

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LUCAS VILELA PERRONI SILVA

**CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE
COELHOS SOB REFRIGERAÇÃO**

UBERLÂNDIA
2015

LUCAS VILELA PERRONI SILVA

**CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE
COELHOS SOB REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Duvaldo Eurides

UBERLÂNDIA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586c
2015 Silva, Lucas Vilela Perroni
 Conservação e viabilidade do plasma rico em plaquetas de coelhos
 sob refrigeração / Lucas Vilela Perroni Silva. - 2015.
 28 f. : il.

Orientador: Duvaldo Eurides.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Coelho - Teses. 3. Confinamento de plasma
- Teses. I. Eurides, Duvaldo. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Nada posso lhe dar que já não exista em você mesmo. Nada posso lhe dar a não ser a chave e um impulso. Não posso abrir-lhe outro mundo além do que há em sua própria alma.

Hermann Hesse

Aos meus queridos alunos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de me aprimorar, juntamente com o apoio do corpo docente que através de grande conhecimento e humildade pode contribuir para o meu aprimoramento. Ao meu orientador Duvaldo Eurides pelos conselhos, conhecimento e paciência para com um profissional totalmente inacabado e em construção, meu muito obrigado por auxiliar na minha evolução profissional e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de mestrado e iniciação científica, respectivamente.

Aos professores Drs. Antonio Vicente Mundim, Marcelo Emílio Beletti, Daise Aparecida Rossi, Evandro de Abreu Fernandes e Francisco Cláudio Dantas Mota pelos conselhos, auxílio e disponibilidade dos seus respectivos laboratórios para que a pesquisa pudesse ser realizada e concluída.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, em especial à secretária Célia Regina Macedo por ser sempre solícita, agradável, educada e compreensível. E por observar que ocupa o lugar certo dentro da instituição.

Aos funcionários, técnicos e residentes do Laboratório de Patologia Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) e Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Uberlândia. Agradeço pela disponibilidade dos laboratórios, bem como a dos profissionais, pela ajuda e paciência com o projeto em questão.

Aos queridos amigos Marina Greco Magalhães Guerra de Andrade, Laura Melgaço Faria, Marcelo Carrijo da Costa, Vinicius Cândido Ferreira e Marina de Oliveira Silva, que me acompanharam e auxiliaram em demasia para que a pesquisa e a dissertação se realizassem, sem o auxílio de vocês este sonho não poderia se realizar.

À minha família pelo apoio, palavras de conforto, auxílio emocional e financeiro. Que apesar de todas as dificuldades enfrentadas durante este período, podemos realizar mais um sonho. Somos unidos e por esta questão somos fortes.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	13
2 Revisão de literatura.....	14
3 Material e métodos.....	16
4 Resultados e discussão.....	18
5 Conclusão.....	24
Referências.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média (Méd.) e desvio padrão (Dp.) em relação ao período de dias de armazenamento sob refrigeração das variáveis, número de plaquetas no hemograma (Hem.), pré e pós-armazenamento e das dez amostras de plasma rico em plaquetas de coelhos. Unidade de medida: micrômetros cúbicos (μm^3).....	19
Tabela 2 - Média (Méd.) e desvio padrão (Dp.) em relação ao período de dias de armazenamento sob refrigeração das variáveis, volume plaquetário médio no hemograma (Hem.), pré e pós-armazenamento e das dez amostras de plasma rico em plaquetas de coelhos. Unidade de medida: fentolitros (fL).....	20
Tabela 3 - Média (Méd.) e desvio padrão (Dp.) em relação ao período de dias de armazenamento sob refrigeração das variáveis, pH pré e pós-armazenamento e das dez amostras de plasma rico em plaquetas de coelhos.....	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gel plaquetário de coelho do grupo dois obtido após adição de tromboplastina cártilica da amostra 27º dia de armazenamento sob refrigeração..... 22
- Figura 2 - Colônias fúngicas (setas vermelhas) em ágar batata dextrose do plasma rico em plaquetas de coelho do grupo um da amostra 21º dia de armazenamento sob refrigeração..... 23

