,73 (73,74-89,18) a	81,08 (68,47-92) a	

Para cada variável, letras diferentes na mesma linha diferem (P<0,05).

PLT: contagem plaquetária; MPV: volume plaquetário médio; PDW: amplitude de distribuição plaquetária.

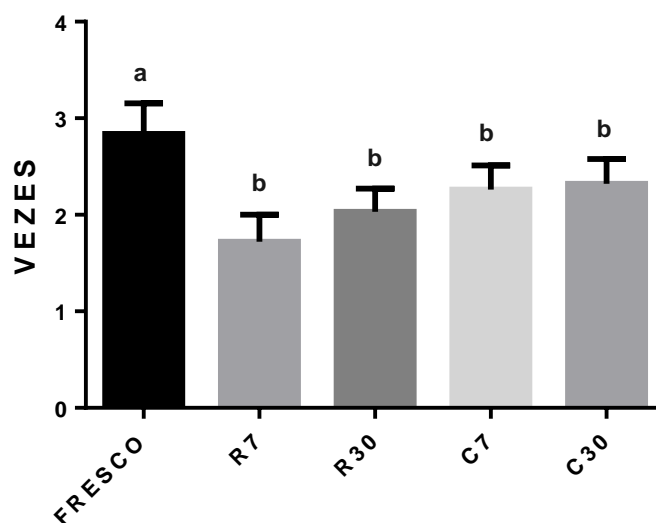


Figura 2. Concentração plaquetária no CAP em cães antes e após a refrigeração e congelamento. As barras mostram a à média \pm erro padrão concentração plaquetária nos grupos estudados. Letras diferentes entre as barras diferem ($P < 0,05$). Diferenças foram calculadas a partir do Friedman Test para múltiplas comparações. R7: refrigerado por sete dias; R30: refrigerado por 30 dias; C7: criopreservado por sete dias; C30: criopreservado por 30 dias.

Este protocolo tem como vantagem a obtenção do CAP usando uma única centrifugação com pequenos volumes de sangue (Carmona, 2006). O uso de única centrifugação reduz a manipulação excessiva da amostra, uma vez que não é necessário extrair o plasma para colocá-lo em outro recipiente e realizar uma segunda centrifugação, reduzindo tempo, custos dos materiais e riscos de contaminação durante preparo do CAP. Söderström *et al.* (2016) relatam o incremento da concentração plaquetária após centrifugação por tempos entre 5-10 minutos. Os 6 minutos utilizados nesta pesquisa mostrou-se eficaz para concentrar adequadamente as plaquetas e se encontra no intervalo considerado favorável por Söderström *et al.* (2016).

A contagem plaquetária do CAP refrigerado por 30 dias, congelado por sete e por 30 dias mostrou aumento em relação ao sangue total ($P < 0,01$). Entretanto, não houve diferença ($P > 0,05$) entre a contagem plaquetária no sangue total e a contagem plaquetária no CAP refrigerado por sete dias, porém foi evidenciada diminuição dos valores plaquetários induzido por alterações como a agregação espontânea devido à refrigeração, o tempo de conservação e a não utilização de uma solução conservante que reduzisse o dano das estruturas celulares (Kattlove *et al.*, 1972; Reid *et al.*, 1999; Beaujean, 2000).

A comparação entre a contagem plaquetária no sangue total e os valores obtidos após o processo de conservação em cada um dos protocolos estão apresentados na Fig. 1 e na Tab. 1.

As amostras nos quatro grupos de conservação mostraram concentrações menores ($P < 0,001$) em relação ao CAP fresco, mas ainda mostrava valores acima do sangue total por tanto, continuaram sendo consideradas como CAP (Fig. 2, Tab. 1).

Quando comparados os grupos R7-R30-C7-C30 não se verificou diferenças na concentração plaquetária entre eles. As amostras do grupo R7 apresentaram valores numéricos inferiores ($P > 0,05$) em relação aos demais grupos estudados (Fig. 1, Tab. 1).

O uso de anticoagulantes como EDTA pode causar lesões estruturais, bioquímicas e funcionais das plaquetas e ser irritante para os tecidos que serão tratados (Silva *et al.*, 2011). A qualidade do concentrado de plaquetas tem relação direta com o anticoagulante empregado. O uso do ACD-A como anticoagulante produz um CAP com melhores características do que quando utilizado citrato de sódio ou heparina (Lei *et al.*, 2009). Considerando esta afirmativa, as possíveis alterações no CAP neste estudo não estão relacionadas com o anticoagulante usado.

5.2. Recuperação plaquetária

Neste estudo houve perda de plaquetas durante os processos de refrigeração e congelamento em todos os tempos estudados quantificada pela recuperação *in vitro* das plaquetas. A recuperação é definida como a porcentagem de plaquetas que sobrevivem após a conservação (Appleman *et al.*, 2009).

Baseado no cálculo de recuperação *in vitro* de plaquetas, proposto por Valeri *et al.* (1986), não foram observadas diferenças entre os grupos de conservação ($P > 0,05$), muito embora o grupo R7 (62,27%) tenha mostrado uma porcentagem menor de recuperação em relação aos grupos R30 (76,1%), C7 (81,73%) e C30 (81,08%) (Fig. 3, Tab. 1).

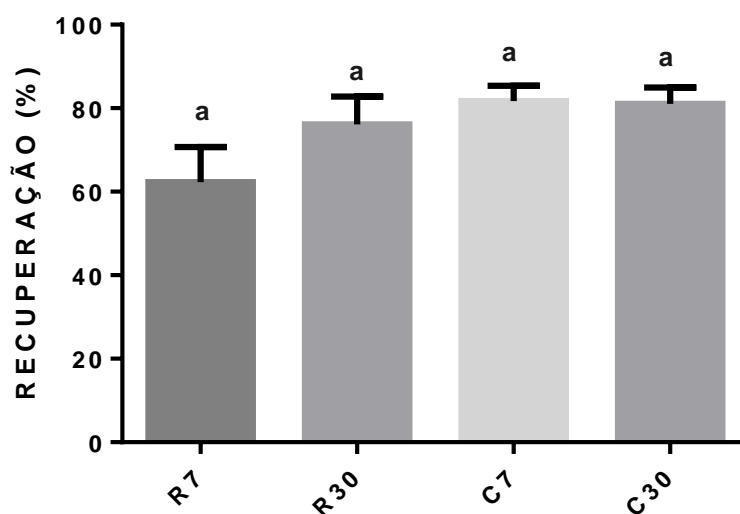


Figura 3. Porcentagem de recuperação plaquetária nos grupos R7, C7, C30 após refrigeração e congelamento do CAP em cães. As barras mostram a média \pm erro padrão da porcentagem de recuperação plaquetária nos grupos estudados. Letras diferentes entre as barras diferem ($P < 0,05$). Diferenças foram calculadas a partir do Friedman Test para múltiplas comparações. R7: refrigerado por sete dias; R30: refrigerado por 30 dias; C7: criopreservado por sete dias; C30: criopreservado por 30 dias.

Os percentuais nas amostras criopreservadas foram superiores aos encontrados por Appleman *et al.* (2009) (72,8%) usando DMSO 6% como crioprotetor. A recuperação no CAP sem DMSO é menor, o que significa que o DMSO provê uma efetiva proteção celular para plaquetas caninas (Taylor 1981; Appleman *et al.* 2009). Conforme o relatado por Guillaumin *et al.* (2008) a

literatura na medicina humana e veterinária reporta uma recuperação do 60 a 70%, menor do que a encontrada nesta pesquisa.

A literatura (Shepherd *et al.* 1984; Valeri *et al.* 1986) entretanto, cita recuperação média de 88% (77-96%) após períodos mais prolongados de congelamento, apesar de observada deterioração celular, o que sugere ser o congelamento um método adequado de conservação.

