

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) DE EQUINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Liomara Andressa do Amaral Kwirant

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) DE EQUINOS

Liomara Andressa do Amaral Kwirant

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Flávio Desessards De La Côte

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Kwirant, Liomara Andressa do Amaral
Criopreservação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) de
Equinos / Liomara Andressa do Amaral Kwirant.-2013.
55 p. ; 30cm

Orientador: Flávio Desessards De La Côte
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. Plasma rico em plaquetas 2. Dimetil sulfóxido 3.
Criopreservação I. De La Côte, Flávio Desessards II.
Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) DE
EQUINOS**

elaborada por
Liomara Andressa do Amaral Kwirant

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Flávio Desessards De La Côte, PhD
(Presidente/Orientador)

Alexandre Krause, PhD. (UFSM)

Karin Erica Brass, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos concedidas durante toda a minha vida.

Aos meus pais, Vilmar Kwirant e Lidia Vogel do Amaral Kwirant, por todo o amor, ensinamentos, incentivo e suporte ao longo dos anos.

Ao meu irmão, Rômulo do Amaral Kwirant, pela amizade e companheirismo.

A toda a minha família, pelo carinho e apoio.

Ao meu orientador, professor Flávio Desessards De La Côte, pela oportunidade, confiança e orientação nestes dois anos.

Às professoras Karin Brass e Mara Rubin, pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho.

À colega de pós-graduação Raqueli França, pela cuidadosa realização dos procedimentos laboratoriais, amizade e companheirismo.

A todos os colegas e estagiários da clínica de eqüinos e Embryolab, em especial à Roberta Pereira, pelo auxílio durante o experimento e amizade.

Às estagiárias Patrícia Soares Vieira e Mariana Cocco, por toda a ajuda, dedicação, paciência e amizade despendidas na realização do experimento.

A todos os meus amigos, pelo apoio, amizade, companheirismo e bons momentos de descontração.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

CRIOPRESERVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) DE EQUINOS

AUTORA: LIOMARA ANDRESSA DO AMARAL KWIRANT

ORIENTADOR: FLÁVIO DESESSARDS DE LA CÔRTE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é definido como plasma com quantidade de plaquetas três vezes superior ou mais à do sangue total. O PRP vem sendo largamente utilizado no tratamento de diferentes lesões, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. O objetivo deste estudo foi buscar um método eficaz de armazenar o PRP equino, sem perda significativa de sua viabilidade. Foram coletados 500 ml de sangue de oito pôneis clinicamente saudáveis, dos quais 100 ml foram utilizados para o preparo do PRP e 2 ml foram enviados à análise laboratorial, para contagem de plaquetas e determinação do volume plaquetário médio (VPM). O sangue total passou por uma primeira centrifugação, de 1000rpm (224g) por 10 minutos para obtenção do plasma. O plasma obtido foi novamente centrifugado, a 1400rpm (440g) por mais 10 minutos para obtenção de 10 ml de PRP. O PRP foi dividido em três amostras de 2 ml, sendo uma considerada a amostra fresca e as outras duas destinadas à criopreservação. A amostra fresca foi enviada ao laboratório para contagem plaquetária, determinação do VPM e avaliação morfológica. A avaliação morfológica consistiu na contagem de 200 plaquetas, sob microscopia óptica e na classificação quanto à sua forma: em inativas (discóides), ativadas (com emissão de pseudópodes) ou em estado incerto (que perderam a forma discóide, mas não apresentavam pseudópodes). As amostras destinadas à criopreservação foram armazenadas em freezer, a -80°C , durante 14 dias, contendo 6% de dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotetor ou sem adição de crioprotetor. Após este período, as amostras foram descongeladas e submetidas às mesmas análises laboratoriais da amostra fresca. As amostras frescas e congeladas com DMSO não apresentaram diferença quanto ao número total de plaquetas, VPM e plaquetas ativadas ($617,9 \pm 65,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; $5,3 \pm 0,06\text{fL}$; 9,6%) ($p > 0,05$). Entretanto, as amostras sem DMSO apresentaram um número menor de plaquetas ($519,6 \pm 66 \times 10^3/\mu\text{L}$), maior VPM ($5,71 \pm 0,08\text{fL}$) e maior porcentagem de plaquetas ativadas (13,87%) ($p < 0,05$). O DMSO 6% se mostrou um crioprotetor eficaz no armazenamento do PRP equino a -80°C por 14 dias.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas. Dimetil sulfóxido. Criopreservação.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Postgraduate Program of Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

EQUINE PLATELET-RICH PLASMA (PRP) CRIOPRESERVATION

AUTHOR: LIOMARA ANDRESSA DO AMARAL KWIRANT

ADVISER: FLÁVIO DESESSARDS DE LA CÔRTE

Date and Local of Defense: Santa Maria, February 28th, 2013.

Platelet-rich plasma (PRP) is defined as a plasma volume with a higher platelet count than that of whole blood. PRP has been widely used for treatment of different lesions, both in human and in veterinary medicine. The aim of this study was to search for an effective method of storing equine PRP, without loss of viability. Blood (500 ml) was collected from 8 clinically healthy ponies, where 100 ml were used to prepare PRP; 2 ml were used to determine platelet count and mean platelet volume (MPV). Whole blood was centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes to obtain plasma. The plasma obtained was centrifuged again at 1400rpm for 10 minutes to obtain 10 ml of PRP. PRP was divided into 3 samples of 2 ml, one being considered the fresh sample and the other 2 were frozen. Platelet count, determination of MPV and morphological evaluation were performed on the fresh sample. Morphologic evaluation consisted of counting 200 platelets under light-microscopy and their classification in inactive (discoid), activated (with pseudopodia) or uncertain state (who lost the discoid form but showed no pseudopodia). The samples to be cryopreserved were stored in a freezer at -80 ° C for 14 days, containing 6% dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant or without any addition of cryoprotectants. After this period, samples were thawed and submitted to the same analysis of the fresh sample. The fresh and DMSO frozen samples showed no difference in the total number of platelets, activated platelets and MPV ($617.9 \pm 65.5 \times 10^3/\mu\text{L}$, $5.3 \pm 0.06 \text{ fL}$, 9.6%) However, samples frozen without DMSO showed fewer platelets ($519.6 \pm 66 \times 10^3/\mu\text{L}$), higher MPV ($5.71 \pm 0.08 \text{ fL}$) and a higher percentage of activated platelets (13.87%). 6% DMSO proved be an effective cryoprotectant in storing equine PRP at -80°C for 14 days.

Key words: Platelet-rich plasma. Dimethyl sulfoxide. Cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação plaquetária e liberação dos fatores de crescimento após estímulo por agonista.....	13
Figura 2 - Fotografia ultra-estrutural, mostrando a medida dos eixos maior e menor de plaquetas normais, ativadas e em estado incerto.....	13
Figura 3 - Funções dos fatores de crescimento derivados das plaquetas.....	15

CAPÍTULO 1

Figure 1 - Fresh PRP sample, showing inactive platelets (normal discoid shape).....	43
Figure 2 - 6% DMSO PRP sample post thawing, showing mostly inactive platelets and a few activated and in uncertain state platelets.....	44
Figure 3 - Frozen PRP sample (without DMSO) post thawing, showing mostly in uncertain state platelets, and some activated platelets, with long pseudopods.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fonte e função dos fatores de crescimento (FC) contidos nos grânulos plaquetários alfa.....	17
Tabela 2 - Força e tempo de centrifugação dos protocolos usados para obtenção de PRP.....	20
Tabela 3 - Técnicas, <i>in vitro</i> , empregadas na avaliação dos concentrados de plaquetas.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Plaquetas	11
2.1.1 Estrutura e ativação plaquetária.....	11
2.1.2 Função plaquetária.....	13
2.2 Plasma rico em plaquetas (PRP)	15
2.2.1 Fatores de crescimento	16
2.2.2 Métodos de preparo do PRP	18
2.2.3 Utilização do PRP na medicina humana	20
2.2.4 Utilização do PRP na medicina equina	21
2.3 Criopreservação.....	23
2.3.1 Lesões plaquetárias de armazenamento.....	23
2.3.2 Criopreservação de concentrado de plaquetas em humanos	25
2.3.3 Métodos de avaliação da qualidade plaquetária após congelamento	27
3. CAPÍTULO 1	30
4. CONCLUSÃO.....	46
5. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) se caracteriza por conter alta concentração de plaquetas que, ativadas, liberam fatores de crescimento com efeito terapêutico no processo de cicatrização, por possuírem ação quimiotática, neovascular e mitogênica (EVERTS et al., 2006). O preparo do PRP implica em duas centrifugações, inicialmente do sangue total e em seguida da fração do plasma obtido. O plasma pobre em plaquetas é descartado e o sedimento de plaquetas (e leucócitos) é suspenso em um pequeno volume de plasma para produzir PRP (TEXTOR, 2011).

Na medicina equina o PRP vem sendo utilizado tanto na forma de gel (ativado com trombina) para o tratamento de feridas cutâneas (CARTER et al., 2003), como na forma líquida, para o tratamento de tendinites (BOSCH et al., 2011; MAIA et al., 2009), osteoartrites (CARMONA et al., 2007) e laminite (CARMONA et al., 2012), através de uma ou mais aplicações no local da lesão.

Quando o protocolo de tratamento envolve várias aplicações locais para obter o efeito desejado, o PRP deve ser preparado no momento de cada aplicação, o que demanda tempo e equipamentos disponíveis.

Uma alternativa seria armazenar o PRP equino para futuras aplicações. Na medicina humana, os concentrados de plaquetas são armazenados nos bancos de sangue à temperatura ambiente, com agitação contínua, por no máximo cinco dias, devido à baixa viabilidade das plaquetas e ao risco de contaminação bacteriana (SCHOENFELD et al., 2006). Este período de armazenamento poderia ser prolongado através da criopreservação. No entanto, quando armazenadas a baixas temperaturas, as plaquetas sofrem mudanças da forma discóide para esférica com emissão de múltiplos pseudópodes, com subsequente fusão e secreção dos grânulos alfa, densos e lisossomais, processo que mimetiza a ativação fisiológica e após o qual elas apresentam efeito clínico mínimo (TABLIN et al., 2001).

A criopreservação de concentrados de plaquetas utilizando 5% ou 6% de DMSO atualmente é considerada a melhor maneira de armazenar plaquetas humanas (LEE & BLAJCHMAN, 2007). O concentrado de plaquetas pode ser armazenado por mais de três anos, utilizando DMSO a 5% como crioprotetor e congelamento em vapor de nitrogênio

líquido (-150°C), sem perda da função hemostática (DALY et al., 1979). Melaragno et al. (1985) relataram o sucesso na transfusão de plaquetas (em pacientes humanos) armazenadas por mais de dois anos, congeladas em freezer a -80°C e utilizando DMSO a 6% como crioprotetor.

Visando a praticidade e amplificação do uso do PRP no tratamento de diversas lesões de equinos, o objetivo deste estudo foi avaliar o congelamento em freezer mecânico, a -80°C, utilizando DMSO a 6% como crioprotetor, como método de armazenar o PRP equino sem perda de sua função.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plaquetas

As plaquetas são corpúsculos anucleados, com a forma de disco, medindo cerca de 2 a 4µm de diâmetro, derivados de células gigantes e multinucleadas da medula óssea, os megacariócitos. Esses corpúsculos desempenham importante papel na coagulação do sangue e sobrevivem por aproximadamente 10 dias na circulação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Em equinos, a concentração plaquetária varia de 100 a 350 x 10³/µl, com volume plaquetário médio variando de 4,3 a 5,6 fentolitros (fL). Nesta espécie elas possuem forma redonda, ovalada ou alongada, medindo de 2,5 a 3,5µm de diâmetro, apresentando pseudópodes quando ativadas (WEISS & WARDROP, 2010).