RESUMO

Utilizou-se 15 coelhos da raça Nova Zelândia para o desenvolvimento da pesquisa, com o objetivo de armazenar plasma rico em plaquetas (PRP) durante 30 dias sob refrigeração de 4-6°C. Preparou-se 30 amostras de PRP que foram divididas em três grupos iguais. A cada três dias uma amostra foi retirada para avaliação antes e após o armazenamento quanto ao número de plaquetas, volume plaquetário médio (VPM), pH do plasma, agregação pós adição de tromboplastina cálcica e presença de contaminação bacteriana e fúngica. Nas variáveis número de plaquetas, não houve relação linear em função do tempo, na comparação do número de plaquetas pré x pós armazenamento, observou-se diferença estatística. As variáveis de VPM do hemograma, pré e pós armazenamento também não apresentaram relação com o tempo, porém obteve-se diferença estatística nas comparações VPM no hemograma x VPM pré armazenamento e VPM pré-armazenamento x VPM pós armazenamento. Na avaliação do pH não houve influência do tempo nas variáveis, mas houve diferença estatística nas amostras pós armazenamento entre os períodos 30 e 6; 30 e 24; 30 e 27 dias. A agregação plaquetária ocorreu dentro de vinte segundos em todas as amostras independente do tempo de estocagem. Não houve crescimento bacteriano e de leveduras em nenhuma amostra, porém ocorreu crescimento de bolores nas amostras 21 dias de armazenamento dos grupos um e três. Pode-se concluir que o plasma rico em plaquetas de coelhos pode ser armazenado sob refrigeração de 4 a 6°C por manter o número de plaquetas, sem alteração significativa do pH e ausência de contaminação bacteriana e fúngica durante 18 dias.

Palavras-chave: concentrado de plaquetas, pH, agregação plaquetária, cirurgia reparadora e reconstrutiva, armazenamento.

ABSTRACT

In the development of this research, 15 New Zealand rabbits were used, with the aim of storing platelet-rich plasma (PRP) during 30 days refrigerated at 4-6°C. There was a preparation of 30 samples of PRP which were sorted in three equal groups. Every three days a sample would be removed for evaluation, before and after storage, for the number of platelets, mean platelet volume (MPV), pH of the plasma, aggregation post addition of calcic thromboplastin and for the presence of bacterial and fungal contamination. In the variables of number of platelets, there was no linear relationship in function of time, when comparing the number of platelets before x after storage, a statistical difference was observed. The hemogram MPV variables, before and after storage also did not relate with time, however there was a statistical difference in the comparisons of MPV on blood count x MPV before storage and of MPV before storage x MPV post storage. On the evaluation of the pH there was no influence of time on the variables, but statistical differences were found in the samples after storage in between the periods of 30 and 6; 30 and 24; 30 and 27 days. Platelet aggregation occurred within twenty seconds in all samples independent of storage time. There was no growth of bacteria or yeast in any sample, however mold growth occurred in the samples 21 days of storage on group one and three. It can be concluded that platelet-rich plasma of rabbits can be stored under refrigeration of 4 to 6 °C for maintaining the number of platelets, without significant pH alteration and absence of bacterial or fungal contamination during 18 days.

Keywords: platelet concentrate, pH, platelet aggregation, restorative and reconstructive surgery, storage.

.

1 INTRODUÇÃO

Por meio da centrifugação do sangue total pelo gradiente de densidade, obtém-se o plasma rico em plaquetas (PRP), que é um concentrado de plaquetas em pequeno volume de plasma (VANAT et al., 2012). O concentrado plaquetário tem sido utilizado na medicina humana e veterinária e na odontologia pela capacidade de provocar regeneração tecidual.

As plaquetas são secretoras especializadas, que liberam grânulos alfa intracelulares, em resposta à ativação de um grande número de substâncias biologicamente ativas como os fatores de crescimento. Desempenham o processo de cicatrização, expandindo a resolução das lesões teciduais (GEREMICCA; FONTE; VECCHIO, 2010).

Rumjantseva e Hoffmeister (2010) relataram que uma das formas de avaliar a viabilidade das plaquetas armazenadas é a determinação do pH. Níveis de pH abaixo de 6,0-6,2 estão associados à produção de lactato, que tendem a acumular durante o armazenamento à temperatura ambiente. O acúmulo do lactato ocasiona queda do pH que está associado a diminuída viabilidade das plaquetas. Além do risco de contaminação e crescimento bacteriano em plaquetas armazenadas em temperatura ambiente.

As plaquetas apresentam-se normalmente, em estado inativo (EVERTS et al., 2006) e possuem vários receptores responsáveis por sua agregação, entre eles os receptores de tromboxano, colágeno e trombina (BOUDREAUX, 2010). Uma vez ativadas, as plaquetas mudam da forma elíptica para arredondada e emitem pseudópodes (PIETRZAK; EPPELEY, 2005).