Como reportado por Appleman *et al.* (2009), uma das principais fontes de erro encontrada na literatura inclui a contagem de plaquetas realizada em analisador hematológico. Este método é validado para contagens de plaquetas caninas em sangue total e não para CAP, o que pode afetar as contagens reportadas nesta pesquisa e as porcentagens de recuperação de plaquetas, uma vez que estas variáveis são calculadas a partir da mensuração do número de plaquetas.

5.3. Volume plaquetário médio (MPV)

Durante o processo de centrifugação, mudanças morfológicas e no tamanho das plaquetas podem ocorrer, alterando os valores do MPV (Argüelles *et al.*, 2006). Neste estudo não foram verificadas alterações ($P>0,05$) do MPV no CAP fresco nas diferentes faixas etárias, quando comparado com os valores do sangue total, indicando que o processo de centrifugação não alterou o volume plaquetário. A média do valor MPV do CAP fresco foi de 11,1 fentolitros (fL), permanecendo assim, dentro dos valores normais reportados para a espécie (Schneider e Mischke, 2016), semelhante ($P>0,05$) ao MPV do sangue total (11,54 fL) (Tab. 1).

Diferentes fatores podem influenciar a qualidade do CAP incluindo a forma da coleta, bem como o método de preparação (aceleração, frenagem e rotação da centrifuga) (Andrade *et al.*, 2008). O MPV no CAP fresco não apresentou diferenças ($P>0,05$) comparado com o sangue total, o que sugere que o processo de centrifugação única não afetou o volume plaquetário e que o controle sobre a velocidade de aceleração e frenagem durante a preparação minimizou a ativação e o dano celular (Andrade *et al.*, 2008). Existem relatos que associam a redução do MPV com fragmentação plaquetária e posterior formação de micropartículas (Landesberg *et al.*, 2000; Ahnadi *et al.*, 2003), fato não observado na avaliação da morfologia plaquetária feita por microscopia óptica nas amostras do CAP fresco.

Nos grupos de conservação na faixa etária dos sete-33 meses não se verificou diferenças ($P>0,05$) nos valores do MPV ao se comparar com o sangue total e CAP fresco, com exceção do grupo R7 que apresentou aumento ($P<0,05$) em relação ao CAP fresco. Por outro lado, na faixa etária dos 34-77 meses foi observado aumento ($P<0,05$) dos valores no grupo R7 em comparação com o sangue total e o CAP fresco. Da mesma forma, na faixa etária compreendida entre os 78-158 meses foi obtido aumento ($P<0,05$) nos valores do MPV para os grupos, R7, C7 e C30 (Fig. 4, Tab. 1).

Mudanças na morfologia plaquetária e nos valores do MPV após resfriamento foram relatadas nos estudos do Johnson *et al.* (2016). Os autores concluíram que a refrigeração (2-6°C) induz alterações morfológicas drásticas em 24 horas, que são mantidas ao longo de 21 dias de armazenamento e mostram uma pequena recuperação após o processo de aquecimento.

O MPV é a medida do tamanho médio das plaquetas, ele aumenta progressivamente quando estas passam de um estado de inatividade com forma discóide a um estado de atividade na forma esférica. Uma amostra de CAP com um MPV similar ao sangue total sugere que o processo de

preparação não levou à ativação plaquetária (Boswell *et al.*, 2012), como observado neste experimento (Fig. 4).

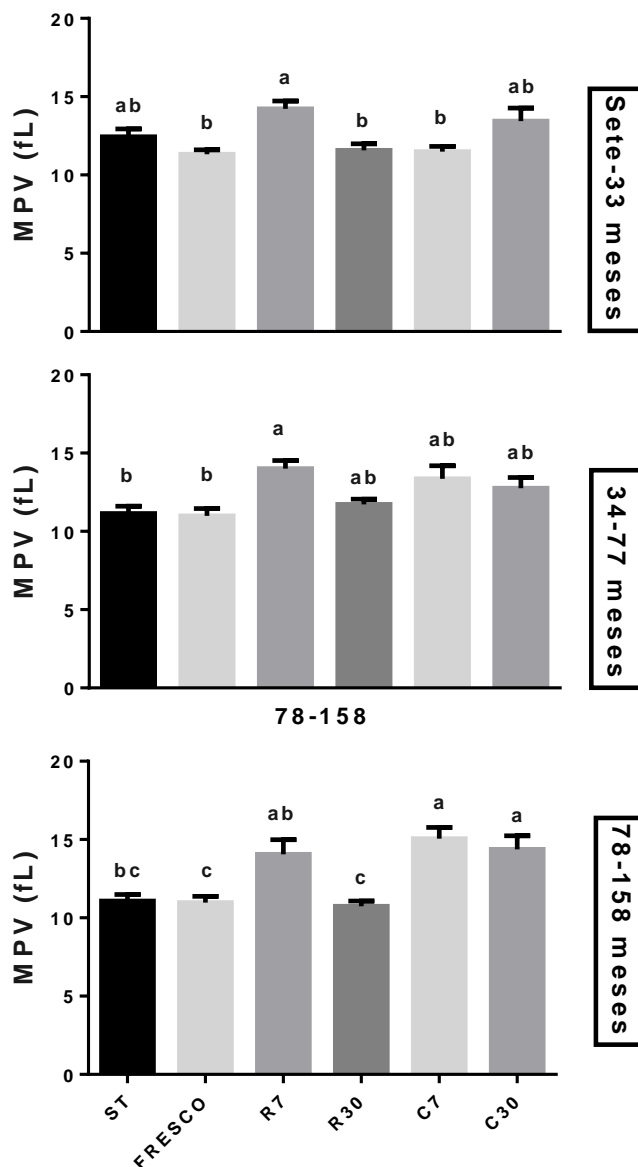


Figura 4. Valores do MPV no sangue total (ST), CAP fresco e o CAP refrigerado/congelado em cães: comparação entre as diferentes faixas etárias. As barras mostram a média \pm erro padrão do MPV nos grupos estudados. Letras diferentes entre as barras diferem ($P < 0,05$). Diferenças foram calculadas a partir do Friedman Test para múltiplas comparações. ST: Sangue total. R7: refrigerado por sete dias; R30: refrigerado por 30 dias; C7: criopreservado por sete dias; C30: criopreservado por 30 dias. Este incremento no MPV também foi observado após criopreservação em DMSO de concentrados de plaquetas em diversos estudos em seres humanos (Bock, 1995; Landi, *et al.*, 2004), cães (Guillaumin *et al.*, 2008), equinos e muare (Miranda, 2011). A diminuição, bem como o aumento do MPV podem ser sinais indicativos de lesão plaquetária, limitando a função celular, mostrado pela agregabilidade, liberação de serotonina, perda de

glicoproteínas e expressão de P-selectina (Bock, 1995; Ritchie *et al.*, 2000; Guillaumin *et al.*, 2008; Ohto e Nollet, 2011; Johnson *et al.*, 2016).

Nos diferentes tratamentos em cada uma das faixas etárias, observou-se aumento ($P < 0,01$) do MPV no grupo R7 (sete-33 meses) e aumento ($P < 0,05$) nos grupos R7, C7, C30 (78-158 meses) (Fig. 4, Tab. 1). O incremento no tamanho plaquetário nos grupos avaliados devido à perda irreversível da forma discóide pode ser induzido pelo armazenamento prolongado sob refrigeração (4°C) ou congelamento, que leva ao aumento das concentrações de cálcio intracelular que contribui para a alteração da morfologia da plaqueta e posterior ativação (Park *et al.*, 2002). Um dos fatores que deve ser considerado é a presença de erro devido à tecnologia utilizada na contagem plaquetária, uma vez que os aparelhos hematológicos podem fazer a leitura de microagregados como se fossem plaquetas, induzindo a mensuração errônea do MPV (Guillaumin *et al.*, 2008).