2.1.1 Estrutura e ativação plaquetária

Estruturalmente as plaquetas possuem um anel de microtúbulos contráteis (citoesqueleto) ao redor de sua periferia, que contém actina e miosina (EVERTS et al., 2006). A actina é a principal proteína, correspondendo a 15-20% do total de proteínas plaquetárias (BLOCKMANS et al., 1995). Este citoesqueleto é responsável por estabilizar a camada bilipídica da membrana plasmática e manter a forma discóide das plaquetas inativas (BLOCKMANS et al., 1995). A membrana plasmática apresenta fosfolipídios dispostos de forma assimétrica na camada bilipídica (LANDI, 2004). Ela se estende através dos canais do sistema canalicular aberto (SCA), aumentando a área de superfície da plaqueta. É através da camada bilipídica que as glicoproteínas intrínsecas são exteriorizadas, servindo como receptores para agentes ativadores ou inibidores (BLOCKMANS et al., 1995).

Os principais componentes do citosol plaquetário são as mitocôndrias, sistema tubular denso (STD), SCA, glicogênio, lisossomos, peroxissomos e grânulos alfa e grânulos densos

(HARRISON & CRAMER, 1993; BLOCKMANS et al., 1995). O STD equivale ao retículo endoplasmático de outras células; é o reservatório do cálcio e de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandina. Ele encontra-se em estreito contato com os canais do SCA, formando uma membrana complexa (BLOCKMANS et al., 1995). Os grânulos alfa contêm os fatores de coagulação, de crescimento e outras proteínas, enquanto que os densos contêm adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio (EVERTS et al., 2006).

Na circulação, as plaquetas se encontram em estado inativo, pois estão em contato com substâncias produzidas pelo endotélio vascular que exercem efeito inibitório sobre a ativação plaquetária, como as prostaciclina e o óxido nítrico, que bloqueiam a liberação de cálcio (LANDI, 2004). A ativação plaquetária pode ocorrer tanto por agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) como farmacológicos (ionóforos de cálcio, análogos de endoperóxido cíclico), que exercem seu efeito através da interação com receptores localizados na membrana plaquetária (BLOCKMANS et al., 1995).

Uma vez ativadas, ocorre liberação de cálcio do STD que leva à polimerização da actina do citoesqueleto, promovendo a mudança da forma discóide para a esférica e a formação de pseudópodes, que promovem agregação plaquetária e subsequente liberação do conteúdo granular (LANDI, 2004) (Figura 1). O conteúdo granular é liberado através de dois mecanismos distintos: via fusão com o SCA e subsequente extrusão do seu conteúdo através de pequenos canais na membrana plasmática ou por exocitose, ou seja, por fusão direta dos grânulos alfa com a membrana plasmática (ZANDIM et al., 2012).

Paes Leme et al. (2006) avaliaram a ativação de plaquetas de equinos após a indução da laminite. Eles observaram que plaquetas equinas são maiores do que as humanas e evidenciaram a ausência do SCA, o que explicaria o fato de plaquetas equinas serem menos sensíveis à indução da agregação pelo ADP. O resultado mais comum nas plaquetas ativadas foi a emissão de pseudópodes, mas as plaquetas apresentaram também mudança de forma, alteração da relação entre os eixos maior e menor e diminuição do tamanho dos grânulos, que pode ser explicada pela secreção do conteúdo armazenado. Não foram observadas lises celulares ou plaquetas consideradas em estado irreversível de ativação (Figura 2).

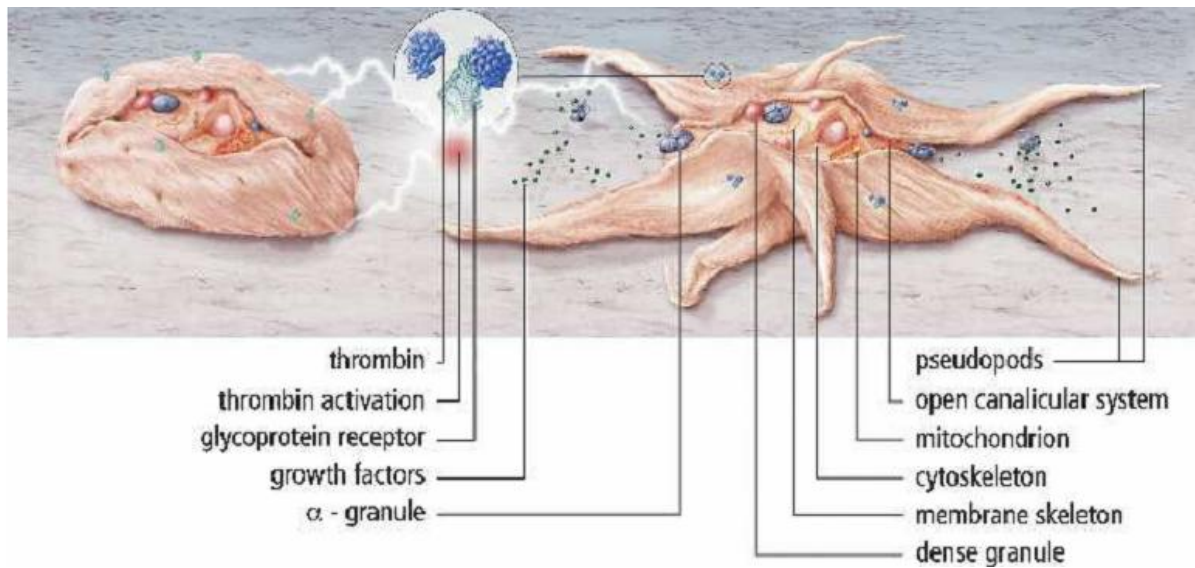


Figura 1 - Ativação plaquetária e liberação dos fatores de crescimento após estímulo por agonista.

Fonte: EVERTS et al. (2006).

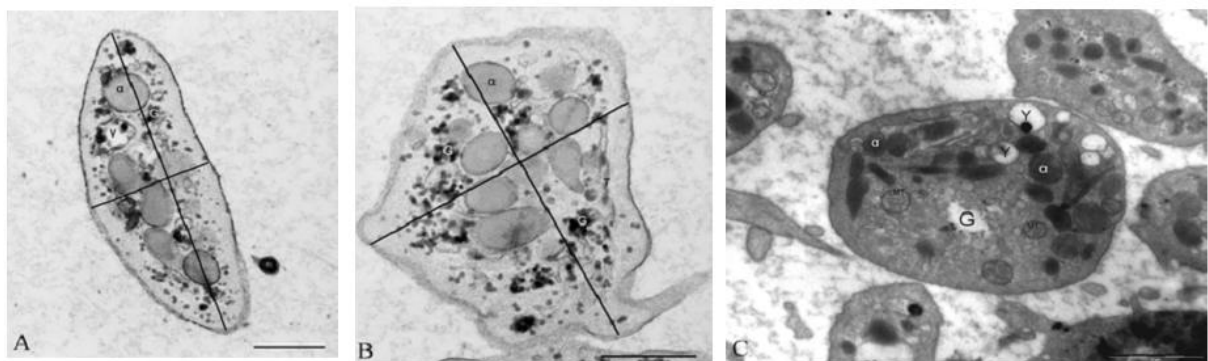


Figura 2 - Fotografia ultra-estrutural, mostrando a medida dos eixos maior e menor de plaquetas normais (A), ativadas (B) e estado incerto (C). Y = gama grânulos, α = alfa grânulos, MT= mitocôndria, G= grânulos de glicogênio ou área onde se encontrariam. Em A e B a barra representa 200nm. Em C a barra representa 1µm.

Fonte: PAES LEME et al., 2006.

2.1.2 Função plaquetária

As plaquetas desempenham papel importante na hemostasia, bem como nos processos inflamatórios e de cicatrização (SEGURA et al., 2006). Quando existem poucas plaquetas ou estas estão afuncionais, pode se instalar um quadro hemorrágico. Por outro lado, o excesso de

ativação plaquetária leva a quadros tromboembólicos (BLOCKMANS et al., 1995). Após ocorrer a lesão, as reações mais importantes que levam à coagulação imediata são mediadas pelas plaquetas e por mudanças na parede vascular (EVERTS et al., 2006). Os processos que levam à coagulação incluem adesão plaquetária, agregação, liberação do conteúdo granular e formação de superfície pró-coagulante. Quando os agentes agonistas se ligam aos receptores plaquetários, eles induzem alterações nas glicoproteínas da membrana que permitem a ligação de proteínas que mediam a adesão e agregação plaquetária. Por sua vez, a ligação destas proteínas que promovem a adesão resulta em eventos que promovem e intensificam a liberação do conteúdo granular, agregação plaquetária, formação de fibrina e retração do coágulo (WEISS & WARDROP, 2010). Os principais agentes indutores da agregação plaquetária e liberação do conteúdo granular são o tromboxano A₂, ADP e trombina. Através destes três mecanismos, o tampão plaquetário é formado na tentativa de cessar a perda sanguínea, ativando em seguida o sistema de coagulação. A hemostasia secundária é ativada através dos fatores de coagulação e a formação de uma rede de fibrina que estabiliza o tampão plaquetário. Por fim, os leucócitos liberam citocinas na área afetada, que ativam a fibrinólise, levando à retração do coágulo (EVERTS et al., 2006).

O processo de cicatrização se inicia com a formação do tampão plaquetário, ativação da cascata de coagulação e liberação do conteúdo granular das plaquetas, com consequente liberação dos fatores de crescimento (EVERTS et al., 2006). A liberação de proteínas oriundas dos grânulos alfa plaquetários no local da lesão promove o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas, iniciando o processo inflamatório, bem como promovendo a angiogênese, que resulta em neovascularização e formação de um novo tecido conjuntivo, necessário à cicatrização (ZANDIM et al., 2012). Resumidamente, os fatores de crescimento provenientes dos grânulos alfa produzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição da matriz extracelular (EVERTS et al., 2006). A figura 3 demonstra resumidamente como as plaquetas atuam no processo de cicatrização tecidual.

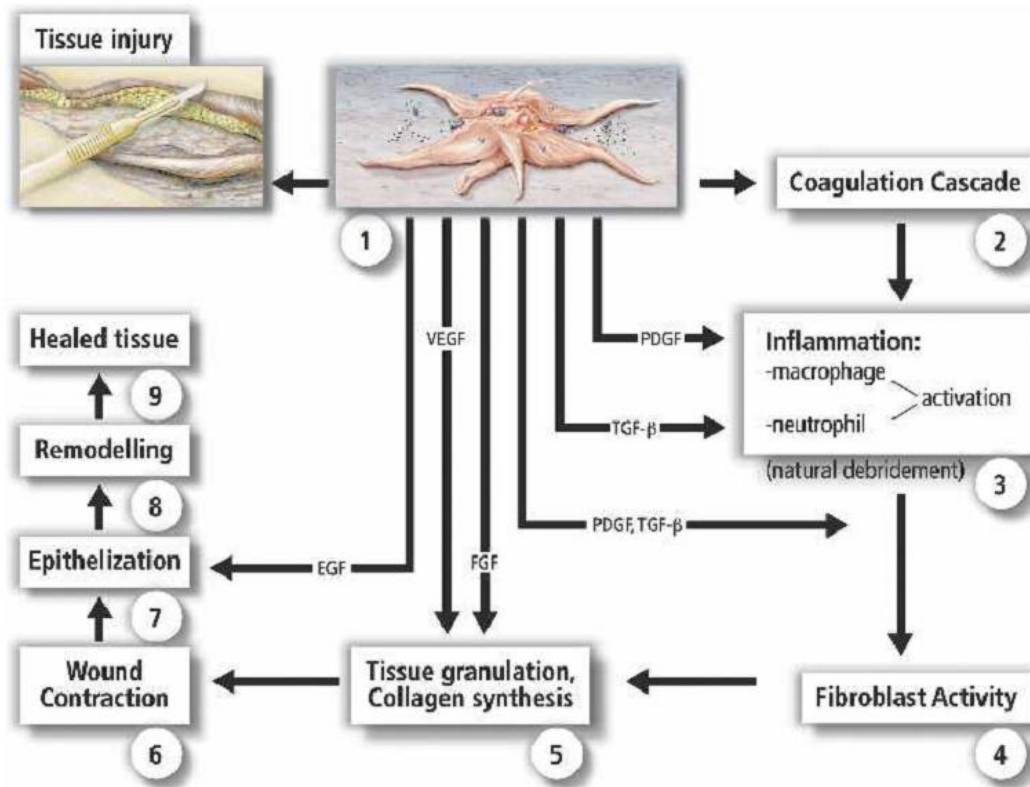


Figura 3 - Funções dos fatores de crescimento derivados das plaquetas. Os números indicam a sequência de ações durante as diferentes etapas do processo de cicatrização das feridas. Fonte: EVERTS et al. (2006).