Uma vez ativado o PRP *in vivo*, inicia-se a liberação de fatores de crescimento pré-sintetizados, que advém próximo de 10 minutos após a formação do coágulo. Ocorre na primeira hora após a ativação levando a extensa liberação de fatores de crescimento armazenados nos grânulos, porém as plaquetas continuam a sintetizá-los durante seu período de vida (SUTTER, 2007).

A investigação laboratorial de doenças bacterianas é necessária para identificar o agente etiológico e, algumas vezes, para determinar a sensibilidade aos antimicrobianos dos patógenos. A seleção de meios de cultura, de condições atmosféricas e de outros fatores essenciais para isolamento é determinada pela suspeita de um patógeno bacteriano. O isolamento de rotina de muitos patógenos envolve inoculação em placas de ágar sangue e ágar MacConkey, seguidos de incubação por 24-48 horas. As características morfológicas e os testes bioquímicos permitem a identificação presuntiva do agente bacteriano. Características adicionais que podem auxiliar na identificação incluem produção de pigmento e de odor tanto no ágar sangue quanto no ágar MacConkey e a produção de hemólise em ágar sangue. A

identificação definitiva da bactéria é geralmente baseada em testes bioquímicos e sorológicos. Testes adicionais podem ser usados para identificar microrganismos específicos (HIRST; MACLACHLAN; WALKER, 2004; QUINN et al., 2005;).

O pH inferior a cinco favorece o crescimento de fungos. Os fungos mutualistas têm associação obrigatória com outros microrganismos e não são patogênicos. Os saprófitos, que estão amplamente distribuídos no ambiente e envolvidos na decomposição de matéria orgânica, alguns podem causar infecções oportunistas em animais. Os fungos geralmente são isolados em ágar dextrose Sabouraud ou batata dextrose, o qual possui pH de 5,5, que inibe o crescimento da maioria das bactérias (HIRST; MACLACHLAN; WALKER, 2004; QUINN et al., 2005).

Objetivou-se avaliar a conservação e viabilidade do plasma rico em plaquetas de coelhos da raça Nova Zelândia, armazenado à temperatura de 4-6°C por um período de 30 dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, discoides e derivados dos megacariócitos. São pequenas, possuindo cerca de 5-7 μ m de diâmetro e, normalmente, largura inferior a 3 μ m. Esses fragmentos apresentam importante função no processo inflamatório, na reparação tecidual por meio da interação célula-célula e liberação de mediadores solúveis provenientes da ativação destes (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Também possuem a função de armazenar e expressar de forma dinâmica um repertório de produtos ligados à membrana, que estão envolvidos na dor, hemostase primária, recrutamento de células brancas, regulação do tônus vascular e neovascularização (SCOTT et al., 2004).

O PRP e o concentrado de plaquetas (CP) são obtidos pela centrifugação do sangue total por meio do gradiente de densidade, obtendo-se expressiva concentração de plaquetas em pouco volume de plasma (VANAT et al., 2012). São de fácil aquisição, baixo custo, e fontes de diversos fatores de crescimento (MAIA; SOUZA, 2009). Os fatores são armazenados em grânulos no interior das plaquetas (VANAT et al., 2012), e importantes na reparação tecidual devido às ações mitogênica, quimiotáctica e neovascular (MAIA; SOUZA, 2009). Além disso, auxiliam na diferenciação, crescimento das células mesenquimatosas pluripotenciais e na produção de matriz extracelular, atuando na regeneração dos tecidos (VANAT et al., 2012).

A degranulação plaquetária propicia a liberação de substâncias como fatores de crescimento de transformações beta, derivado da plaqueta, epidermal, transformação alfa,

vascular endotelial, tromboplastina plaquetária, além de tromboplastina, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (HARRINSON; CRAMER, 1993). Adicionalmente, outros fatores como o de crescimento fibroblástico (EVERTS et al., 2006), de crescimento de tecido conjuntivo e o semelhante à insulina I, também estão presentes nas plaquetas (KUBOTA et al., 2004).

Os fatores de crescimento, devem ser aplicados no local da lesão, buscando imitar tanto quanto possível, as exigências do tecido ferido durante as diferentes fases de regeneração. O desenvolvimento fácil de alternativas atóxicas, seguras e não onerosas que podem ser utilizadas atendendo tais pré-requisitos, tem se tornado importante no âmbito cirúrgico (ANITUA et al., 2006b).