Aumento no tamanho da plaqueta pode ocorrer nos primeiros 15 minutos após a coleta do sangue, indicando que as mudanças de forma podem depender do tempo de permanência do sangue no anticoagulante, especialmente quando se usa o EDTA, tornando as medições do MPV pouco confiáveis, o que não foi o caso deste estudo. Tem-se conhecimento que as amostras coletadas em tubos que contém EDTA apresentam variações nos parâmetros como PLT, MPV e PDW. Anticoagulantes como o citrato de sódio, ACD/EDTA ou ACD, este último usado nesta pesquisa, foram relatados como satisfatórios ao se considerar a mensuração desta variável (Park *et al.*, 2002).

5.4. Amplitude de distribuição plaquetária (PDW)

O PDW determina a variação de tamanho das plaquetas e pode mostrar aumento dos valores durante a ativação destas células. Os analisadores hematológicos baseados na tecnologia de impedância medem o volume das plaquetas pela deformação do campo elétrico que depende do diâmetro das plaquetas (Vagdatli *et al.*, 2010).

Neste estudo observou-se inicialmente, após o processo de centrifugação, queda nos valores do PDW no CAP fresco em relação ao sangue total, porém sem apresentar diferença estatística ($P > 0,05$) em nenhuma das faixas etárias estudadas (Fig. 5). A força de centrifugação está diretamente relacionada com a ativação plaquetária, fato pelo qual a baixa rotação empregada contribuiu para a manutenção da viabilidade morfológica plaquetária (Andrade *et al.*, 2008).

Uma amostra desejável de CAP deve ser aquela que se assemelhe ao sangue total quanto as características plaquetárias normais e grau de ativação. Landesberg *et al.* (2000) e Ahnadi *et al.* (2003) observaram variações no sangue coletado em tubos contendo EDTA, mostrando alterações morfológicas destas células e, portanto, aumento da ativação plaquetária. Os autores observaram mudanças estruturais das plaquetas, células fragmentadas, maior ativação e menor conteúdo de grânulos no interior da plaqueta. Nesta pesquisa, visando a maior integridade plaquetária, como reportado por Park *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2011), foi utilizado ACD-A como anticoagulante para a obtenção do CAP, mostrando-se como uma opção satisfatória para a conservação das características morfológicas das plaquetas e qualidade do CAP.

A velocidade e tempo de centrifugação são fatores que podem influenciar a ativação plaquetária, sendo considerada favorável, com menor índice de ativação a centrifugação entre 100 e 250 g (Söderström *et al.*, 2016). Neste estudo, na velocidade de 191g, considerada dentro dos limites

favoráveis, obteve-se em 66% das amostras frescas, redução significativa do PDW, o que sugere a centrifugação como responsável.

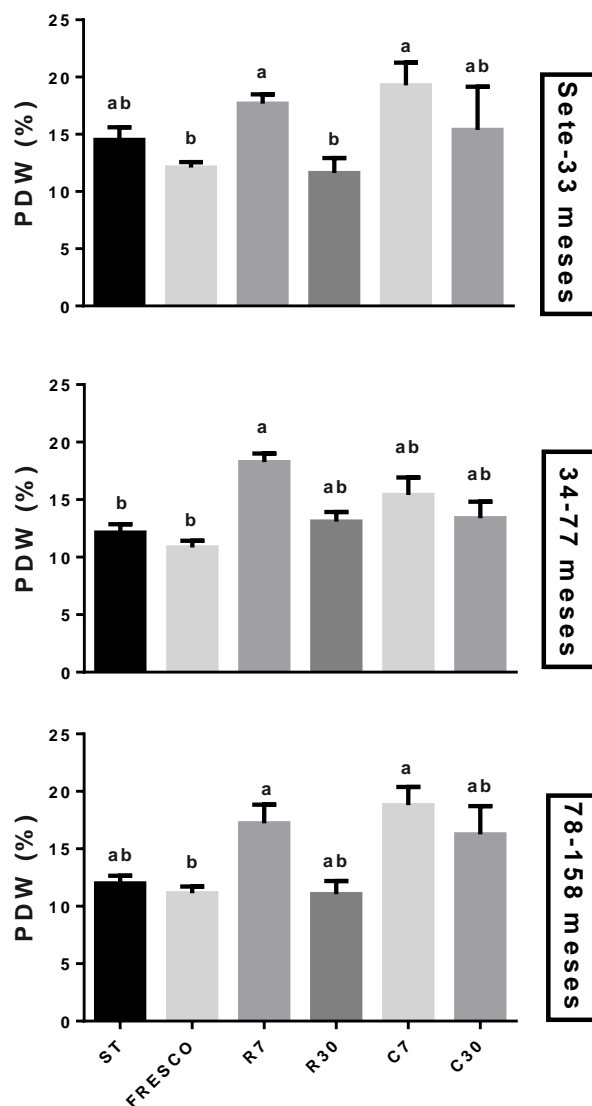


Figura 5. Valores do PDW no sangue total, CAP fresco e CAP refrigerado/congelado em cães: comparação entre as diferentes faixas etárias. As barras mostram a à média \pm erro padrão do PDW nos grupos estudados. Letras diferentes entre as barras diferem ($P < 0,05$). Diferenças foram calculadas a partir do Friedman Test para múltiplas comparações. ST: Sangue total. R7: refrigerado por sete dias; R30: refrigerado por 30 dias; C7: criopreservado por sete dias; C30: criopreservado por 30 dias.

Houve diminuição ($P < 0,05$) do PDW nas amostras do grupo R30 na faixa etária entre sete-33 meses em relação aos grupos R7 e C7. Maiores valores para esta variável foram obtidos no grupo R7 e C7 devido à ativação plaquetária e à decorrente apresentação de pseudópodes, que variaram tanto em número quanto em tamanho, o que segundo Vagdatli *et al.* (2010) aumenta o PDW (Fig. 5). Resultados semelhantes após criopreservação de concentrados plaquetários em equinos e muaras foram relatados por Miranda (2011), que observou maior heterogeneidade da população

plaquetária após o congelamento, concluindo que o aumento do volume plaquetário pode ser interpretado como indicador de alteração morfológica.

Os grupos R30, C7 e C30 não mostraram diferenças ($P>0,05$) do PDW em relação ao sangue total, em todas as faixas etárias. No grupo R7 na faixa etária entre 34-77 meses verificou-se aumento ($P<0,01$) do PDW em relação ao PDW no sangue total e CAP fresco (Fig. 5, Tab.1).

Nos animais na faixa etária entre sete-33 meses e 78-158 meses observou-se aumento ($P<0,05$) desta variável nos grupos R7 e C7 quando comparada com o CAP fresco. Nos grupos R30 e C30 em todas as faixas etárias não houveram mudanças ($P>0,05$) na comparação com o CAP fresco (Fig. 5). O aumento do PDW encontrado neste estudo após o uso das técnicas de conservação pode ser explicado pelo processo de anisocitose decorrente da refrigeração ou congelamento, que resulta na ativação plaquetária e posterior formação de pseudópodes (Wiwanitkit, 2004).

5.5. Morfologia plaquetária

Os dados obtidos para a morfologia plaquetária no CAP encontram-se na Tab. 2.

Tabela 2. Valores médios e intervalo interquartil dos parâmetros morfológicos avaliados em microscopia óptica do conteúdo plaquetário do CAP fresco, refrigerado e criopreservado com DMSO 6% em cães.

MORFOLOGÍA	CAP FRESCO	CAP REFRIGERADO		CAP CRIOPRESERVADO	
		7 DIAS	7 DIAS	7 DIAS	30 DIAS
Inativada (%)	31,06 (13-46) ABa	0,65 (0-0) Bc	16,65 (7-24) Bab	5,97 (3-8) Cb	
Incerta (%)	47,4 (36-59) Aa	2,36 (0-0) Bc	42,71 (27-59) Aa	15,08 (7-21) Bb	
Ativada (%)	21,47 (10-30) Bb	90,55 (100-100) Aa	40,76 (21-65) Ab	78,48 (73,5-89) Aa	

Letras minúsculas, na mesma linha, e maiúsculas, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$).