2.2 Plasma rico em plaquetas (PRP):

Segundo Gonshor (2002), para ser considerado PRP, o produto deve conter três a cinco vezes mais plaquetas do que o sangue total. Ou mais especificamente, o plasma rico em plaquetas (PRP) é definido como um volume de plasma que contém um número de plaquetas superior ao observado no sangue total e apresenta em sua composição plaquetas, fatores de crescimento, proteínas plasmáticas e algumas hemácias e leucócitos, pois o processo de concentração das plaquetas no plasma não elimina totalmente as outras células sanguíneas (TEXTOR, 2011). Ele é uma fonte autógena de fácil aquisição e de baixo custo, que contém diversos fatores de crescimento importantes na reparação tecidual (MAIA, 2008).

Em humanos, a concentração plaquetária que define o PRP é de $1000 \times 10^3/\mu\text{l}$ (MARX, 2004), mas de acordo com Anitua et al. (2004), concentrações acima de 300.000

plaquetas/ μ l são suficientes para o preparo do PRP. Em equinos, Schnabel et al. (2007) observaram efeito anabólico sobre a síntese de matriz tendínea após a utilização de PRP contendo 395.000 plaquetas/ μ l.

2.2.1 Fatores de crescimento:

O PRP contém diversos fatores de crescimento (FC) que são peptídeos sinalizadores importantes na reparação tecidual, pois promovem diferenciação, quimiotaxia e induzem a migração de várias células, além de promover a síntese da matriz extracelular (ANITUA et al., 2004; EVERTS et al., 2006).

Quando ativadas, as plaquetas sofrem degranulação e liberam as seguintes substâncias: fibrinogênio, fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento de transformação alfa (TGF- α), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), tromboplastina, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (HARRISON & CRAMER, 1993). Além destes, o fator de crescimento fibroblástico (FGF) também é encontrado nas plaquetas (EVERTS et al., 2006).

Os fatores de crescimento podem ser classificados em dois grupos: morfométricos e mitogênicos. Os morfométricos estão envolvidos no crescimento ósseo através da transformação de células-tronco mesenquimais multipotentes em células osteoprogenitoras na presença da proteína óssea morfogênica (BMPs) (HOCK & CANALIS, 1994). Já os fatores de crescimento mitogênico estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese.

O conteúdo dos grânulos alfa plaquetários é liberado somente quando ocorre a ativação plaquetária, e não é secretado constantemente. Os fatores de crescimento contidos nas plaquetas são produzidos pelos megacariócitos e uma quantidade determinada é distribuída entre os grânulos alfa plaquetários, sendo o PDGF e TGF- β os fatores de crescimento predominantes nas plaquetas (TEXTOR, 2011).

O PDGF, além de estar presente nos grânulos alfa plaquetários, também é sintetizado por macrófagos e pelo endotélio. Suas principais funções incluem mitogênese, angiogênese e ativação de macrófagos. Ele também promove a regeneração da derme, através da síntese protéica e de colágeno (ROSS, 1987) e induz a expressão de TGF- β (PIERCE et al., 1989). O

TGF- β é particularmente importante porque uma vez ativado, afeta muitos aspectos da reparação tecidual, incluindo o início e o término do processo (CARTER et al., 2003). É encontrado principalmente nas plaquetas (95%), mas uma pequena quantidade pode ser observada nos macrófagos, em forma latente. Entre as funções do TGF- β , está a quimiotaxia e mitogênese de fibroblastos e células precursoras de osteoblastos (EVERTS et al., 2006). As principais funções dos diferentes fatores de crescimento encontrados nas plaquetas se encontram descritas na tabela 1.

De acordo com Marx (2004) e Pietrzak e Eppley (2005), os fatores de crescimento são ativamente secretados dos grânulos alfa durante os primeiros 10 minutos após ocorrer a ativação plaquetária e mais de 95% de fatores pré-sintetizados são liberados na primeira hora (KEVY & JACOBSON, 2001). Por isso, o uso imediato do PRP após o seu preparo é recomendado, sendo de oito horas o tempo máximo para a sua utilização (MARX, 2004).

Tabela 1 - Fonte e função dos fatores de crescimento (FC) contidos nos grânulos plaquetários alfa.

FC	Fonte	Função	Referência
TGF- β	Plaquetas, matriz óssea e cartilaginosa, linfócitos T (Th1) ativados, macrófagos, monócitos e neutrófilos.	Pertence a uma superfamília que inclui: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Estimula a proliferação de céls. mesenquimais indiferenciadas; estimula quimiotaxia endotelial e angiogênese; regula o efeito mitogênico de outros FC. O TGF- β 1 é o mais importante sendo responsável pela maturação celular, migração fibroblástica e síntese de matriz extracelular. Existe um leve antagonismo entre o TGF- β e o PDGF.	PIERCE et al. (1991); BAMES et al. (1999); MARSOLAIS & FRENETTE (2005); VILELLA (2007).
PDGF	Plaquetas, osteoblastos, céls. endoteliais, macrófagos, monócitos e céls. musculares lisas.	Mitogênico para céls. mesenquimais, osteoblastos, céls. do tecido conjuntivo e fibroblastos, estimula a quimiotaxia de fibroblastos,	PIERCE et al. (1991) FRIESEL & MACIAG (1995); PONTUAL & MAGINI (2003)

			macrófagos e neutrófilos, regula síntese de colágeno.	
IGF-I	Plaquetas		Mitogênico para céls. da linhagem osteoblástica, acelera a osteogênese quando combinado com o TGF- β ou PDGF.	GIANNOBILE (1999).
FGF	Plaquetas, mesenquimais, macrófagos, condrócitos e osteoblastos.	céls. e	Promove o crescimento e diferenciação dos condrócitos e osteoblastos; é mitogênico para céls. mesenquimais, condrócitos e osteoblastos.	ROSIER et al. (1998).
EGF	Plaquetas, macrófagos e monócitos.		Estimula a quimiotaxia e angiogênese endotelial; estimula a mitogênese epitelial; regula síntese de collagenase.	CANALIS et al. (1989); STEENFOS, (1994).
VEGF	Plaquetas e endoteliais.	céls.	Aumenta a angiogênese e permeabilidade vascular; estimula a mitogênese de céls. endoteliais.	MARTIN et al. (1992); MARSOLAIS & FRENETTE (2005);
CTGF	Endocitose por plaqueta na medula óssea		Promove angiogênese; regeneração da cartilagem; fibrose e adesão plaquetária.	HOM & MAISEL (1992); KUBOTA et al. (2004).

Fonte: Modificado a partir de Everts et al. (2006).

2.2.2 Métodos de preparo do PRP

Diferentes técnicas são empregadas no preparo do PRP. Convencionalmente o PRP é preparado através de duas centrifugações: inicialmente do sangue total e em seguida da fração plasmática obtida. O plasma pobre em plaquetas é descartado e a fração remanescente de plaquetas (e leucócitos) sedimentada é ressuspensa em um pequeno volume de plasma. O PRP pode então ser obtido utilizando-se tubos e centrífugas laboratoriais, com transferência manual do produto entre as centrifugações ou através de sistemas automatizados (TEXTOR, 2011).

Anitua (1999) relatou um método muito simples para a obtenção do PRP, conhecido como “plaquetas ricas em fatores de crescimento” (PRGF). A coleta de sangue é realizada em tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante. O sangue total é centrifugado e após a primeira centrifugação, se observam três camadas distintas: a camada superior corresponde ao plasma, que contém as plaquetas; uma camada visível de leucócitos, a camada flogística, que se localiza adjacente ao plasma; e a última camada, que corresponde aos eritrócitos. É um método bastante fácil e rápido, mas que necessita muita atenção para manter a esterilidade do produto.

Outra maneira de se preparar o PRP é através da aférese, um procedimento totalmente automatizado. No entanto, esta técnica requer alta tecnologia e treinamento, além de uma grande quantidade de sangue (>450ml). A vantagem desta técnica é o baixo risco de contaminação bacteriana, além de uma maior concentração plaquetária em relação ao método do tubo (MARX et al., 1998).

Existem ainda métodos semi-automatizados, que possuem vantagens sobre ambos os métodos anteriores. Eles são capazes de concentrar uma maior quantidade de plaquetas e fatores de crescimento, e também podem ser utilizados em pequenas clínicas, pois não necessitam de grande volume de sangue. Além disso, o risco de contaminação é muito inferior ao método manual. Por outro lado, estes métodos concentram uma grande quantidade de leucócitos e possuem preço elevado para sua aquisição (CARMONA, 2006).

Outra maneira de se utilizar o PRP é na forma de gel. Whitman et al. (1997) e Marx et al. (1998) utilizaram o PRP gel no tratamento de lesões maxilofaciais. O PRP foi preparado a partir de 450ml de sangue, pelo método da aférese, e foi ativado com trombina bovina e cloreto de cálcio 10% para adquirir a forma de gel.

Na medicina veterinária, o método de preparo do PRP é baseado naqueles utilizados na medicina humana. O PRP pode ser preparado através da coleta de sangue em tubos ou bolsas de coleta contendo citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante, seguido de centrifugação e ativação do PRP (CARTER et al., 2003; CARMONA, 2006; CARMONA et al., 2007). Normalmente são realizadas duas centrifugações no preparo do PRP, sendo que a segunda possui velocidade de rotação superior à primeira (ASPENBERG & VIRCHENKO, 2004; CARMONA et al., 2007).

Pereira (2012) avaliou sete protocolos utilizados na medicina humana e veterinária para a obtenção de PRP. A tabela 2 detalha os sete protocolos. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os protocolos quanto à concentração plaquetária e

os fatores de crescimento, mas os protocolos IV, V e VI apresentaram menor contaminação de hemácias e leucócitos, sendo mais indicados para a obtenção do PRP em equinos.

Tabela 2 - Força e tempo de centrifugação dos protocolos usados para obtenção de PRP.

Protocolos	Primeira centrifugação		Segunda centrifugação	
	Força (g)	Tempo (min)	Força (g)	Tempo (min)
I	120	5	240	5
II	120	10	240	10
III	300	10	640	10
IV	400	10	800	10
V	224	10	440	10
VI	113	10	652	5
VII	120	5	473	5

Protocolos: I - CARMONA (2006); II – CARMONA (2006) modificado; III – VENDRAMIN et al. (2006); IV – VENDRAMIN et al. (2009); V – PEREIRA (2012); VI – PEREIRA (2012); VII – MAIA (2008).
Fonte: adaptado de PEREIRA (2012).