Como o PRP não contém leucócitos enriquecem a homogeneidade do produto e reduzem o risco de reações, porque os neutrófilos expressam enzimas degradantes de matriz, tais como as metaloproteinases de matriz, e liberação de espécies reativas de oxigênio que destroem as células vizinhas, seja em tecido sadio ou lesionado (SCOTT et al., 2004).

Na medicina humana e odontologia, o PRP e o CP, têm sido utilizados em procedimentos cirúrgicos para reparação óssea (MAIA; SOUZA, 2009). Vanat et al. (2012) referiram a utilização em transplantes de córnea, cicatrização de feridas com diabetes mellitus e regeneração óssea. O PRP é 100% biocompatível e seguro, não apresenta risco infecioso, pois é feito a partir de plasma do próprio paciente (DEROSSI et al., 2009).

Anitua et al. (2006a) observaram que as associações de fatores de crescimento liberadas in vitro aumentaram a proliferação de células de tendões humanos e estimulam a produção de fatores angiogênicos, como de crescimento vascular endotelial e de hepatócitos. Notaram também que a utilização de matrizes de fibrina rico em plaquetas é uma estratégia eficaz e segura para acelerar a proliferação de células do tendão, estimular a síntese de colágeno tipo I e promover a neovascularização tanto in vitro como in vivo. Eurides et al. (2015) também observaram resultados favoráveis com a utilização do plasma rico em plaquetas autólogo em tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos.

A refrigeração de plaquetas tem sido utilizada para prolongar a vida de armazenamento, manter a viabilidade e a funcionalidade por períodos prolongados (ROTHWELL et al., 2000). Entretanto, estes processos podem trazer implicações para a viabilidade plaquetária (SILVA, 2006). As variações térmicas muito abruptas podem interferir no transporte de água através da membrana celular, o que pode causar apoptose celular (MASSUMOTO et al., 1997; SILVA, 2006).

Um método de avaliar a viabilidade das plaquetas armazenadas é a dosagem do pH, pois níveis abaixo de 6,0-6,2 se encontram associados aos produtos metabólicos. Acumulam-

se durante o armazenamento à temperatura ambiente, causando queda no pH que está associado a diminuída viabilidade das plaquetas. Além do risco de contaminação e crescimento bacteriano (RUMJANTSEVA; HOFFMEISTER, 2010).

Para verificar a viabilidade do PRP, Barbosa et al. (2008) e Aleixo et al. (2011), realizaram a adição de tromboplastina na proporção de duas partes de PRP para uma de tromboplastina cárnea. Referiram ser um método favorável para ativação das plaquetas.

Foi notado por Dalanholt et al. (2010), que amostras de hemograma mantidos em temperatura ambiente e a 4°C, por um período máximo de 72 horas, ocorre variação significativa na média de contagem das plaquetas, em ambas temperaturas. Ressaltaram que a variação poderia ser justificada pela aglutinação ou satelitismo plaquetário com amostras colhidas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A aglutinação é EDTA-dependente causada por imunoglobulina (Ig) M ou IgG, que possuem maior poder de aglutinação em baixas temperaturas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto para utilização de 15 coelhos machos da raça Nova Zelândia, com peso de 3,5 a 4,0kg foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais, protocolo CEUA/UFU 070/13. Os animais foram avaliados por meio de exame clínico, hemograma completo, em analisador hematológico veterinário (pocH 100iVDiff, Sysmex do Brasil Indústria e Comércio, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e coprológico. Após terem sido considerados aptos a participarem do experimento realizou-se tricotomia e antisepsia com álcool 70% da face medial da coxa direita para arteriopuncção femoral. Colheu-se 18mL de sangue de cada animal, para obtenção de duas amostras, utilizando-se seis tubos de hemossedimentação (VHS), contendo cada um 0,5mL de citrato de sódio e agulha específica. Obtendo-se assim 30 amostras que foram distribuídas em três grupos de igual número (G1, G2 e G3) para repetição estatística.