No CAP fresco e no CAP conservado foi verificada a presença de plaquetas em estado de ativação com forma arredondada e emissão de pseudópodes (Fig. 6 e 7). Estas características foram também relatadas por Würzinger e Schmid-Schönbein (1990) em estudos da ultraestrutura plaquetária de seres humanos.

No CAP obtido após centrifugação, a porcentagem de plaquetas esféricas com emissão de pseudópodes (ativadas) não mostrou diferença ($P>0,05$) em relação às plaquetas com morfologia discóide (inativadas) (Fig. 8, Tab. 2). Algumas células apresentaram processo de degranulação ativo (Fig. 9). O objetivo na obtenção do CAP, após centrifugação, é manter as características estruturais plaquetárias intactas, assegurando assim a preservação dos grânulos plaquetários e a consequente liberação adequada dos GF contidos no seu interior com o intuito de acelerar o processo de recuperação funcional do tecido no qual o concentrado plaquetário será utilizado (Anitua *et al.*, 2007; Arnoczky *et al.*, 2011; Zandim *et al.*, 2012).

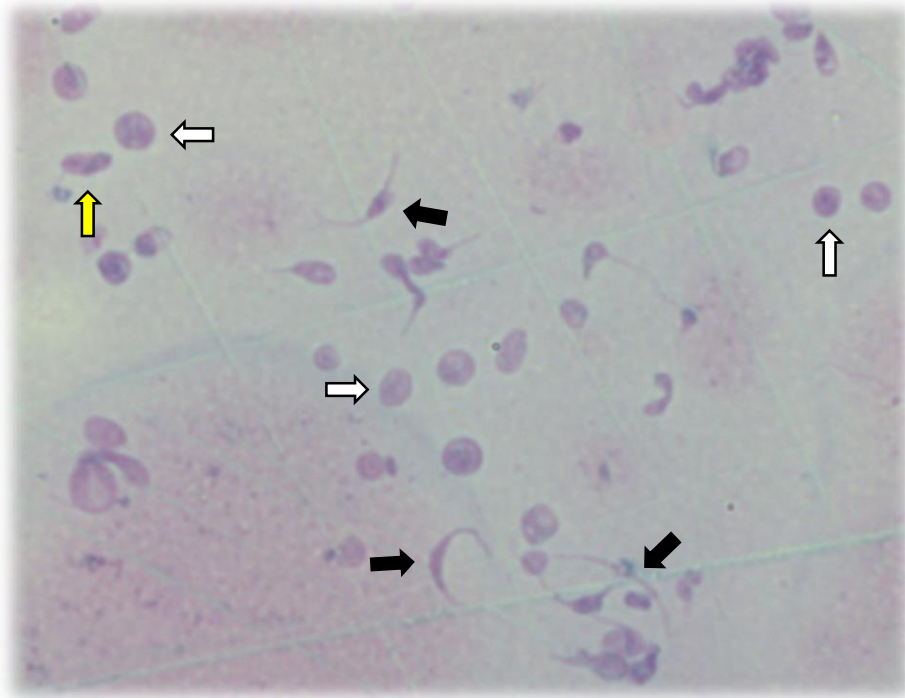


Figura 6. Esfregaço de CAP congelado por 30 dias. Plaquetas inativadas, plaquetas discóides (seta amarela); plaquetas em estado incerto, plaquetas esféricas (setas brancas); plaquetas em estado ativado com formação de pseudópodes (setas pretas). Coloração de Romanowsky, avaliado em microscopia óptica em aumento de 1000x.

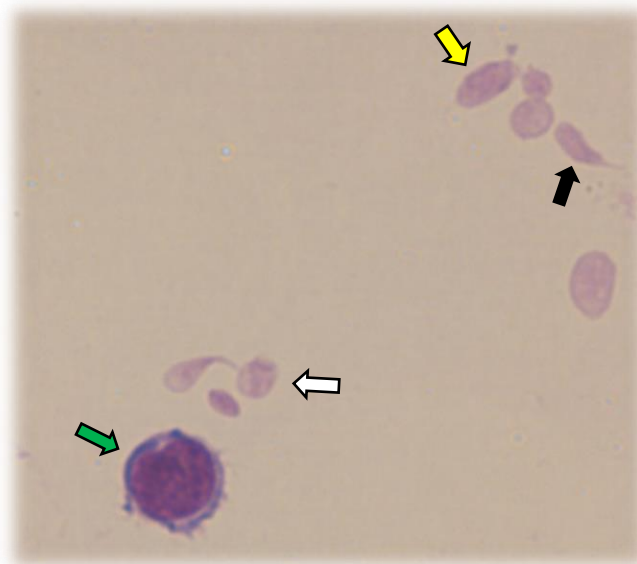


Figura 7. Esfregaço de CAP congelado por 7 dias. Plaquetas inativadas, plaquetas discóides (seta amarela); plaquetas em estado incerto, plaquetas esféricas (seta branca); plaquetas em estado ativado com formação de pseudópodes (seta preta). Presença de leucócito (linfócito) conservado (seta verde). Coloração de Romanowsky, avaliado em microscopia óptica em aumento de 1000x.

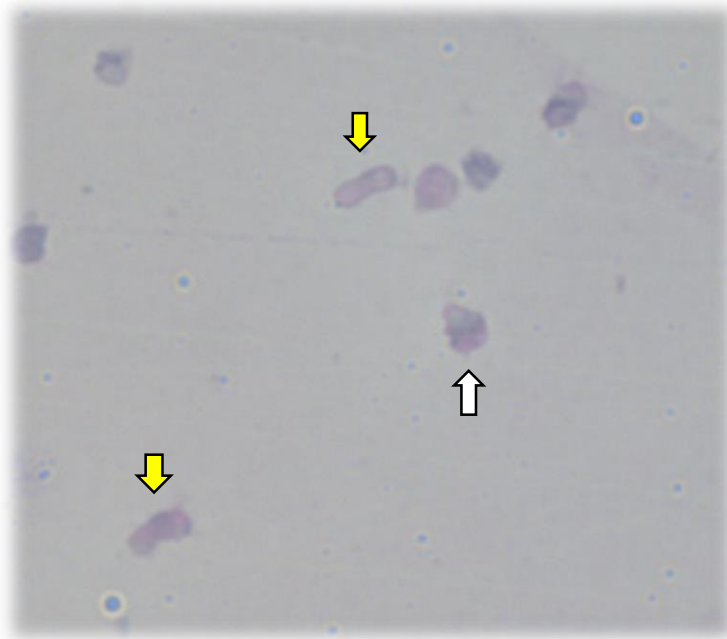


Figura 8. Esfregaço de CAP fresco. Observa-se plaquetas inativadas (setas amarelas); plaquetas esféricas (plaqueta em estado incerto) (seta branca). Coloração de Romanowsky, avaliado em microscopia óptica em aumento de 1000x.