2.2.3 Utilização do PRP na medicina humana

O primeiro uso clínico do PRP foi descrito por Marx et al. em 1998. Ele utilizou o PRP associado ao enxerto ósseo esponjoso na reconstrução de grandes defeitos mandibulares em humanos, e observou que o grupo tratado apresentou significativa melhora radiográfica e histológica em termos de densidade óssea (MARX et al., 1998). Desde então, o PRP passou a ser utilizado com frequência em cirurgia oral em humanos. Anitua (1999) utilizou PRP no tratamento de 20 pacientes submetidos à extração dentária para futura colocação de implantes. Com o tratamento, ele observou regeneração óssea e de tecidos moles mais rápida bem como a ausência de risco de infecção e transmissão de doenças, por ser autógeno.

Pouco tempo depois, relatos apontaram que o PRP produz significativa melhora na cicatrização de feridas em humanos. Herouy et al. (2000) utilizaram o PRP no tratamento de feridas ulcerativas de pele em pacientes diabéticos, que apresentavam grande dificuldade de cicatrização. O PRP também vem sendo usado como adjuvante em cirurgias plásticas e reconstrutivas (BHANOT & ALEX, 2002; POWELL et al., 2001). Cirurgiões plásticos observaram que o PRP possui propriedades antiinflamatórias, bactericidas, regenerativas e hemostáticas (ANITUA et al., 2004).

O PRP também vem sendo utilizado em cirurgias ortopédicas, como fusão de vértebras lombares (LOWERY, 1999), combinado com células mesenquimais na cicatrização de fraturas complicadas (KITOH et al., 2004), na substituição total de uma articulação (ANITUA, 2004), correção de defeitos osteocondrais por artroscopia (SÁNCHEZ et al., 2003). Sánchez et al. (2012) recentemente utilizaram aplicações intra-articulares de PRP no tratamento da osteoartrite coxofemoral em 40 pacientes. Após seis meses, 30% dos pacientes relataram diminuição na intensidade da dor.

Mishra e Pavelko (2006) utilizaram o PRP no tratamento da tendinite crônica em 140 pacientes, observando que o tratamento local com PRP reduz a dor e pode ser uma alternativa terapêutica antes da intervenção cirúrgica. Anitua et al., (2007) trataram com PRP pacientes humanos com ruptura do tendão de Aquiles. Neste estudo atletas tratados com cirurgia e PRP foram comparados com um grupo controle tratado apenas com cirurgia. Os autores observaram que os pacientes tratados com cirurgia e PRP recuperaram a amplitude de movimento e voltaram mais rapidamente para suas atividades atléticas do que o grupo tratado apenas com cirurgia. Ao exame ultrassonográfico foi observada redução da área transversal dos tendões tratados com PRP.

2.2.4 Utilização do PRP na medicina equina

Em equinos, o PRP é utilizado para o tratamento de diferentes tipos de lesões. Carter et al. (2003) utilizaram PRP na forma de gel ativado com trombina para o tratamento de feridas de pele em membros e observaram que o PRP acelerou a diferenciação epitelial e produziu tecido com fibras de colágeno organizadas e entrelaçadas.

No tratamento de tendinites e desmites, a aplicação intra-lesional do PRP promove redução na intensidade da claudicação e melhora na imagem ultrassonográfica das estruturas

envolvidas (ARGÜELLES et al., 2005). Em estudo realizado com cinco eqüinos, dois acometidos com tendinite aguda do tendão digital flexor superficial e três com desmíte proximal do ligamento suspensório, Argüelles et al. (2008) observaram melhora clínica em todos os animais após tratamento intra-lesional com PRP. No entanto, apenas os animais que apresentavam tendinite apresentaram melhora ultrassonográfica. Maia et al. (2009) induziu a tendinite através de colagenase em ambos os membros anteriores de seis eqüinos e realizou tratamento com PRP ou solução salina. Após avaliação histológica, ele observou que o grupo tratado com PRP apresentava o tendão flexor digital superficial mais organizado, com fibras de colágeno e fibroblastos melhor arranjados na matriz tendínea.

No tratamento de osteoartrite em quatro equinos, Carmona et al. (2007) utilizaram PRP intra-articular como único tratamento, realizando três aplicações com intervalos de 14 dias. Eles observaram melhora no grau de claudicação e redução da efusão articular dois meses após o último tratamento. Nenhum efeito adverso foi observado com a utilização do PRP intra-articular. No entanto, o estudo não contou com um grupo controle. Carmona e López (2011) utilizaram PRP para o tratamento de um eqüino com fratura da tuberosidade supraglenóide da escápula e do tubérculo menor do úmero com ruptura e hematoma do bíceps braquial, bursite bicipital e dano no nervo supra-escapular, devido a um trauma. Eles fizeram três aplicações intra-lesionais de PRP, com intervalos de 14 dias. Após 10 meses do tratamento, o eqüino estava completamente recuperado, o que indica que o PRP tem efeito terapêutico no tratamento de fraturas e lesões de tecidos moles em equinos, uma vez que animais com este tipo de lesão levam em torno de 18 a 24 meses para se recuperarem.

Yámada et al. (2011) avaliaram a eficácia do tratamento com células tronco mesenquimais (CTM) e PRP, em lesões condrais experimentalmente induzidas. Nos grupos tratados com PRP e CTM observaram preenchimento completo da lesão condral por uma quantidade satisfatória de tecido cicatricial de aspecto fibroso que se apresentava bem aderido às bordas da lesão. O grupo controle apresentou falhas no preenchimento, tecido cicatricial friável e pouco aderido, erosões da cartilagem articular ao redor da lesão.

Mais recentemente, Carmona et al. (2012) trataram uma égua com laminite secundária à doença de Cushing com injeções de PRP ao longo da banda coronária. Foram realizadas três aplicações, com intervalo de 10 dias entre as aplicações. O tratamento produziu rápido crescimento dos cascos (aproximadamente 5mm/semana) e diminuiu consideravelmente a claudicação após duas aplicações de PRP, indicando que o PRP pode ser utilizado como tratamento auxiliar nos casos de laminite. Cabe salientar que este estudo também não contou com a presença de um grupo controle.

2.3 Criopreservação de plaquetas

O aumento da demanda pela transfusão plaquetária gerou a necessidade de se estabelecer padrões para determinar a qualidade das plaquetas durante o armazenamento. Alterações deletérias na estrutura e função plaquetárias, denominadas “lesões plaquetárias de armazenamento”, restringem a vida útil das plaquetas a cinco dias (SHRIVASTAVA, 2009).

Após este período, as plaquetas armazenadas nos bancos de sangue são descartadas. Elas não podem ser armazenadas a baixas temperaturas sem sofrerem processo de ativação e, por isso, são armazenadas em temperatura acima de 20°C. A contaminação bacteriana frequentemente ocorre e o choque séptico devido à transfusão de plaquetas contaminadas continua a ser um sério problema clínico (TABLIN et al., 2001). Isto gera um grande custo e desperdício para os bancos de sangue, uma vez que as plaquetas são frequentemente descartadas.

Por este motivo, ao longo dos anos, diversos estudos buscando um método eficaz de armazenar plaquetas vêm sendo realizados, principalmente através da criopreservação.

2.3.1 Lesões plaquetárias de armazenamento

As lesões plaquetárias de armazenamento, correlacionadas com reduzida recuperação *in vivo* e capacidade hemostática após transfusão, são caracterizadas essencialmente por evidências morfológicas e moleculares de ativação plaquetária e consumo de energia no meio. Elas são grandemente influenciadas por fatores como duração do armazenamento, temperatura, número de plaquetas em relação ao volume do meio, composição da solução de armazenamento e permeabilidade gasosa do recipiente de armazenamento (OHTO & NOLLET, 2011).

O armazenamento resulta em ativação parcial e alguma perda de função metabólica. Plaquetas armazenadas perdem gradualmente sua capacidade de agregação e a capacidade de adesão é similarmente comprometida, conforme avaliado por testes *in vitro* (SHRIVASTAVA, 2009).

As alterações plaquetárias de armazenamento se iniciam no momento da coleta de sangue e continuam progressivamente durante a preparação do produto requerido e o

armazenamento. Entre as lesões observadas estão o desenvolvimento de formas anormais, perda da forma discóide, redução no volume plaquetário médio, aumento de volume e densidade heterogênea, aumento na liberação de conteúdo dos grânulos alfa e proteínas citosólicas, atividade pró-coagulante aumentada e expressão alterada das glicoproteínas, todas relacionadas com ativação plaquetária (SHRIVASTAVA, 2009).

O primeiro local de aparecimento de lesões decorrentes da biopreservação são as membranas (STOLL & WOLKERS, 2011). Durante o resfriamento, as membranas passam do estado líquido para o estado gelatinoso, resultando em menor capacidade de reorganização de sua estrutura e perda da integridade (REID et al., 1999). Outra possibilidade considera que a porção polar dos fosfolípidios de membrana é hidratada e, durante o congelamento, ocorra desidratação celular o que provoca um aumento na densidade dessa estrutura. Durante o processo de rehidratação, essas membranas se tornam transitariamente permeáveis, permitindo a liberação das substâncias contidas no seu interior e a lise osmótica das plaquetas (CROWE et al., 1998). Tsvetkova et al. (2000) demonstraram a correlação entre a separação da camada lipídica da membrana com a ativação plaquetária durante o congelamento. Eles observaram que o armazenamento de plaquetas eqüinas a 4°C por mais de 24 horas resultou em múltiplas fases de transição, provavelmente devido à separação da camada lipídica. Acredita-se que a ativação não ocorra exclusivamente pela estimulação de receptores da superfície, mas seja secundária à lesão mecânica das membranas citoplasmáticas e do sistema tubular denso, promovendo a abertura dos canais (REID et al., 1999).

A exposição das plaquetas às baixas temperaturas causa alteração da morfologia discóide para esférica e aparecimento de pseudópodes. As alterações estruturais que ocorrem no citoesqueleto são principalmente causadas pela formação de microvesículas, mediada pela calpalina, uma protease dependente de cálcio que degrada proteínas da membrana plasmática como a actina, que corresponde a 15-20% do total das proteínas da membrana (WIEDMER et al., 1990).

Segundo Böck et al. (1995), a criopreservação gera um aumento no volume plaquetário médio, o que foi também observado por Landi (2004). Mas segundo Ohto e Nollet (2011), tanto a diminuição quanto o aumento do VPM são sinais indicativos de lesão plaquetária. Primeiramente ocorre diminuição do VPM, devido à fragmentação ou formação de micro partículas e posteriormente ocorre aumento, decorrente do aumento de volume das células.

Um dos principais marcadores de ativação plaquetária em humanos é a p-selectina, que pode ser avaliada através da citometria de fluxo. A p-selectina está presente nos grânulos

alfa das plaquetas e atua como receptor de superfície capaz de mediar a interação das plaquetas com neutrófilos e monócitos (HAMBURGER & McEVER, 1990). Ela é um marcador bastante sensível, que aumenta gradualmente com a ocorrência de ativação (RINDER et al., 1991; HOLME et al., 1997). O aumento da expressão de p-selectina durante o armazenamento das plaquetas humanas é relatado por diversos autores (RINDER et al., 1993; HOLME et al., 1997; TURNER et al., 2005). Entretanto, a avaliação da p-selectina como marcador da ativação plaquetária é controversa em equinos. Segura et al. (2006) demonstraram um aumento de 2,12% para 15,5% de plaquetas positivas para a p-selectina após a ativação pela trombina, concluindo que a avaliação da p-selectina por citometria de fluxo é um método eficaz para avaliar a ativação plaquetária em equinos. Mas segundo Lalko et al. (2003) a p-selectina é expressa naturalmente em 20-25% das plaquetas equinas, sem que seja necessária a ocorrência de ativação.

Entre as alterações bioquímicas observadas, está a redução no pH. Durante o armazenamento, a dificuldade nas trocas gasosas (relacionada à hiperconcentração plaquetária no meio) leva a um metabolismo anaeróbico predominante. A glicólise leva a aumento na produção de lactato e conseqüente queda no pH (MURPHY, 1985). Segundo Dumont et al. (2002), a ocorrência de ativação plaquetária em humanos torna-se evidente quando o pH dos concentrados de plaquetas for inferior a 6,4.