Logo após a colheita realizou-se hemograma de cada coelho em analisador hematológico veterinário, para contagem prévia de plaquetas. O preparo do PRP foi realizado em capela de fluxo laminar (Cabine de Segurança Biológica Classe II A1, Filterflux Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Para o preparo de uma amostra de PRP, utilizou-se três tubos de cada animal, contendo cada 3,0mL de sangue, que foram centrifugados (Centrífuga Fanem Baby I206, Guarulhos, São Paulo, Brasil) durante vinte minutos à 2.000rpm. Após descartou-se 1,0mL de plasma sobrenadante de cada tubo, o restante foi transferido para um tubo de transporte com volume de 4,0mL (Labor Import,

Osasco, São Paulo, Brasil), sem aspirar o anel leucocitário. O tubo para transporte foi submetido a uma segunda centrifugação durante dez minutos à 2.000rpm. Em seguida descartou-se 1,5mL de plasma sobrenadante e 1,0mL restante foi homogeneizado ao botão plaquetário com pipeta automática (Micropipeta ajustável Peguepet, Cotia, São Paulo, Brasil). As amostras foram armazenadas em tubos de Eppendorf de 1,8mL. Colheu-se 100µL destinados ao analisador hematológico veterinário para contagem de plaquetas do plasma rico em plaquetas.

As amostras de cada grupo foram mantidas em geladeira (Consul Refrigerador 300, São Paulo, São Paulo, Brasil) sob temperatura entre 4 e 6°C, aferidas por termo-higrômetro interno (KBD6007, China). Antes de destinar as amostras para armazenamento realizou-se cultura bacteriana e de bolores e leveduras, das quais somente as amostras que não apresentaram crescimento microbiológico foram utilizadas. Para a realização das análises microbiológicas 50µL da última porção de plasma sobrenadante foi homogeneizado em 2,5mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI), (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), que permaneceram em estufa à 36,0°C durante 48 horas. Em seguida, realizou-se semeadura, com alça microbiológica, em placa de Petri contendo os meios Ágar Sangue (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e MacConkey (Acumedia Manufaturing Inc, Michigan, Estados Unidos da América), que permaneceram em estufa à 36,0°C durante 48 horas e posteriormente avaliadas quanto a presença de colônias bacterianas. A cultura de fungos e leveduras foi realizada com a solução de BHI, porém a semeadura foi feita em meio de Ágar Batata Dextrose (Acumedia Manufaturing Inc, Michigan, Estados Unidos da América), com acréscimo de 1,0mL de ácido tartárico 10% (Casa da Química Indústria e Comércio, Diadema, São Paulo, Brasil) para cada 100mL do ágar. As placas com amostras fúngicas permaneceram em estufa a 25,0°C durante cinco dias e posteriormente avaliadas quanto a presença de microorganismos.

A cada três dias de armazenamento e durante 30 dias, uma amostra foi retirada da geladeira para avaliação por meio da cultura bacteriana, de bolores e leveduras, contagem automática de plaquetas, agregação plaquetária e pH. Para avaliação microbiológica, o tubo de Eppendorf contendo a amostra refrigerada foi aberto em capela de fluxo laminar, da qual colheu-se 50µL do PRP e procedeu-se o mesmo protocolo no pré armazenamento.

Depois de colhido a quantidade utilizada para cultura bacteriana e fúngica o PRP foi destinado ao analisador hematológico para contagem de plaquetas. A agregação plaquetária foi realizada pelo método referido por Aleixo et al, (2011), para tanto utilizou-se 100µL de PRP homogeneizado em 50µL de tromboplastina cálcica (Soluplastin, Wiener Laboratorios,

Rosario, Argentina), as amostras foram destinadas ao banho-maria à 37°C e o tempo de agregação foi cronometrado, sendo que a cada 20 segundos foram verificadas quanto à formação do gel plaquetário.

Os tubos contendo o PRP foram centrifugados durante dez minutos em centrífuga de microhematologia (Fanem Microhemato Centrifuge, Modelo 2410, Guarulhos, São Paulo, Brasil), para separação do plasma que foi utilizado para aferição do pH (Medidor de pH mPA210, MS Tecnopon Equipamentos Especiais, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O plasma restante foi diluído em 20mL de água destilada e destinado ao pHmetro para aferição do pH.

Para a verificação de relacionamento linear entre as variáveis analisadas e o tempo foi feita a análise de regressão linear simples tendo como variável dependente o atributo, como número de plaquetas, volume plaquetário médio e pH e como variável independente o tempo.

Também foi feita a análise de variância para cada variável seguida do teste de comparação múltipla de médias de Tukey quando ocorreu diferença significativa pela anova. Nos testes de comparação de amostras pareadas analisou-se primeiro a normalidade das diferenças entre os pares, pelo teste de Anderson-Darling. Em seguida, se as diferenças apresentaram normalidade foi utilizado o teste T pareado comparando as variáveis presentes no hemograma x pré-armazenamento e pré-armazenamento x pós-armazenamento. Nas amostras que não apresentaram normalidade utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas.