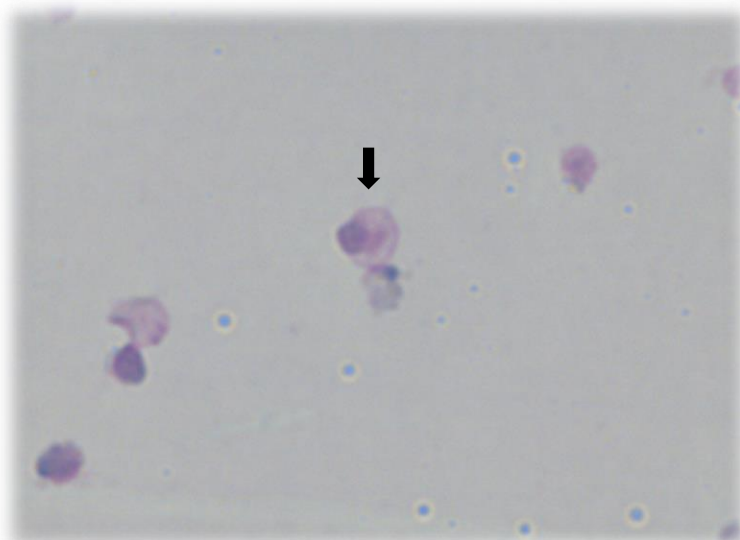


Figura 9. Esfregaço de CAP fresco. Observa-se plaqueta em processo de degranulação (seta). Coloração de Romanowsky, avaliado em microscopia óptica em aumento de 1000x.

Nas alíquotas armazenadas em refrigeração por sete dias o estado morfológico plaquetário predominante foi de ativação (células com emissão de pseudópodes). Foram evidenciadas plaquetas com diminuição de volume quando comparadas com o esfregaço do CAP fresco, microagregados plaquetários em diferentes campos, células com superfície irregular, grânulos

periféricos e formação de pseudópodes com diferentes tamanhos, compatíveis com plaquetas em estado de ativação e plaquetas em estado incerto (arredondadas). Estas células são formadas em sua maioria por actina, proteína reguladora da forma da membrana plasmática (Boswell *et al.*, 2012) que em estado de refrigeração de 23 a 4°C, e inclusive em temperaturas inferiores a 37°C, permite modificações e rearranjos do citoesqueleto e da membrana lipídica das plaquetas (Blockmans *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1999; Hoffmeister *et al.*, 2003). As alterações estruturais das plaquetas encontradas neste estudo, são irreversíveis devido ao armazenamento por um período de tempo prolongado e à temperatura abaixo de 4°C (Guillaumin *et al.*, 2008; Shrivastava, 2009).

Células brancas como linfócitos e neutrófilos foram mantidos, apresentando morfologia e tamanho normais (Fig. 7).

No grupo R30 foram observadas plaquetas com irregularidade da superfície, diminuição do volume, fragmentação e presença de vesiculações intracitoplasmáticas, fatores que não permitiram classificá-las dentro dos parâmetros estipulados para avaliação morfológica e posterior cálculo da porcentagem de ativação plaquetária. Esta situação é considerada inapropriada quando o objetivo é a obtenção do CAP para utilização clínica. Estas características foram também relatadas por Ohto e Nollet (2011) em ensaios preliminares com plaquetas refrigeradas por mais de sete dias que mostraram alterações morfológicas irreversíveis, células degeneradas com diminuição do volume e lise celular, como consequência da perda do líquido intracelular através da membrana plasmática.

Em três amostras do grupo R30 foram observados microagregados plaquetários (Fig. 10) e células com projeções na superfície. No restante das amostras não foi possível realizar a avaliação morfológica devido à fixação inadequada dos corantes à lâmina durante o uso da técnica de Romanowsky, o que impediu a observação das células e suas características pela microscopia óptica.

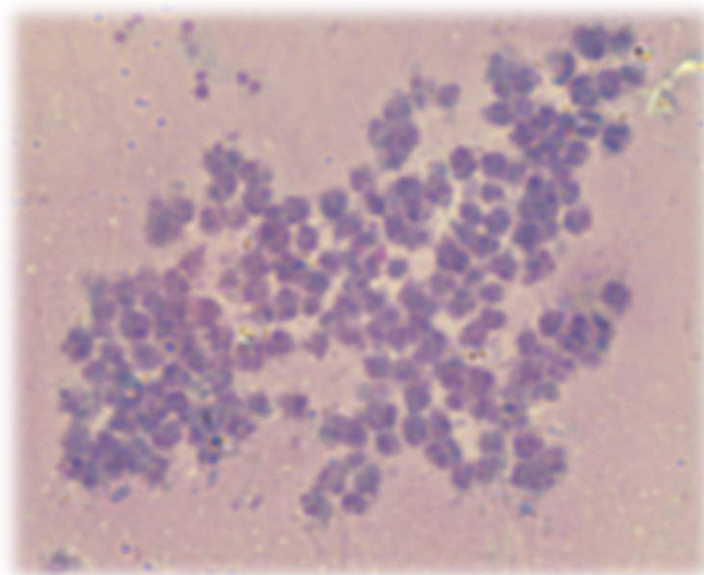


Figura 10. Esfregaço de CAP refrigerado por 30 dias. Observa-se plaquetas ativadas formando um grande agregado plaquetários. Coloração de Romanowsky, avaliado em microscopia óptica em aumento de 1000x.

Nos grupos refrigerados e congelados em todos os tempos de conservação, verificou-se plaquetas esféricas, com vacuolização intracitoplasmática (Fig. 11), condensação de grânulos e diminuição de volume, achados semelhantes aos reportados por Kattlove *et al.* (1972) quem cita que a refrigeração prolongada (>4 horas) das plaquetas causa contração, arredondamento, granulação e bordas irregulares da célula. Estas alterações são menos intensas em curtos espaços de resfriamento.

É possível que as vesiculações observadas em algumas células estejam associadas à sua ativação causada por agitação excessiva antes das análises morfológicas plaquetárias (alíquotas refrigeradas) ou pela exposição prolongada à refrigeração (4°C) ou congelamento e descongelamento (Devine e Serrano, 2010) (Fig. 11).

Foram visualizados também grânulos em posição central no citoplasma remanescente, processo que nas células ativadas, leva a reestruturação do citoplasma e as organelas no seu interior, desencadeando posteriormente a liberação dos GF (Würzinger e Schmid-Schönbein, 1990). Segundo Zandim *et al.* (2012) estes grânulos liberados não resultam necessariamente em degranulação e liberação do seu conteúdo, o que pode ser considerado como prejudicial, pois a qualidade do CAP é assegurada pela presença de fatores de crescimento no plasma, cuja liberação ocorre após excitação dos grânulos das plaquetas. A alteração da membrana mencionada anteriormente, afeta a fusão dos grânulos o que também influencia a quantidade de GF que serão liberados (Würzinger, 1980; Würzinger e Schmid-Schönbein, 1990).

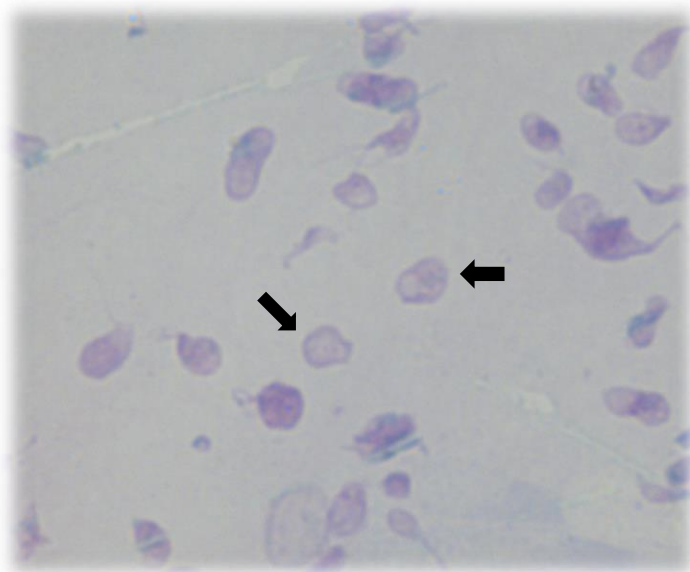


Figura 11. Esfregaço de CAP congelado por 30 dias. Plaquetas com formação de vesículas intracitoplasmáticas (setas). Coloração de Romanowsky, avaliado em microscopia óptica em aumento de 1000x.