2.3.2 Criopreservação de concentrados de plaquetas em humanos

As transfusões de concentrados de plaquetas são muito empregadas na medicina humana. No início de sua utilização, estes concentrados eram armazenados em geladeira, a 4°C. No entanto, o armazenamento nestas condições implicava na redução da viabilidade e ativação plaquetária, ocasionando baixos incrementos plaquetários após a transfusão. (BALDINI et al., 1960; WOLF, 1967).

Murphy e Gardner (1969) compararam plaquetas armazenadas a 4°C com plaquetas estocadas a 22°C, sob agitação contínua, quanto à recuperação plaquetária após a transfusão. Eles observaram que o incremento plaquetário foi maior nas transfusões realizadas com concentrados de plaquetas armazenados a 22°C. Além dos bons resultados, a praticidade e o baixo custo fizeram com que o armazenamento de plaquetas a 22°C, sob agitação contínua, fosse adotado como método padrão pelos bancos de sangue (LANDI, 2004).

No entanto, plaquetas armazenadas a 22°C podem ser estocadas por um período máximo de cinco dias, pois acima disso é grande o risco de bacteremias e septicemias (HEAL et al., 1987; PUNSALANG et al., 1989). O aparecimento de lesões plaquetárias de armazenamento nas plaquetas estocadas a 22°C também é um motivo para o curto período de estocagem (SHRIVASTAVA, 2009), o que gera um grande desperdício para os bancos de sangue, pois concentrados de plaquetas são frequentemente descartados, apesar da alta demanda. Por este motivo, ao longo dos anos, a criopreservação vem sendo estudada como método de armazenar plaquetas humanas.

A primeira transfusão de concentrados de plaquetas criopreservados foi realizada há mais de cinquenta anos. Klein et al. (1956) observaram resultado positivo na correção de hemorragias transitórias após a transfusão de plaquetas congeladas a -15°C, por seis semanas, sem nenhum crioprotetor. Os agentes crioprotetores (como DMSO e glicerol) atuam sobre a permeabilidade da membrana plasmática das células, diminuindo a energia de ativação necessária para o transporte de água durante o processo de congelamento e atuando também sobre a formação de cristais de gelo no interior destas células e vitrificação (STOLL & WOLKERS, 2011).

Posteriormente, diversos crioprotetores foram avaliados, na tentativa de aumentar o incremento plaquetário pós-transfusão. Taylor (1981) comparou quatro agentes crioprotetores, sendo dois intracelulares (DMSO e glicerol) e dois extracelulares (hidroxietila de amido e dextrano). Os crioprotetores extracelulares se mostraram ineficazes na preservação de plaquetas, enquanto que o DMSO 5% foi o melhor crioprotetor.

Plaquetas humanas congeladas com DMSO sobrevivem e se mantêm funcionais após a transfusão. Este método de criopreservação aumenta a durabilidade das plaquetas por no mínimo um ano, mas requer processamento e lavagem dos concentrados de plaquetas antes da transfusão para remoção do DMSO, que é tóxico para o corpo humano (STOLL & WOLKERS, 2011). Essas sucessivas lavagens para remoção do crioprotetor acabam por promover ativação plaquetária (RINDER & AULT, 1998).

Na tentativa de reduzir o percentual de DMSO e eliminar a necessidade de remoção do crioprotetor dos concentrados de plaquetas, Currie et al. (1998) elaboraram uma solução criopreservante concentrada 50 vezes, designada de ThromboSol, composta por 0,25Mm de amilorida, 0,1Mm de adenosina, 50µM de nitroprussiato de sódio (inibidores das vias intracelulares da segunda transmissão) além de DMSO 2%. No entanto, a utilização do ThromboSol como crioprotetor apresentou resultados controversos. Landi (2004) comparou a criopreservação de concentrados de plaquetas com ThromboSol e com DMSO 5% e verificou

uma maior ocorrência de ativação e lise plaquetária nos concentrados criopreservados com ThromboSol. Na medicina veterinária, a utilização do ThromboSol também foi inferior ao DMSO 6% no congelamento de plaquetas de cães (APPLEMAN et al., 2009). A reduzida concentração de DMSO na composição do ThromboSol pode ser implicada na ocorrência de maior lise e de maior ativação plaquetária associada ao uso deste crioprotetor (LANDI, 2004).

Atualmente, o DMSO a 5% ou 6% é o melhor crioprotetor para plaquetas humanas (LEE & BLAJCHMAN, 2007). Plaquetas armazenadas a -80°C em DMSO 6% são viáveis por até dois anos, sem perda significativa de recuperação pós-transfusão (MELARAGNO et al., 1985), enquanto que plaquetas armazenadas a -150°C com DMSO 5% permanecem viáveis por até três anos (DALY et al., 1979). De modo geral, as técnicas empregadas na criopreservação dos concentrados de plaquetas utilizam DMSO na proporção final de 6%, congelamento não programado e estocagem em freezer mecânico a -80°C (VALERI et al., 1974) ou DMSO na proporção final de 5%, congelamento gradual de 1°C a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e estocagem em nitrogênio líquido (MURPHY et al., 1974). O descongelamento é realizado pela simples imersão em banho-maria, 37°C .

2.3.3 Métodos de avaliação da qualidade plaquetária após congelamento

Após o descongelamento das plaquetas, diversas técnicas podem ser empregadas para avaliar a viabilidade destes produtos. Na medicina humana, testes *in vivo* e *in vitro* visam prever a efetividade das plaquetas após uma transfusão. O estudo de Khuri et al. (1999) comprovou a efetividade das plaquetas criopreservadas no controle das hemorragias. Neste estudo *in vivo*, o efeito hemostático de concentrados de plaquetas armazenados de forma convencional foi comparado com criopreservadas no pós-operatório de cirurgias cardíacas. O grupo que recebeu plaquetas criopreservadas apresentou um menor volume de sangramento e menor consumo de hemocomponentes, sugerindo melhor efetividade hemostática.

Testes *in vitro* avaliam a morfologia plaquetária, características bioquímicas, secreção granular, glicoproteínas de superfície, formação de superfície pró-coagulante e a resposta funcional das plaquetas (LANDI, 2004) (Tabela 2).

Kunicki et al. (1975) avaliou a qualidade dos concentrados de plaquetas estocados à temperatura ambiente, através de avaliação morfológica pela microscopia de fase. Ele classificou estas estruturas conforme as alterações apresentadas em discóides, que mantiveram

a forma discóide das plaquetas frescas; esféricas, que sofreram alteração da forma; dendríticas, que apresentaram emissão de pseudópodes e balonadas, que estavam totalmente rompidas após o armazenamento.

Através da microscopia eletrônica, Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990), classificaram as plaquetas da seguinte forma: 0 – normal – ligeiramente oval, com organelas uniformemente dispersas no citoplasma; 1 – incerta – perfil arredondado, organelas não centralizadas; 2 – ativada – forma oval irregular com centralização de organelas e emissão de pseudópodes; 3 – com alteração irreversível – discóide com organelas na periferia; 4 – lise total – perda da arquitetura normal. A determinação do VPM também é uma forma de se avaliar a qualidade das plaquetas após o armazenamento, uma vez que segundo Böck (1995) e Landi (2004) ocorre um aumento no volume após o processo de congelamento.

Avaliações de pH, pCO₂ e pO₂, glicose e lactato podem determinar a qualidade dos concentrados de plaquetas. A diminuição do pH durante o armazenamento indica a ocorrência de glicólise. Um aumento na pCO₂ acarreta queda no pH, afetando diretamente a qualidade das plaquetas (MURPHY & GARDNER, 1975). Da mesma forma, a redução dos níveis de glicose e aumento nas concentrações de lactato pode resultar em uma rápida queda do pH, afetando a viabilidade plaquetária (MURPHY, 1985). Böck (1995) observou também que o processo de congelamento causa liberação de cálcio e potássio para o meio extracelular.

A citometria de fluxo, através da ligação a anticorpos monoclonais específicos, avalia a expressão de glicoproteínas de superfície (GPIb, GPIIb, GPIIIa) e marcadores da ativação plaquetária, como a p-selectina (THON et al., 2008).

A capacidade de agregação plaquetária é avaliada através de um agregômetro. O plasma rico em plaquetas é utilizado e a agregação se inicia através da utilização de diferentes agonistas, como o colágeno, trombina ou ADP. Comparando a resposta aos diferentes agonistas, defeitos plaquetários podem ser identificados (CARDIGAN et al., 2005).

Segura et al. (2006) utilizaram a avaliação morfológica através da microscopia eletrônica, citometria de fluxo e testes de agregação plaquetária para verificar a função de plaquetas equinas. Eles observaram que as plaquetas equinas, mantidas a 37°C, possuem a mesma forma discóide da plaqueta humana e que quando ativadas pela trombina, alteram sua forma e apresentaram fusão dos grânulos alfa com conseqüente liberação do conteúdo granular. Observaram também que as plaquetas respondem bem ao ADP e colágeno no teste de agregação, respondendo pouco ao ácido araquidônico e tromboxano e não respondendo à epinefrina ou ristocetina. Demonstraram ainda que a citometria de fluxo pode ser um método

eficaz de avaliar a ativação plaquetária em equinos, uma vez que houve um aumento na expressão de p-selectina e glicoproteínas de membrana após a ativação com agonistas.

Tabela 3 – Técnicas, *in vitro*, empregadas na avaliação dos concentrados de plaquetas.

	<i>TÉCNICAS</i>
Morfologia	Microscopia de contraste de fase: “score” morfológico, microscopia eletrônica, “swirling”, densidade óptica do plasma rico em plaquetas, volume plaquetário médio (VPM)
Bioquímica	pH, glicose, lactato, conteúdo de ADP, desidrogenase láctica (LDH)
Secreção granular	β -tromboglobulina, fator plaquetário 4 (PF4)
Receptores de superfície	Complexo GPIb (CD42), integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/61), p-selectina (CD62p), granulofisina (CD63)
Superfície pró-coagulante	Anexina V, fator V.
Métodos funcionais	Absorção de serotonina, agregação plaquetária, resposta ao estresse hipotônico, potencial de resposta após estimulação, modelos <i>ex-vivo</i> de hemostasia.

Fonte: LANDI, 2004

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

CRYOPRESERVATION PROTOCOL FOR PLATELET-RICH PLASMA

Liomara Andressa do Amaral Kwirant, Flávio Desessards De La Côte, Karin Erica

Brass, Mara Iolanda Batistella Rubin, Raqueli Terezinha França, Patrícia Soares

Vieira, Mariana Cocco

JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE, 2013.

CRYOPRESERVATION PROTOCOL FOR PLATELET-RICH PLASMA

Liomara Andressa do Amaral Kwirant^{a*} Flávio Desessards De La Côte^b Karin Erica

Brass^c Mara Iolanda Batistella Rubin^c Raqueli Terezinha França^d Patrícia Soares

Vieira^e Mariana Cocco^f

^a DVM, graduate student, Department of Large Animal Clinics, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Phone: 55 55 32208036 Fax: 55 55 32219902. Email: liomara_amaral@hotmail.com. *Corresponding author

^b DVM, PhD, Department of Large Animal Clinics, Federal University of Santa Maria.

^c DVM, Dr. med. vet. Department of Large Animal Clinics, Federal University of Santa Maria.

^d DVM, graduate student, Department of Small Animal Clinics, Federal University of Santa Maria.

^e Veterinary Practitioner, Santa Maria, RS, Brazil.

^f Undergraduate student, Federal University of Santa Maria.