As análises foram feitas seguindo os procedimentos estatísticos descritos em Banzatto e Kronka (1989), Triola (1999) e Ayres et al. (2007), usando significância de 5%. Utilizou-se o portal Action (2014) que está associada ao programa R Development Core Team, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis, número de plaquetas no hemograma, pré e pós-armazenamento, não houve relação linear em função do tempo ($p\text{-valor}>0,05$), entretanto, sem influência do tempo em relação às variáveis. Para avaliação de normalidade das amostras aplicou-se o teste de Anderson-Darling, no qual se observou normalidade dos resíduos na comparação das variáveis referindo ao número de plaquetas no hemograma x número de plaquetas no PRP pré-armazenamento ($p\text{-valor}>0,05$). Portanto, aplicou-se o teste T e obteve-se diferença estatística das variáveis ($p\text{-valor}<0,05$). Já nas variáveis, número de plaquetas pré-armazenamento x número de plaquetas pós-armazenamento, não ocorreu normalidade pelo teste de Anderson-Darling ($p\text{-valor}<0,05$), sendo que com o teste de Wilcoxon obteve-se diferença estatística ($p\text{-volume} < 0,05$). As diferenças estatísticas observada nas últimas

variáveis analisadas foram para o aumento do número de plaquetas pós-armazenamento em relação às pré-armazenamento (Tabela 1).

Não há um valor de referência para o número de plaquetas existentes no PRP, porém, considera-se que o PRP atinja uma concentração plaquetária três a seis vezes maiores que a do sangue (MARX et al., 1998). Entretanto, Marx (2001) referiram que o PRP apresenta maior eficácia, quando a concentração de plaquetas encontra-se em torno de 1.000.000 μ L, em uma alíquota padrão de 6,0mL. Observações condizentes foram observadas nesta pesquisa, como a obtenção de uma concentração plaquetária de três vezes em um volume de 1,0mL de plasma em comparação com a encontrada no sangue total.

Tabela 1. Média (Méd.) e desvio padrão (Dp.) em relação ao período de dias de armazenamento sob refrigeração das variáveis, número de plaquetas no hemograma (Hem.), pré e pós-armazenamento e das dez amostras de plasma rico em plaquetas de coelhos. Unidade de medida: micrômetros cúbicos (μ m³)

Dias	Méd. Hem.	Dp. Hem.	Méd. Pré	Dp. Pré	Méd. Pós	Dp. Pós
3	291.000,0	96.005,2	813.333,3	391.566,5	842.000,0	444.332,0
6	224.000,0	35.679,1	613.000,0	221.763,3	600.666,6	266.535,8
9	209.666,6	39.310,7	686.000,0	247.879,0	709.333,3	284.106,2
12	230.333,3	40.525,7	504.333,3	124.957,3	398.666,6	78.767,5
15	291.000,0	96.005,2	1.009.666,6	334.049,8	1.092.000,0	369.048,7
18	217.333,3	9.814,9	631.000,0	122.049,1	683.333,3	147.513,8
21	294.333,3	52.974,8	961.333,3	429.466,3	1.027.000,0	504.173,5
24	294.333,3	52.974,8	953.000,0	181.099,4	1.014.333,3	251.064,4
27	194.666,6	42.122,8	574.000,0	247.655,0	639.666,6	306.818,0
30	195.666,6	42.453,8	588.000,0	94.978,9	628.000,0	239.025,1
	244.233,3 ^a	45.762,4	733.366,6 ^b	411.033,1	763.500,0 ^c	271.894,8

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença estatística.

Quanto à elevação do número de plaquetas observadas nas amostras pós armazenamento, Comar, Danchura e Silva (2009) afirmaram que a presença de fragmentos eritrocitários, citoplasmáticos de células leucêmicas, lipemia, bactérias, leveduras e micrócitos com volume próximo ao das plaquetas, podem ser contabilizadas, nos analisadores hematológicos, como plaquetas, conduzindo assim a resultados falsamente aumentados na contagem plaquetária. Neste experimento notou-se acréscimo da contagem de plaquetas nas amostras pós armazenamento, possivelmente devido a fragmentação de outras células plasmáticas como células brancas e hemárias.

As variáveis, volume plaquetário médio (VPM) no hemograma, pré e pós-armazenamento não apresentaram relação linear em função do tempo (p -valor>0,05), portanto, houve influência do fator período de tempo nas variáveis de VPM. Quanto ao teste

de normalidade de Anderson-Darling, comparado ao VPM do hemograma x VPM pré-armazenamento e VPM pré-armazenamento x VPM pós-armazenamento, apresentaram normalidade ($p\text{-valor}>0,05$). Assim, aplicou-se o teste T pareado no qual se obteve diferença estatística nas duas comparações ($p\text{-valor}<0,05$). Observou-se um aumento significativo no VPM pós-armazenamento independente do período de dias (Tabela 2).