O CAP congelado por sete dias não apresentou diferença ($P>0,05$) em relação ao CAP fresco quanto à avaliação da morfologia celular em todas as etapas, apesar de evidenciar aumento relativo das plaquetas em estado incerto e ativado (Fig. 7, Tab. 2). Isto é devido ao efeito crioprotetor do DMSO, à taxa de congelamento lento e ao curto tempo de exposição das amostras a temperaturas baixas, evitando a formação de partículas de gelo intracelulares (Hunt, 2011; Stoll

e Wolkers, 2011) e reduzindo o aumento da permeabilidade da membrana decorrente da transição de fase lipídica (Balint *et al.*, 2002; Stoll e Wolkers, 2011).

No grupo C30 houve diminuição dos valores na forma plaquetária incerta ($P < 0.001$) e inativada ($P < 0.0001$) quando comparado com o CAP fresco. O valor de ativação plaquetária foi maior em relação ao plasma fresco ($P < 0.0001$) e o grupo C7 ($P < 0.001$) (Tab. 2). Pseudópodes curtos e longos foram observados nas plaquetas ativadas (Fig. 12). Ao se comparar os diferentes tipos de preservação, os grupos R7 e C30 não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$) no estado de ativação plaquetária, tendo o grupo R7 a maior frequência de apresentação de plaquetas em estado ativado.

As amostras submetidas a congelamento não mostraram microagregados plaquetários na avaliação microscópica, o que sugere a ação do DMSO impedindo a formação destes aglomerados devido à inibição da ativação espontânea que leva a subsequente agregação plaquetária (Cetin *et al.*, 2001).

Diferenças encontradas principalmente entre os grupos C7 e R7 corroboram o relatado por Cetin *et al.* (2001) e Balint *et al.* (2002), ao considerarem as plaquetas como células que respondem favoravelmente ao processo de congelamento quando adicionados à amostra soluções adequadas para a conservação e mantidas em ambiente por tempo apropriado.

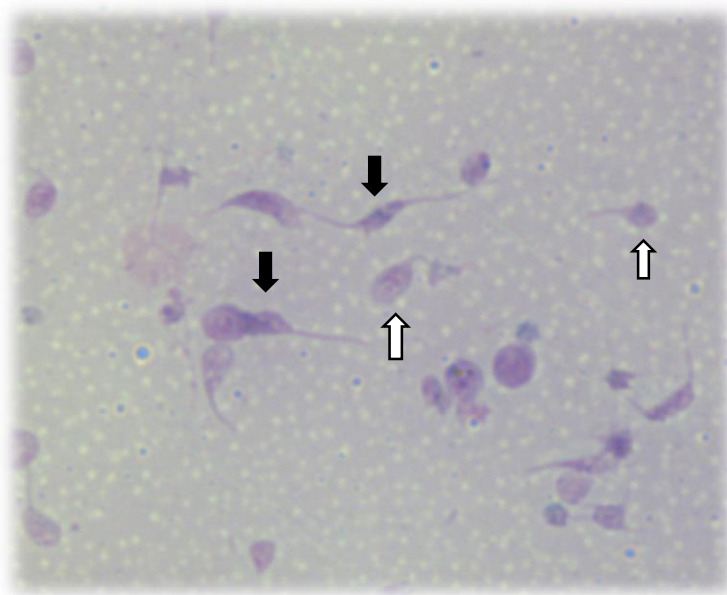


Figura 12. Esfregaço de CAP congelado por 30 dias. Plaquetas com desenvolvimento de pseudópodes de diferentes tamanhos. Pseudópodes curtos (setas brancas), pseudópodes longos (setas pretas). Coloração de Romanowsky, avaliado em microscopia óptica em aumento de 1000x.

Após o armazenamento o número de plaquetas com forma discóide, que representa o estado de inativação plaquetária normal (Everts *et al.*, 2006), diminuiu 14,3% no grupo C7 e 25% no grupo C30 devido ao aumento de células em estado incerto ou ativado. A conservação das plaquetas inativas é importante pois, posteriormente estas células podem sofrer ativação no local a ser administrado, ocorrendo assim a liberação dos GF presentes nos grânulos plaquetários (Everts *et*

al., 2006; Wang e Avila, 2007). Como relatado por Balint *et al.* (2002) esta alteração da morfologia causada pela reorganização ultraestrutural da plaqueta durante o congelamento pode levar à redução da função plaquetária.

A presença de plaquetas no estado incerto encontrada neste estudo no grupo C7 foi semelhante ao observado no CAP fresco, sugerindo que o congelamento por este tempo não tem influência sobre a morfologia da plaqueta. Nos outros dois grupos, verificou-se aumento de plaquetas em estado ativado com maior incremento no grupo R7 (Tab.2). É desconhecida a habilidade de degranulação destas plaquetas no estado incerto porém, é possível que elas consigam finalizar seu processo de ativação (Zandim *et al.*, 2012).

A agregação plaquetária, fenômeno caracterizado por modificações morfológicas das plaquetas após ativação (Everts *et al.*, 2006), foi observada no presente estudo principalmente no CAP refrigerado por sete e 30 dias (Fig. 12). Isto pode ser um evento acidental explicado pela presença de hemoglobina livre (Würzinger *et al.*, 1980) ou pelo resfriamento, aquecimento e posterior agitação que provoca o estado de agregação espontânea (Beaujean, 2000).

5.6. Ativação plaquetária

O plasma fresco obtido após centrifugação única a 191 g., apresentou valores baixos de ativação plaquetária (21,47%). Conforme relatado por Silva *et al.* (2011), a centrifugação única em cães mostrou resultado terapêutico satisfatório, sendo considerado como um método simples e de fácil utilização. Esta viabilidade das plaquetas é crucial para o efeito regenerador do CAP que depende da liberação dos GF (Lei *et al.*, 2009; Wang e Avila, 2007; Zhu *et al.*, 2013). Como observado por Söderström *et al.* (2016) a centrifugação entre 100-250g promove expressão significativamente menor (11-15%) do marcador de ativação plaquetária P-selectina, nos CAPs em relação a velocidades maiores. Portanto, baixa velocidade de centrifugação é o ideal para reduzir a ativação plaquetária e manter a viabilidade morfológica da célula durante o processo de preparação do CAP (Andrade *et al.*, 2008; Söderström *et al.* (2016).

Neste estudo não foram verificadas diferenças ($P>0,05$) das porcentagens de ativação plaquetária entre o CAP congelado por sete dias (40,76%) em relação ao plasma fresco, indicando ser este um bom método e tempo de conservação (Fig. 13), que preserva as qualidades do CAP e sua atividade biológica conforme relatado por Roffi *et al.*, (2014). De acordo com Reid *et al.* (1999), as plaquetas congeladas em DMSO mostram menor porcentagem de ativação após armazenamento e uma expressão aumentada de P-selectina após estimulação com trombina, em relação ao plasma congelado sem uso de crioprotetor, mantendo as plaquetas ainda viáveis para uso após a conservação.

Diferenças ($P<0,001$) foram encontradas entre os grupos R7-C7 e C7-C30 (Fig. 13, Tab.1 e 2). A estabilização dos compartimentos das plaquetas pelo congelamento permite que esta técnica conserve as qualidades do CAP durante o tempo necessário de armazenamento (Tablin *et al.*, 2001; Valeri, *et al.*, 2003). Entretanto, neste estudo o armazenamento por 30 dias em DMSO mostrou alterações morfológicas das plaquetas em relação ao tempo de sete dias. É considerado que o acréscimo do DMSO ao CAP auxilia na diminuição da ativação durante o armazenamento, e promove maior sensibilidade perante agentes ativadores no momento do uso do CAP para a terapia celular (Taylor, 1981; Gao *et al.*, 1999, Reid *et al.*, 1999).