Abstract

This study evaluated a platelet-rich plasma (PRP) cryopreservation protocol. PRP was obtained by centrifugation of whole blood collected from 8 adult healthy ponies. A fresh sample of PRP was analyzed for total platelet count, mean platelet volume (MPV) and platelet morphology (inactive, activated or uncertain state). Two other PRP samples were frozen at -80°C, one containing dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant and the other without DMSO. After 14 days the frozen samples were thawed and submitted to the same evaluation analysis. The fresh PRP showed a platelet count of $830 (\pm 95.27) \times 10^3/\mu\text{L}$, MPV $5.2 (\pm 0.07)$ fL and 4% activated platelets. There was no difference on platelet count, MPV and activated platelets between fresh and 6% DMSO frozen PRP samples ($617.9 \pm 65.49 \times 10^3/\mu\text{L}$; 5.3 ± 0.06 fL; 9.5%) ($p > 0.05$). On the other hand, the samples frozen without DMSO showed a significantly lower platelet count ($519.6 \pm 66.08 \times 10^3/\mu\text{L}$), higher MPV (5.7 ± 0.08 fL) and more activated platelets (13.87%) than in other groups ($p < 0.05$). 6% DMSO served as a good cryoprotectant for equine PRP storage at -80°C.

List of abbreviations

DMSO: dimethyl sulfoxide

MPV: mean platelet volume

PRP: platelet-rich plasma

Key-words: platelets, storage, equine, DMSO.

1. Introduction

Platelets play a role in hemostasis, wound healing and re-epithelization, releasing several growth factors contained in α -granules that stimulate angiogenesis, promoting vascular growth and fibroblast proliferation [1]. Found in blood stream in an inactive state, when activated, the platelets undergo a change in their morphology, emitting pseudopodia that promote platelet aggregation and subsequent release of granular contents [2].

Platelet-rich plasma (PRP) has been described as "a plasma volume that presents platelet count greater than that of whole blood" [3]. In horses PRP has been utilized in the treatment of different lesions. Carter *et al.* [4] applied PRP gel (activated with thrombin) in the treatment of experimental skin lesions in equine forelimbs and hindlimbs and observed that PRP gel-treated wounds showed an accelerated epithelial differentiation and produced a tissue with more organized and interlocked collagen bundles as from the second application. Maia *et al.* [5] used a single application of PRP in the treatment of experimental tendinitis and observed a more uniform and organized tissue repair than in the untreated control group, but emphasized the need for studies with a larger number of PRP applications be performed. In the treatment of musculoskeletal injuries or osteoarthritis, three PRP applications every 15 days resulted in a faster recovery or longer duration than that observed in animals not treated with PRP [6, 7]. There is no reference in the literature concerning the number of PRP applications needed to achieve cure of various musculoskeletal injuries.

Considering the need of a repeated PRP treatments and its practicality, outside the hospital environment, store PRP would be an interesting option. However, when cooled at temperatures below 20 °C, the platelets undergo severe injuries, including shape change from

discoid to spherical, pseudopodia, sharp rise in intracellular calcium and fusion and secretion of their dense, lysosomal and alpha granules, a process that mimics physiological activation [8]. On the other hand, when stored at room temperature platelets have a short shelf life. In blood banks, human platelets are stored at 22 ° C for a maximum time of five days, due to an increasing risk of bacterial contamination [9].

Over the years, several studies have been developed in order to increase the platelets shelf life, by storing. Freezing platelets in DMSO (5% or 6%) currently represents the standard for long-term platelets cryopreservation [10]. Platelets can be stored at – 80°C in 6% DMSO for up to 2 years without significant loss of recovery [11], whereas platelets frozen in 5% DMSO can be stored for 3 years at –150°C [12]. It is not known about the equine PRP cryopreservation. Therefore this study aimed to evaluate the efficacy of DMSO as cryoprotectant in equine PRP storage.

2. Materials and methods

2.1 PRP preparation

To obtain PRP, were used eight ponies (seven males and one female), clinically healthy, with a mean age of nine years and a mean weight of 200 kg. PRP was prepared according to the protocol developed by Pereira [13]. Whole blood (500 ml) was aseptically drawn from the jugular vein in a blood collection bag containing anticoagulants such as citrate, phosphate, dextrose and adenine (CPDA). A total of 100 ml blood was used and the remainder was discarded. Blood was divided into three polypropylene tubes (50 ml) and a 2 ml sample was sent for laboratory tests (complete blood count and platelet count).

Blood (100 ml) was centrifuged at 224g for 10 minutes. The plasma fraction was obtained and further centrifuged at 440g for 10 minutes to obtain PRP. From each 100 ml of blood, 10 ml of PRP were obtained and divided into three 2 ml aliquots, and stored in eppendorf tubes. One of these (fresh PRP) was sent for laboratory tests, the second one (6% DMSO PRP) for cryopreservation with 6% DMSO and the third one (frozen PRP) for cryopreservation without DMSO. The remaining PRP was dropped.

2.2 Laboratory tests

Laboratory tests were performed by a single clinical pathologist who was blinded to the groups. The tests consisted of platelet count, determination of MPV and platelet morphological evaluation. Platelet counting was performed in a Neubauer chamber [14] and the MPV was determined on an automated hematology analyzer (Mindray BC-2800Vet). Platelet morphology was assessed using a differential interference contrast microscope with a 40x phase objective [15]. Two hundred platelets were counted and categorized as activated (with pseudopodia), inactive (normal discoid shape) or uncertain state (spherical shape, without pseudopodia) [16].

2.3 PRP Cryopreservation

The cryopreservation protocol was performed according to the proposed by Valeri *et al.* [17]. By a 1ml syringe, samples to be cryopreserved (1.88 ml PRP) received DMSO (0.12 ml) slowly (1ml/minute), to reach a 6% DMSO concentration (6% DMSO PRP). Another PRP sample (2ml) was stored without DMSO (frozen PRP). The both aliquots were placed directly into a mechanical freezer at -80 ° C and were stored for 14 days.

After this period, all samples were thawed in a 37 ° C water bath for five minutes and 15 minutes post thawing they were subjected to the same laboratory tests described above.

2.4 Statistical Analysis

The results were analyzed using ANOVA and multiple comparisons of means by Tukey test. All analyzes were performed using Graphpad 5.0 software with a significance level of 5%. Data are presented as mean \pm standard error.

3. Results

3.1 Platelet count:

The mean number of platelets in whole blood was 167.8 (\pm 23.32) $\times 10^3/\mu\text{L}$. In fresh PRP, the mean number of platelets ($830 \pm 95.27 \times 10^3/\mu\text{L}$) did not differ from the number observed in 6% DMSO PRP ($617.9 \pm 65.49 \times 10^3/\mu\text{L}$) ($p > 0.05$), but was above the mean of platelets in frozen PRP ($519.6 \pm 66.08 \times 10^3/\mu\text{L}$) ($p < 0.05$). The platelet recovery after thawing was 74.45% and 62.6% in 6% DMSO PRP and frozen PRP, respectively.

3.2 MPV

The MPV observed in whole blood was 6.0 (\pm 0.1) fL. Among the samples cryopreserved, frozen PRP showed the highest volume (5.7 ± 0.08 fL), with no difference between fresh PRP (5.2 ± 0.07 fL) and 6% DMSO PRP (5.3 ± 0.06) ($p > 0.05$).

3.3 Platelet concentration

The fresh PRP showed a mean platelet concentration of $5.2 (\pm 0.5)$ times the number present in whole blood. After thawing, 6% DMSO PRP showed a platelet concentration of $4.0 (\pm 0.5)$ times the original, while the frozen PRP showed a platelet concentration of $3.2 (\pm 0.2)$ times higher.

3.4 Morphological evaluation

Figure 1 represents a sample of fresh PRP. In this sample, 74% of the platelets were evaluated in an inactive state, and only 4% of the platelets were activated. The 6% DMSO PRP (Figure 2) also showed mostly platelets in an inactive form (51%), although there is an increase in the number of platelets in uncertain state compared to fresh PRP (39.5% and 22%, respectively). As for the number of activated platelets, there was no significant difference between the fresh PRP (4%) and 6% DMSO PRP (9.5%) ($p > 0.05$). Moreover, the frozen PRP (Figure 3) showed 14% of activated platelets, only 16% of inactive platelets and mainly platelets in uncertain state (70%).

4. Discussion

PRP contains many growth factors important in wound healing due to its function mitogenic, chemotactic and neovascular. The real PRP derived from whole blood, must contain three to five times more platelets than physiological levels [18], which in horses ranging from 100,000 to 350,000/ μL [19]. According to Anitua *et al.* [20], a platelet count

greater than 300.000/ μ L is sufficient. In this study, both fresh and frozen PRP samples contained at least three times more platelets than whole blood.

According to Marx [21], the growth factors are secreted actively from the alpha granules of platelets during the first 10 minutes after activation, and over 95% of pre-synthesized factors are released during the first hour. For this reason it is recommended to use PRP immediately after its preparation, up to eight hours as a maximum time of use. The American Association of Blood Banks approves the cryopreservation of human platelets with 6% DMSO as acceptable method of storage [15].

The recovery of platelets in equine PRP after DMSO cryopreservation was similar to that observed in human platelet concentrates. According Lee and Blajchman [10], in vitro platelet recovery after freezing is 75%. Appleman *et al.* [15] obtained an in vitro platelet recovery of 72.8%, using 6% DMSO as cryoprotectant in cryopreservation of canine platelets. The platelet recovery in PRP without DMSO was much lower, which means that DMSO was effective in protecting the equine PRP during freezing.

MPV ranges from 4.3 to 5.6 fL in horses [19]. During the cryopreservation of human platelet concentrates with DMSO, is observed an increase in MPV [22, 23]. In this study, however, the MPV of DMSO PRP was not different from the fresh PRP. Only the MPV of frozen PRP increased significantly. Both decreased as increasing the MPV are indicative signals of platelet lesion. First reduction in MPV occurs due to platelet fragmentation or microparticle formation and subsequently rise in MPV occurs due to swelling of the cells [24]. MPV in PRP was lower than that observed in whole blood, which may indicate that there was some degree of platelet fragmentation during the PRP preparation.

The platelet morphology is used as a means to assess the state of activation and in the latter stages of storage, platelet membrane integrity [25]. Appleman *et al.* [15] used to evaluate the morphology under phase contrast microscopy as a quality parameter of dog

platelets preserved with 6% DMSO and Thrombosol, but no significant differences between the fresh and cryopreserved platelet concentrates were observed. Zandim *et al.* [26], using electron microscopy, evaluated the morphological change of equine platelets in PRP activated with different pharmacological agents, and observed an increase in fully platelet activation when PRP was activated with calcium chloride.

In this study, the platelet activated count found in DMSO PRP did not differ from that found in fresh PRP, suggesting that the cryopreservation process resulted in no increase in platelet activation. Moreover, even being used the phase contrast microscopy to the platelet morphology evaluation, it was observed an increase in the number of activated platelets in frozen PRP, suggesting that when stored without cryoprotectant, platelets contained in PRP suffered early activation induced by low temperature.

The fresh PRP had the highest count of platelets in an inactive form, differing from the findings of Zandim *et al.* [26], who found a greater number of platelets with uncertain form before activation. The platelet morphology classified as uncertain was present in larger numbers in frozen PRP. Zandim *et al.* [26], after activating the PRP with calcium chloride noted that the morphology of platelets were the most frequent uncertain. However, platelet with uncertain shape count also increased in DMSO PRP when compared to fresh PRP, indicating that platelets have undergone some degree of activation due to freezing.

5. Conclusion

In this study, 6% DMSO was able to protect the platelets contained in PRP from damage caused by storage at low temperatures. However, it is still necessary to evaluate whether platelets contained in PRP, stored at -80°C in the presence of DMSO, release

growth factors, since this is the point when it makes use of PRP in the treatment of lesions in equine medicine.