Tabela 2. Média (Méd.) e desvio padrão (Dp.) em relação ao período de dias de armazenamento sob refrigeração das variáveis, volume plaquetário médio no hemograma (Hem.), pré e pós-armazenamento e das dez amostras de plasma rico em plaquetas de coelhos. Unidade de medida: fentolitros (fL).

Dias	Méd. VPM Hem.	Dp. VPM Hem.	Méd. VPM Pré	Dp. VPM Pré	Méd. VPM Pós	Dp. VPM Pós
3	6,43	0,25	6,47	0,06	9,30	0,26
6	6,80	0,43	6,73	0,30	10,70	0,46
9	6,83	0,40	6,63	0,21	11,03	0,66
12	6,40	0,26	6,66	0,38	9,90	0,78
15	6,43	0,25	6,83	0,35	10,70	1,15
18	6,73	1,15	6,66	1,01	10,23	1,44
21	6,73	0,25	7,16	0,51	11,13	1,03
24	6,73	0,25	7,30	0,26	10,90	1,15
27	6,60	0,20	7,03	0,25	9,03	0,65
30	6,26	0,76	6,46	0,97	9,23	0,85
	6,60 ^a	0,44	6,46 ^b	0,47	10,21 ^c	0,91

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença estatística.

O volume plaquetário médio é utilizado por tratar de uma variável biológica que determina a função e atividade plaquetárias (BATH et al., 2004). Fatores, como a tecnologia utilizada e variável pré-analíticas como efeito dos anticoagulantes, temperatura e tempo de estocagem do material, causam interferência na determinação do VPM (GULATI et al., 2002; VOGELAAR et al., 2002). O citrato de sódio, como anticoagulante, mantém as plaquetas com o formato esférico, o que poderia causar aumento no VPM (MACEY et al., 2002; GREISENEGGER et al., 2004). Plaquetas volumosas e agregados plaquetários apresentam maiores valores de VPM e contagens diminuídas (RACCHI; RAPEZZI, 2001; BAIN; PATH, 2005). Valores de VPM aumentam em um padrão tempo-dependente, devido ao edema plaquetário, entretanto, o acréscimo do tamanho das plaquetas é aproximadamente inferior a 0,5fL, quando a análise é realizada dentro de duas horas após a venopunção. A elevação do VPM observado nesta pesquisa corrobora com as citações de Greisenegger et al. (2004), que observaram aumento no pós-armazenamento em relação ao pré-armazenamento do volume

plaquetário médio, o que acredita-se ser causado pelo edema celular devido ao período de observação.

Para as variáveis pH plasmático pré e pós-armazenamento, não houve relação linear em função do tempo (p -valor>0,05). Já para análise de variância de cada variável em comparação múltipla de médias observou-se diferença estatística (p -valor< 0,05) para as amostras pós-armazenamento. Pode-se observar que houve diferença estatística na comparação do pH pós-armazenamento na comparação realizada entre os períodos, 30 e 6; 30 e 24; e 30 e 27 dias. Comparando-se o pH das amostras pré e pós-armazenamento ocorreu normalidade perante o teste de Anderson-Darlin (p -valor>0,05) e ao teste T pareado notou-se diferença estatística com p -valor<0,05. Em comparação o pH pós armazenamento apresentou discreta alcalinização (Tabela 3).

Tabela 3. Média (Méd.) e desvio padrão (Dp.) em relação ao período de dias de armazenamento sob refrigeração das variáveis, pH pré e pós-armazenamento e das dez amostras de plasma rico em plaquetas de coelhos.

Dias	Méd. pH Pré	Dp. pH Pré	Méd. pH Pós	Dp. pH Pós
3	7,51	0,04	7,62	0,22
6	7,65	0,13	7,94	0,07
9	7,62	0,14	7,75	0,09
12	7,57	0,10	7,76	0,16
15	7,51	0,04	7,79	0,23
18	7,57	0,07	7,76	0,16
21	7,51	0,08	7,69	0,03
24	7,51	0,08	7,86	0,17
27	7,46	0,08	7,99	0,30
30	7,54	0,12	7,35	0,07
	7,55 ^a	0,09	7,75 ^b	0,14

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença estatística.