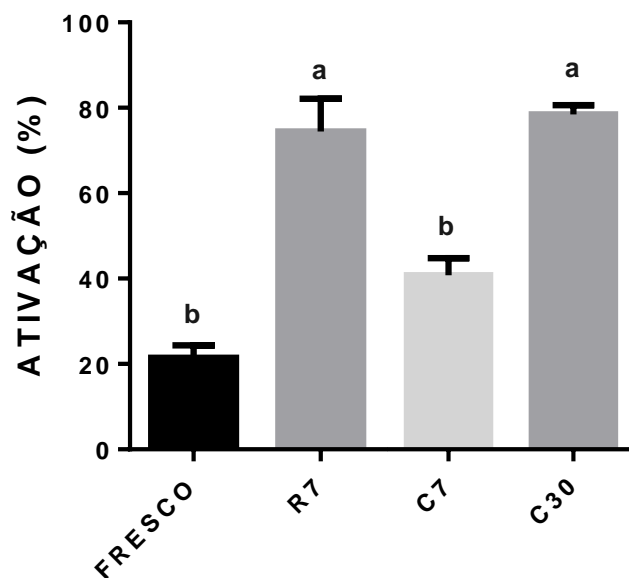


Figura 13. Porcentagem de ativação no CAP fresco e nos grupos R7, C7, C30. As barras mostram a média \pm erro padrão da porcentagem da ativação plaquetária nos grupos estudados. Letras diferentes entre as barras diferem ($P < 0,05$). Diferenças foram calculadas a partir do Friedman Test para múltiplas comparações. R7: refrigerado por sete dias; C7: criopreservado por sete dias; C30: criopreservado por 30 dias.

Aumento ($P < 0,0001$) da ativação plaquetária em relação ao CAP fresco (Fig. 13, Tab. 1 e 2) foi observado após a criopreservação por 30 dias (78,48%) e a refrigeração por sete dias (74,42%). Alguns estudos mostram que a exposição a temperaturas iguais ou inferiores a 4°C provoca diminuição do estado de inativação celular, alterações na forma e aumento da ativação e agregação plaquetária (Laufer *et al.*, 1979; Xiao *et al.*, 2000; Reddoch *et al.*, 2014), como observado neste estudo. Segundo Tablin *et al.*, (2011) plaquetas armazenadas por mais de 24 horas a 4°C sofrem fusão e secreção dos grânulos alfa, densos e lisossomais pelo que se considera que têm um valor clínico mínimo quando a ativação se torna acentuada. Nos casos de congelamento, Balint *et al.* (2002) recomendam o uso de uma taxa de congelamento lenta (1°C/min) e controlada. Nesta pesquisa, entretanto, não foi possível controlar a taxa de congelamento, o que poderia ter influenciado a qualidade e viabilidade das plaquetas recuperadas.

Neste estudo verificou-se que os índices plaquetários, MPV do PDW, desempenham um papel importante como indicadores na predição de mudança de forma e ativação celular como apontado na literatura consultada (Jagroop *et al.*, 2002; Wiwanitkit, 2004; Vagdatli *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- O congelamento do CAP por sete dias em DMSO 6% a -80°C é um método de armazenamento que preserva as plaquetas caninas, com manutenção das características morfológicas e de inatividade, podendo ser usado na rotina clínica.
- O uso de DMSO 6% e congelamento a -80°C , é um método adequado para manter as plaquetas morfológica e morfológicamente viáveis, proporcionando a capacidade de prolongar sua vida útil.
- A refrigeração por sete e por 30 dias é deletéria para a conservação da morfologia plaquetária canina e não deve ser empregada como banco de células.
- O método de centrifugação única com velocidade de 191 g por 6 minutos se apresenta como satisfatório para a obtenção de CAP em cães.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHNADI, C.; 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.
- 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.
- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; ORIVE, G.; ANDÍA, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, v.28, n. 31, p. 4551–4560, 2007.
- APPLEMAN E. H.; SACHAIS B. S.; PATEL R.; *et al.* Cryopreservation of canine platelets, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, p. 138-145, 2009.
- ARGÜELLES D.; CARMONA J.; PASTOR J.; *et al.* Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets, *Research in Veterinary Science*, v. 81, n. 2., p. 237-245, 2006.
- ARNOCZKY P.; DELOS D.; RODEO A. What Is Platelet-Rich Plasma?, *Operative Techniques in Sports Medicine*, v. 19, n. 3, p.142–148, 2011.
- BALINT, B.; VUCETIC, D.; TRAJKOVIC-LAKIC, Z.; *et al.* Quantitative, functional, morphological and ultrastructural recovery of platelets as predictor for cryopreservation. *Haematologia*. v. 32, n. 4, p. 363-375, 2002.
- 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.
- BLAIR P.; FLAUMENHAFT R., Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates, *Blood Reviews*, v. 23, n. 4, p. 177-189, 2009.
- BLOCKMANS D.; DECKMYN H.; VERMYLEN J., Platelet activation, *Blood reviews*, v. 9, n. 3., p. 143-156, 1995.
- BOCK, M.; SCHLEUNING, M.; HEIM, M. U.; MEMPEL, W. Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function. *Transfusion*, 35(11), 921–924, 1995.
- BOSWELL, S.; COLE, B.; SUNDMAN, E.; *et al.* Platelet-rich plasma: A milieu of bioactive factors. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, v. 28, n. 3, p. 429–439, 2012.
- CARMONA J., Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse, *Tese de Doutorado em Medicina Veterinária*, Universidad Autónoma de Barcelona, 2006.
- CETIN, M.; ESER, B.; ER, Ö; *et al.* Effects of DMSO on platelet functions and P-Selectin expression during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 24, n. 3, p. 261–267, 2001.
- DEVINE D.; SERRANO K. The Platelet Storage Lesion, *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, n. 2, p. 475-487, 2010.

- EVERTS P.; KNAPE J.; WEIBRICH G.; SCHÖNBERGER J., *et al.* Platelet-rich plasma and platelet gel: a review, *The Journal of extra-corporeal technology*, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006.
- FAO. Cryoconservation of Animal Genetic Resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. v. 12, p. 85-94, 2012.
- FILARDO, G.; KON, E.; PEREIRA, M.; *et al.* Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: Single- versus double-spinning approach. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, v. 20 n.10, p. 2082–2091, 2012.
- GAO, D. Y.; NEFF, K.; BONDERMAN, P., *et al.* Development of Optimal Techniques for Cryopreservation of Human Platelets. *Cryobiology*, v. 38, p. 225–235, 1999.
- GUILLAUMIN, J.; JANDREY, K. E.; NORRIS, J. W.; TABLIN, F. Assessment of a dimethyl sulfoxide-stabilized frozen canine platelet concentrate. *American Journal of Veterinary Research*, v. 69, n. 12, p. 1580–1586, 2008.
- HARRISON, P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*, v. 19, n. 2, p. 111–123, 2005.
- HOFFMEISTER, K.; FELBINGER, T.; FALET, H., DENIS, C.; *et al.* The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell*, v. 112, n. 1, p. 87–97, 2003.
- HUNT, C. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 38, n. 2, p. 107–123, 2011.
- JAGROOP I.; STAVROULA, T.; MIKHAILIDIS D., Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets*, v. 13, n. 5–6, p. 301–306, 2002.
- JOHNSON L.; TAN S.; WOOD B.; *et al.* Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*, v. 56, p. 1807-1818, 2016.
- KATTLOVE, H. E.; ALEXANDER, B.; WHITE, F. The effect of cold on platelets. II. Platelet function after short-term storage at cold temperatures. *Blood*, v. 40, n. 5, p. 688–96, 1972.
- KLEIN, C.; WAGNER, S.; SILVA, J. DA. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. *Revista Brasileira de Biociências*, 509–513, 2011.
- KLEY S. Labordiagnostische Referenzwerte des Hundes unter Berücksichtigung von Alter, Rasse, Gebrauchszweck, Haltung und Geschlecht. Thesis, Ludwig Maximilians Universität München, Munich, Germany, 2001.
- LANDESBERG, R.; ROY, M.; & GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, v. 58, n. 3, p. 297-300-301, 2000.
- LANDI, E.; ROVERI, E.; OZELO, M.; *et al.* Effects of high platelet concentration in collecting and freezing dry platelets concentrates. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 30, n. 3, p. 205–212, 2004.
- LAUFER N.; GROVER N B.; BEN-SASSON S.; FREUND H. Effects of adenosine diphosphate, colchicine and temperature on size of human platelets. *Thromb Haemost.* v. 41, p. 491–7, 1979.