Acknowledgments

The authors thank the CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Coordination for Improvement of Personnel in Higher Education) and CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development) for granting the scholarship for master's studies to the first author.

References

- [1] Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Platelet-rich plasma and growth factors: processing technique and application in plastic surgery. *Rev Col Bras Cir* 2006, 33: 24-28.
- [2] Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffmann J, Overdevest EP et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 2006; 38: 174-87.
- [3] Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dent* 2001; 10: 225-28.
- [4] Carter CA, Jolly DG, Worden CE Sr, Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 244-55.
- [5] Maia L, Souza MV, Ribeiro JI Jr, Oliveira AC, Alves GES, Benjamin LA et al. Platelet-Rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J Equine Vet Sci* 2009; 29: 618-26.

- [6] Carmona JU, Arguelles D, Climent F, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Sci* 2007; 27: 167-70.
- [7] Carmona, JU, López, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *J Equine Vet Sci* 2011, 31: 506-10.
- [8] Tablin F, Wolkers WF, Walker NJ, Oliver AE, Tsvetkova NM, Gousset K et al. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets. *Cryobiology* 2001; 43: 114-23.
- [9] Schoenfeld H, Griffin M, Muhm M, Doepfmer UR, Von Heymann C, Göktas O et al. Cryopreservation of platelets at the end of their conventional shelf life leads to severely impaired *in vitro* function. *Cardiovasc J S Afr* 2006; 17: 125-29.
- [10] Lee DH, Blajchman MA. Platelet substitutes and novel methods of platelet preservation. In: Michelson AD. *Platelets*, San Diego: Elsevier; 2007, p.1297-1309.
- [11] Melaragno AJ, Carciere R, Feingold H, Talarico L, Weintraub L, Valeri CR. Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80 degrees C. Effects of 2 years of frozen storage at -80 degrees C and transportation in dry ice. *Vox Sang* 1985; 49: 245-58.
- [12] Daly PA, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Successful transfusion of platelets cryopreserved for more than 3 years. *Blood* 1979; 54: 1023-27.
- [13] Pereira RCF. Evaluation of seven protocols to obtain platelet rich plasma (PRP). 2012. 54p. Master's Dissertation - Postgraduate Program of Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria.
- [14] Brecher G, Schneiderman M, Cronkite EP. The reproducibility and consistency of the platelet count. *American Journal of Clinical Pathology* 1953; 23:15-26.

- [15] Appleman EH, Sachais BS, Patel R, Drobatz KJ, Groman RP, Kennedy DR et al. Cryopreservation of canine platelets. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 138-45.
- [16] Würzinger LJ, Schmid-Schönbein H. The role of fluid dynamics in triggering and amplifying haemostatic reactions in thrombogenesis. *Monogr Artheroscler* 1990; 15: 215-26.
- [17] Valeri CR, Feingold H, Marchionni LD. A simple method for freezing human platelets using 6 per cent dimethylsulfoxide and storage at -80 degrees C. *Blood* 1974; 43: 131-36.
- [18] Gonshor, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22: 547-57.
- [19] Grondin TM, Dewitt SF. Normal hematology of the horse and donkey. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary Hematology*, Ames: Blackwell Publishing; 2010, p.821-828.
- [20] Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelet as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
- [21] Marx RE. Platelet-Rich Plasma: evidence to support its use. *J Oral and Maxillofac Surg* 2004; 62: 489-96.
- [22] Böck M, Schleuning M, Heim MU, Mempel W. et al. Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function. *Transfusion* 1995; 35: 921-24.
- [23] Landi EP, Roveri EG, Ozelo MC, Annichino-Bizzacchi JM, Origa AF, de Carvalho Reis, AR et al. Effects of high platelet concentration in collecting and freezing dry platelets concentrates. *Transfus Apher Sci* 2004; 30: 205-12.
- [24] Ohto H, Nolle KE. Overview on platelet preservation: Better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2011; 44: 321-25.
- [25] Devine DV, Serrano K. The platelet storage lesion. *Clin Lab Med* 2010; 30: 475-87.

[26] Zandim BM, Souza MV, Magalhães PC, Benjamin LA, Maia L, Oliveira AC et al. Platelet activation: Ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2012, 32: 83-92.

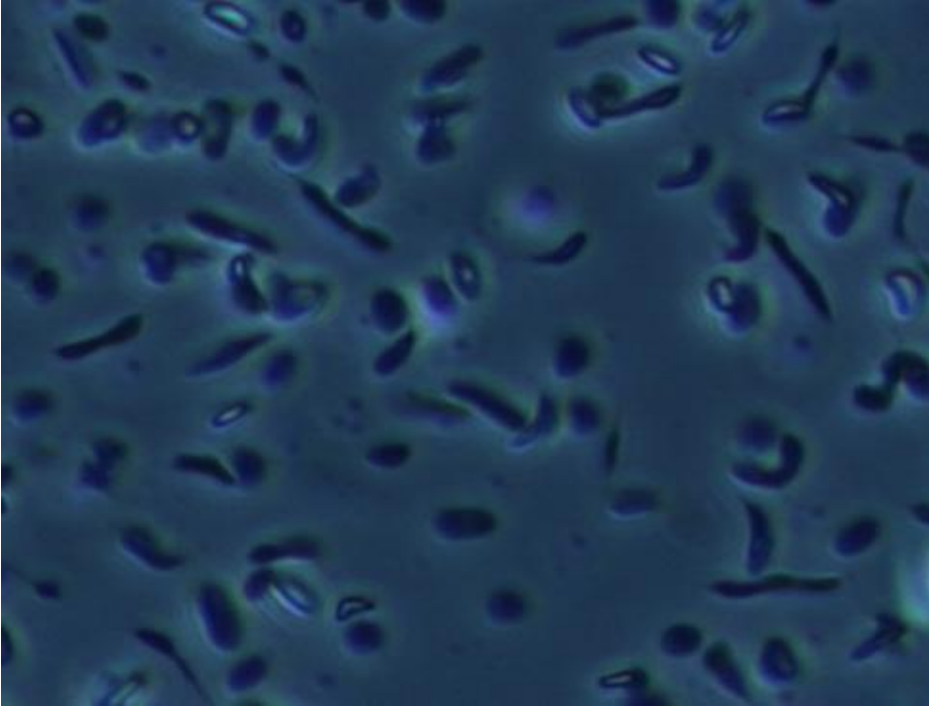


Figure 1 - Fresh PRP sample, showing inactive platelets (normal discoid shape).

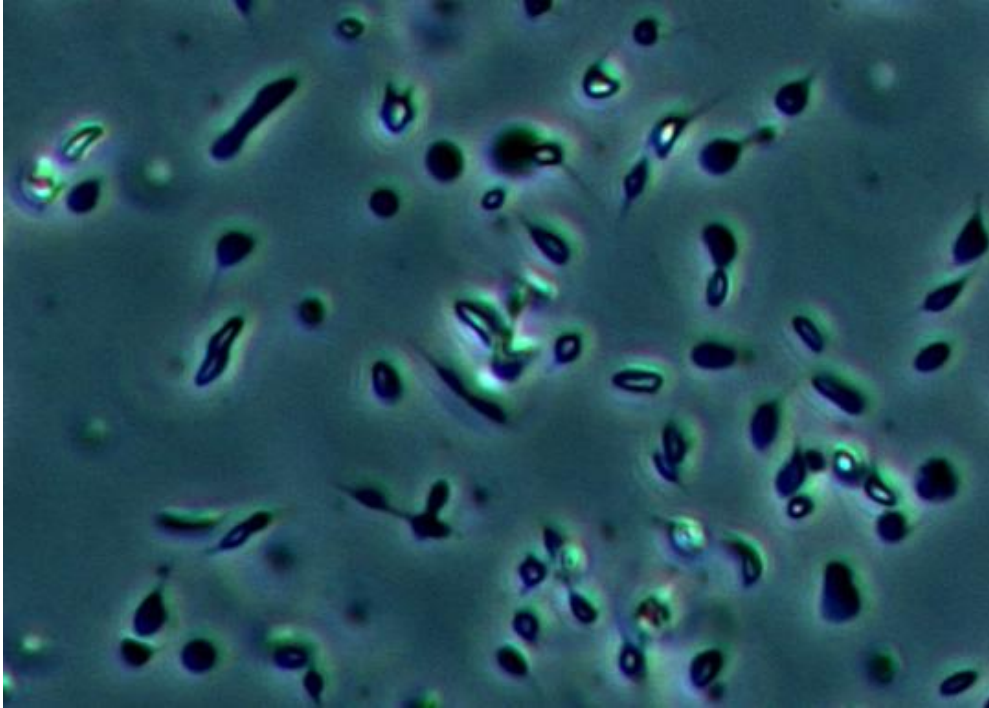


Figure 2 - 6% DMSO PRP sample post thawing, showing mostly inactive platelets and a few activated and in uncertain state platelets.

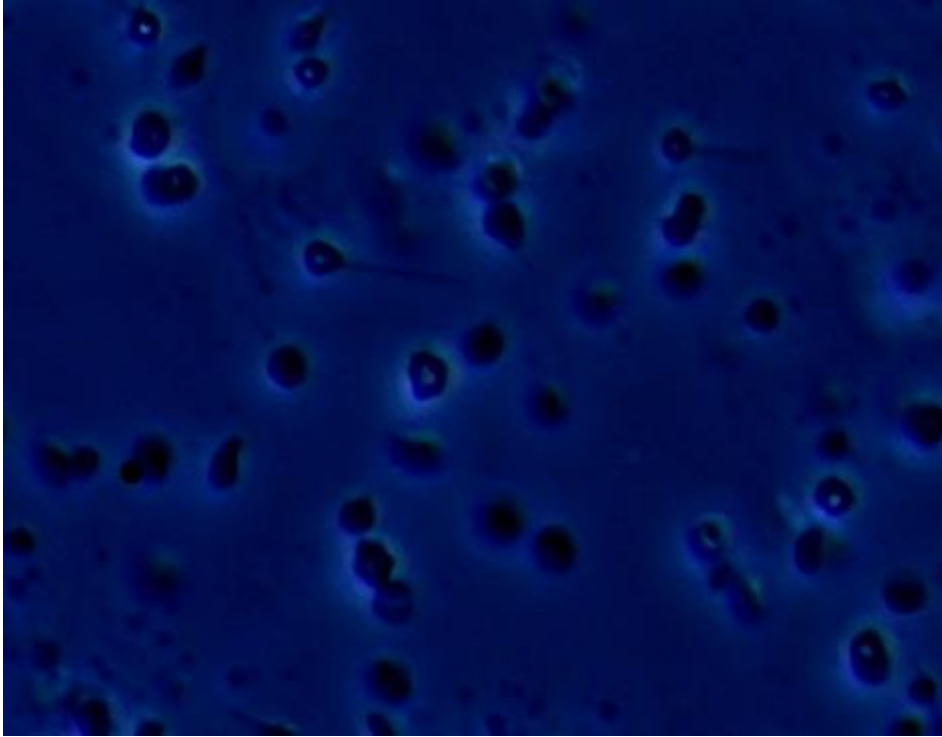


Figure 3 - Frozen PRP sample (without DMSO) post thawing, showing mostly in uncertain state platelets, and some activated platelets, with long pseudopods.

4. CONCLUSÃO

- A criopreservação do PRP equino a -80°C por 14 dias, utilizando-se DMSO 6% como crioprotetor, evita o aparecimento de lesões plaquetárias irreversíveis, possibilitando o armazenamento deste produto.

5. REFERÊNCIAS

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparations of future sites for implants. **The international journal of oral & maxillofacial implants**, v.14, n.4, p.529-535, 1999.

ANITUA, E. et al. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, n.1, p. 4-15, 2004.

ANITUA, E. et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. **Rheumatology**, v.46, n.12, p.1769-1772, 2007.

APPLEMAN, E.H. et al. Cryopreservation of canine platelets. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.1, p.138-145, 2009.

ARGÜELLES, D. et al. Clinical experiences with platelet-rich plasma as a treatment of tendon and ligament injuries in a horse. **Proceedings**, European College of Veterinary Surgeons, 2005. p. 217-222.

ARGÜELLES, D. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, v.162, n.7, p.208-211, 2008.

ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v.75, n.1, p.93-99, 2004.

BAMES, G.L. et al. Growth factor regulation of fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, n.11, p.1805-1815, 1999.

BALDINI, M. et al. The viability of stored human platelets. **Blood**, v.16, n.6, p.1669-1692, 1960.

BHANOT, S.; ALEX, J.C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. **Facial plastic surgery**, v.18, n.1, p.27-33, 2002.

BLOCKMANS, D. et al. Platelet activation. **Blood Reviews**, v.9, n.3, p.143-156, 1995.

BÖCK, M. et al. Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function. **Transfusion**, v.35, n.11, p.921-924, 1995.

BOSCH, G. et al. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scandinavian journal of Medicine & Science in Sports**, v.21, n.4, p.554-561, 2011.

CANALIS, E. et al. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, v.140, n.3 p.530-537, 1989.

CARDIGAN, R. et al. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. **Vox Sanguinis**, v.88, n.3, p.153-163, 2005.

CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse**. 2006. 91f. Tese de doutorado em Medicina e Sanidade Animal, Universidade Autônoma de Barcelona.

CARMONA, J.U. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, p.167-170, 2007.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.31, n.9, p.506-510, 2011.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I.J. Autologous platelet concentrates as an adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction. **Journal of Equine Veterinary Science**, article in press, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612002912>

CARTER, C.A. et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, n.3, p.244-255, 2003.

CROWE, J.H. et al. The role of vitrification in anhydrosis. **Annual Review of Physiology**, v.60, p.73-103, 1998.

CURRIE, L.M. et al. Cryopreservation of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide concentration by the addition of second-messenger effectors: enhanced retention of in vitro functional activity. **Transfusion**, v.38, n.2, p.160-167, 1998.

DALY, P.A. et al. Successful transfusion of platelets cryopreserved for more than 3 years. **Blood**, v.54, n.5, p.1023-1027, 1979.

DUMONT, L.J. et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. **Transfusion**, v.42, n.7, p.847-854, 2002

EVERTS, P.A.M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The journal of extracorporeal technology**, v.38, n.2, p.174-187, 2006.

FRIESEL, R.E.: MACIAG, T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.9, n.10, p.919-925, 1995.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfers. In: **Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. Illinois: Quintessence, 1999, p.231-243.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. **The international journal of periodontics & restorative dentistry**, v.22, n.6, p.547-557, 2002.

HAMBURGER, S.A.; McEVER, R.P. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. **Blood**, v.75, n.3, p.550-554, 1990.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha-granules. **Blood review**, v.7, n.1, p.52-62, 1993.

HEAL, J.M. et al. Fatal *Salmonella septicemia* after platelet transfusion. **Transfusion**, v.27, n.1, p.2-5, 1987.

HEROUY, Y. et al. Autologous platelet-derived wound healing factor promotes angiogenesis via $\alpha v \beta 3$ integrin expression in chronic wounds. **International journal of molecular medicine**, v.6, p.515-519, 2000.

HOCK, J.M.; CANALIS, E. Platelet-derived growth factors enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. **Endocrinology**, v.134, n.3, p.1423-1428, 1994.

HOLME, S. et al. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. **Transfusion**, v.37, n.1, p.12-17, 1997.

HOM, D. B.; MAISEL, R.H. Angiogenic growth factors: Their effects and potential in soft tissue wound healing. **Annals of Otolaryngology Rhinology Laryngology**, v.101, n.4, p.349- 354, 1992.

KEVY, S.; JACOBSON, M. Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel. **Proc. 27th Annual Meeting of the Society for Biomaterials**, St. Paul, Minnesota, p.262, 2001 (Resumo).

KHURI, S.F. et al. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-stored platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.117, n.1, p.172-183, 1999.

KITOH, H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis-a preliminary result of three cases. **Bone**, v.35, n.4, p.892-898, 2004.

KLEIN, E. et al. Hemostasis in thrombocytopenic bleeding following infusion of stored, frozen platelets. **Blood**, v.11, n.8, p.693-999, 1956.

KUBOTA, S. et al. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. **Journal of Biochemistry**, v.136, n.3, p.279–282, 2004.

KUNICKI, T.J. et al. A study of variables affecting the quality of platelets stored at “room temperature”. **Transfusion**, v.15, n.5, p.414-421, 1975.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 488p.

LALKO, C.C. et al. Equine platelet CD62P (P-selectin) expression: a phenotypic and morphologic study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.91, n.2, p.119–134, 2003.

LANDI, E.P. **Efeito da concentração plaquetária na coleta e criopreservação dos concentrados de plaquetas “secas” obtidos por aférese.** 2004. 106f. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

LEE, D.H.; BLAJCHMAN, M.A. Platelet substitutes and novel methods of platelet preservation. In: MICHELSON, A.D. **Platelets.** San Diego: Elsevier, 2007. Cap.70, p.1297-1309.

LOWERY, G.L. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. **Bone**, v.25, n.2, p.478-508, 1999.

MAIA L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultrassonográfica e histopatológica.** 2008. 78f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.

MAIA, L. et al. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. **Journal of equine veterinary science**, v.29, n.8, p.618-626, 2009.

MARSOLAIS, D.; FRENETTE, J. Inflammation and tendon healing. **Médecine Sciences**, v.21, n.2, p.180-186, 2005.

MARTIN, P. et al. Growth factors and cutaneous wound repair. **Progress in Growth Factor Research**, v.4, n.1, p.25-44, 1992.

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v.62, n.4, p.489-496, 2004.

MELARAGNO, A.J. et al. Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80 degrees C. Effects of 2 years of frozen storage at -80 degrees C and transportation in dry ice. **Vox Sanguinis**, v.49, n.4, p.245-258, 1985.

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. **The American Journal of Sports Medicine**, v.34, n.11, p.1774-1778, 2006.

MURPHY, S.; GARDNER, F.H. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability – deleterious effect of refrigerated storage. **The New England Journal of Medicine**, v.280, n.20, p.1094-1098, 1969.

MURPHY, S. et al. Platelet preservation by freezing. Use of dimethylsulfoxide as cryoprotective agent. **Transfusion**, v.4, n.2, p.139-144, 1974.

MURPHY, S.; GARDNER, F.H. Platelet storage at 22°C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. **Blood**, v.46, n.2, p.209-218, 1975.

MURPHY, S. Platelet storage for transfusion. **Seminars in Hematology**, v.22, p.165-177, 1985.

OHTO, H.; NOLLET, K.E. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. **Transfusion and Apheresis Science**, v.44, n.3, p.321-325, 2011.

PAES LEME, F.O. et al. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.149-157, 2006.

PEREIRA, R.C.F. **Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP)**. 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

PIERCE, G.F. et al. Platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. **The Journal of Cell Biology**, v.109, n.1, p.429-440, 1989.

PIERCE, G.F. et al. Role of platelets-derived growth factoring wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.45, n.4, p.319-326, 1991.

PIETRZAK, W.S.; EPPLEY, B.L. Platelet-rich plasma: biology and new technology. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.16, n.6, p.1043-1054, 2005.

PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento**. São Paulo: Santos, 308p, 2003.

POWELL, D.M. et al. Recovery from deep-plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel: a pilot study. **Archives of facial plastic surgery**, v.3, n.4, p.245-250, 2001.

PUNSALANG, A. et al. Growth of gram-positive and gram-negative bacteria in platelet concentrates. **Transfusion**, v.29, n.7, p.596-599, 1989.

REID, T.J. et al. Platelet membrane integrity during storage and activation. **Transfusion**, v.39, n.6, p.616-624, 1999.

RINDER, H.M. et al. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. **Transfusion**, v.31, n.5, p.409-414, 1991.

RINDER, H.M. et al. Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and beta-thromboglobulin release. **Transfusion**, v.33, n.1, p.25-29, 1993.

RINDER, H.M.; AULT, K.A. Platelet activation and its detection during the preparation of platelets for transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**, v.12, n.4, p.271-287, 1998.

ROSIER, R.N. et al. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. **Clinical Orthopaedics Related Research**, suppl.355, p.294-300, 1998.

ROSS, R. Platelet-derived growth factor. **Annual Review of Medicine**, v.38, p.71-79, 1987.

SÁNCHEZ, M. et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. **Medicine and science in sports and exercise**, v.35, n.10, p.1648-1652, 2003.

SÁNCHEZ, M. et al. Ultrasound-guided platelet –rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. **Rheumatology**, v.51, n.1, p.144-150, 2012.

SCHNABEL, L.V. et al. Platelet rich plasma (PRP) enhanced anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of orthopaedic research**, v.25, n.2, p.230-240, 2007.

SCHOENFELD, H. 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**, v.17, n.3, p.125-129, 2006.

SEGURA, D. et al. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, n.3, p.581-588, 2006.

SHRIVASTAVA, M. The platelet storage lesion. **Transfusion and Apheresis Science**, v.41, p.105-113, 2009.

STEENFOS, H.H. Growth factors and wound healing. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v.28, n.2, p.95-105, 1994.

STOLL, C.; WOLKERS, W.F. Membrane stability during biopreservation of blood cells. **Transfusion medicine and hemotherapy**, v.38, n.2, p.89-97, 2011.

TABLIN, F. et al. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets. **Cryobiology**, v.43, n.2, p.114-123, 2001.

TAYLOR, M. A. Cryopreservation of platelets: an *in-vitro* comparison of four methods. **Journal of Clinical Pathology**, v.34, n.1, p.71-75, 1981.

TEXTOR, J. Autologous biological treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. **The veterinary clinics of North America. Equine practice**, v.27, n.2, p.275-298, 2011.

THON, J.N. et al. Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. **Transfusion Medicine Reviews**, v.22, n.4, p.268-279, 2008.

TSVETKOVA, N.M. et al. Lipid phase separation correlates with activation in platelets during chilling. **Molecular Membrane Biology**, v.17, n.4, p.209-218, 2000.

TURNER, C.P. et al. In vitro function of platelet concentrates prepared after filtration of whole blood or buffy coat pools. **Vox Sanguinis**, v.88, n.3, p.164-171, 2005.

VALERI, C.R. et al. A simple method for freezing human platelets using 6 per cent dimethylsulfoxide and storage at -80 degrees C. **Blood**, v.43, n.1, p.131-136, 1974.

VENDRAMIN, F.S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.

VENDRAMIN, F.S. et. al. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.24, n.2, p. 212-218, 2009.

VILELLA, D.L. **Terapia tópica de úlceras crônicas de perna com plasma rico em plaquetas (PRP): Revisão sistemática da literatura**. 2007. 154f. Dissertação de mestrado em Enfermagem. Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

WEISS, T.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Ames: Blackwell, 2010. 1206p.

WIEDMER, T. et al. Role of calcium and calpalin in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. **Biochemistry**, v.29, n.3, p.623-632, 1990.

WHITMAN, D.H. et al. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v.55, n.11, p. 1294-1299, 1997.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **British Journal of Haematology**, v.13, n.3, p.269-288, 1967.

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

YAMADA, A.L.M. et al. Avaliação clínica e artroscópica do tratamento de lesões condrais, experimentalmente induzidas em equinos, com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas. In: XII Conferência anual da ABRAVEQ, 2011, Campinas, São Paulo. **Anais...** Abraaveq- Associação Brasileira dos Médicos Veterinários de Equídeos, 2011, v.35, p.239, p. 77-78.

ZANDIM, B. et al. Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.83-92, 2012.