- LEI, H.; GUI, L.; XIAO, R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clinical Biochemistry*, v. 42, n. 13–14, p. 1452–1460, 2009.
- MARX, R.; CARLSON, E.; EICHSTAEDT, R., *et al.* Platelet-rich plasma, growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 85., n. 6., p. 638-646, 1998.
- MARX, R. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 62, n. 4, p. 489–496, 2004.
- McLELLAN, M.; DAY, J. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), v. 38, p. 1–5, 1995.
- MEI-DAN, O.; CARMONT, M. Novel Applications of Platelet-Rich Plasma Technology in Musculoskeletal Medicine and Surgery. *Operative Techniques in Orthopaedics*, v. 22, n. 2, p. 56–63, 2012.
- MIRANDA A. L. Influência do anticoagulante na obtenção e criopreservação do plasma rico em plaquetas em equinos e muare. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG., 2011.
- MONTGOMERY, R.; REDDOCH, K.; EVANI, S.; CAP, A.; RAMASUBRAMANIAN, A. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, v. 53, n. 7, p. 1520–1530, 2013.
- OHTO H.; E NOLLET K. Overview on platelet preservation: Better controls over storage lesion, *Transfusion and Apheresis Science*, v. 44, n. 3, p. 321-325, 2011.
- PARK, Y.; SCHOENE, N.; HARRIS, W. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets*, v. 13, n. 5–6, p. 301–306, 2002.
- REDDOCH K.; PIDCOKE H.; MONTGOMERY R., *et al.* Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. *Shock*, v. 41, n. 1, p. 54-61. 2014.
- REID, T. J.; LARUSSA, V. F.; ESTEBAN, G., *et al.* Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. *Cryobiology*, v. 38, n. 3, p. 209–224, 1999.
- RITCHIE J.; ALEXANDER H.; REA I. Flow cytometry analysis of platelet P-selectin expression in whole blood - Methodological considerations, *Clinical and Laboratory Haematology*, v. 22, n. 6, p. 359-363, 2000.
- ROFFI A.; FILARDO G.; ASSIRELLI E.; *et al.* Does Platelet-Rich Plasma Freeze-Thawing Influence Growth Factor Release and Their Effects on Chondrocytes and Synoviocytes?, *BioMed Research International*, v. 2014, n. 692913, p. 10, 2014.
- SCHNEIDER, L. e MISCHKE, R. Platelet variables in healthy dogs: reference intervals and influence of age, breed and sex. *Comparative Clinical Pathology*, v. 25, n.6, p. 1097–1106, 2016
- SCHOENFELD, H.; GRIFFIN, M.; MUHM, M.; *et al.* Cryopreservation of platelets at the end of their conventional shelf life leads to severely impaired in vitro function. *Cardiovascular Journal of South Africa, Durbanville*, v. 17, n. 3, p. 125- 129, 2006.
- SHEPHERD, K. M.; SAGE, R. E.; BARBER, S.; O'BRIEN, E. Platelet cryopreservation. *Cryobiology*, v. 21. N. 1, p. 39–43, 1984.

- SHRIVASTAVA, M. The platelet storage lesion. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*, v. 41, n. 2, p. 105–13, 2009.
- SILVA, R.; REZENDE C.; PAES-LEME F.; CARMONA J.. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular, *Arch Med Vet*, v. 43, n. 1, p. 95-98. 2011.
- SILVA, R.F. Caracterizações celular e ultra-estrutural do concentrado de plaquetas em cães e gatos e avaliação do seu efeito na osteoartrose em cães. 88f. Tese (Doutorado em ciência animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2012.
- SILVA, R.; CARMONA J.; REZENDE C. Use of intra-articular autologous platelet concentrates as coadjuvants in the surgical arthroscopy treatment of elbow dysplasia in a bitch, *Arch Med Vet*, v. 45, p. 213-217, 2013.
- SMITH S.; ROUKIS T. Bone and Wound Healing Augmentation with Platelet-Rich Plasma, *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, v. 26, p. 559-588, 2009.
- SMYTH N.; MURAWSKI C.; FORTIER L.; *et al.* Platelet-Rich Plasma in the Pathologic Processes of Cartilage: Review of Basic Science Evidence, *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, v. 29, p. 1399-1409, 2013.
- SÖDERSTRÖM, A.; NYBO, M.; NIELSEN, C.; VINHOLT, P. J. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2016.
- STOLL, C.; WOLKERS, W. Membrane stability during biopreservation of blood cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 38, n. 2, p. 89–97, 2011.
- TABLIN F.; WOLKERS W F.; WALKER N J., *et al.* Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets. *Cryobiology*, v. 43, n. 2, p. 114-123, 2001.
- TAYLOR M. Cryopreservation of platelets: of four methods, *J Clin Pathol*, v. 34, p. 71-75, 1981.
- 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.
- VAGDATLI, E.; GOUNARI, E.; LAZARIDOU, E.; *et al.* Platelet distribution width: A simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia*, v. 14, n. 1, p. 28–32, 2010.
- VALERI C.; FEINGOLD H.; MELARAGNO A.; VECCHIONE J. Cryopreservation of dog platelets with dimethyl sulfoxide: therapeutic effectiveness of cryopreserved platelets in the treatment of thrombocytopenic dogs, and the effect of platelet storage at -80 degrees C, *Cryobiology*, v. 23, n. 5, p. 387-394, 1986.
- VALERI, C.; SREY, R.; LANE, J.; RAGNO, G. Effect of WBC reduction and storage temperature on PLTs frozen with 6 percent DMSO for as long as 3 years. *Transfusion*, v. 43, n. 8, p.1162–1167, 2003.
- VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, T. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev. Bras. Cir. Plást*, v. 24, n. 2, p. 212–218, 2009.
- WANG, H.; AVILA, G. Platelet Rich Plasma: Myth or Reality?, *European Journal of Dentistry*, v. 1, n. 4, p. 192-194, 2007.

WIWANITKIT V., Plateletcrit, Mean Platelet Volume, Platelet Distribution Width: Its Expected Values and Correlation With Parallel Red Blood Cell Parameters. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, v. 10, n. 2, p.175–178, 2004.

WÜRZINGER L.J.; BLASBERG P.; SCHMID-SCHÖNBEIN H. Hemolysis and in vitro thrombus formation, In: Stoltz J.F. & Drouin P. (Eds.), *Hemorheology and Diseases*. Doin, Paris, p. 529-533, 1980.

WÜRZINGER, L.J. Histophysiology of the circulating platelet. *Adv. Anat. Embryo Cell Biol.*, v.120, p.1-96, 1990.

WÜRZINGER L.J. e SCHMID-SCHÖNBEIN H. The role of fluid dynamics in triggering and amplifying haemostatic reactions in thrombogenesis. *Monogr. Atheroscler.* v.15, p. 215-226, 1990.

XIAO H.; HARVEY K.; LABARRERE C. A.; KOVACS R. Platelet cryopreservation using a combination of epinephrine and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants, *Cryobiology*, v. 41, p. 97-105, 2000.

ZANDIM, B.; SOUZA, M.; MAGALHÃES, P.; *et al*, Platelet activation: Ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 83–92, 2012.

ZHU, Y.; YUAN, M.; MENG, H.; *et al.*, Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: A review. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 21, n. 11, p. 1627–1637, 2013.