Produtos metabólicos, como lactato, podem acumular-se durante o armazenamento à temperatura ambiente, ocasionando queda no pH (MURPHY; GARDNER, 1971). Níveis de pH abaixo de 6,0-6,2 (MURPHY et al., 1994), ou até 6,5 (PISCIOTTO et al., 1991), se encontram associados à diminuição da viabilidade plaquetária. Já em temperatura de 4°C o acúmulo de lactato é mínimo, e o pH não diminui (SLICHTER, 1981). Os produtos plaquetários armazenados à 4°C mostram melhor estabilidade do pH, taxa reduzida de glicólise, e melhor resposta quando estimulado pela adrenalina ou colágeno do que em comparação às plaquetas armazenadas à temperatura ambiente, entretanto, sugeriram que plaquetas refrigeradas apresentam melhor estabilidade celular (RUNJANTSEVA;

HOFFMEISTER, 2010). O desenvolvimento de materiais e bolsas para armazenagem de plaquetas, como recipientes que favoreçam a troca de oxigênio e dióxido de carbono e volumes de armazenamento maior de plaquetas estabilizam os valores de pH, portanto, resultaram em melhor viabilidade das plaquetas (MURPHY, 2002). O pH das amostras de PRP não atingiram níveis que ocasionassem diminuição da viabilidade plaquetária. A diferença estatística encontrada entre as amostras de 30 e 6; 30 e 24; e 30 e 27 dias de armazenamento foi devido a queda significativa da média de pH (7,35) das amostras referentes à 30 dias, o que pode ser justificado pela condição anaeróbica do meio com possível produção de lactato neste período.

A agregação plaquetária ocorreu em todas as amostras, dos três grupos, dentro de vinte segundos depois de adicionado tromboplastina cálcica (Figura 1).

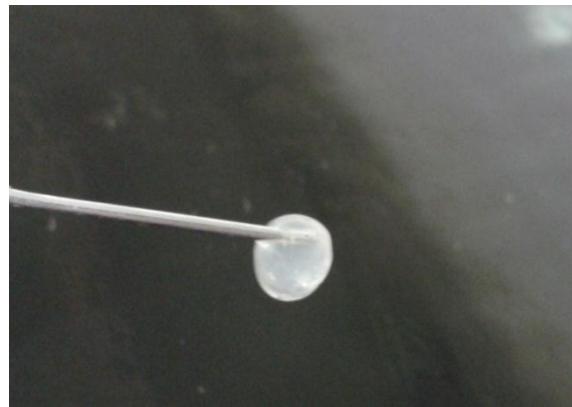


Figura 1. Gel plaquetário de coelho do grupo dois obtido após adição de tromboplastina cálcica da amostra 27º dia de armazenamento sob refrigeração.

A tromboplastina cálcica empregada para ativação plaquetária mostrou-se eficaz, bem como a concentração utilizada, como indicado por Aleixo et al.,(2011). Nunes Filho et al. (2007) utilizaram cloreto de cálcio 10% para ativação das plaquetas em PRP de cães, e também obtiveram êxito. Porém, segundo Yamada et al. (2012) o cloreto de cálcio é um fraco ativador plaquetário, sua principal função é antagonizar o anticoagulante utilizado, permitindo a formação do gel. A ativação, por exemplo, pela trombina, causa a mudança de forma das plaquetas e o desenvolvimento de pseudópodos, que promovem a agregação plaquetária e a subsequente libertação de grânulos contendo fatores de crescimento, através do sistema canalicular aberto (EVERTS et al., 2006). De acordo com Wallace et al. (1993), para as plaquetas serem consideradas clinicamente eficazes, devem exercer a função de coagulação, ou seja, impedir ou parar sangramento. Foi referido por Murphy e Gardner, (1971) que as plaquetas são metabolicamente ativas à temperatura ambiente, o que não ocorre em plaquetas armazenadas à 4°C, pois, à baixas temperaturas não ocorre a liberação de grânulos beta para o

meio de armazenamento. Nesta pesquisa, a agregação plaquetária ocorreu dentro do mesmo intervalo de tempo, tanto no pré e pós-armazenadas e independente do período de avaliação sugere-se que o PRP permaneceu intacto e viável durante o período. A degranulação plaquetária ocorre somente após a sua agregação/ativação, portanto acredita-se que o plasma rico em plaquetas permaneceu com os grânulos intraplaquetários, sendo importante na utilização nas cirurgias reparadoras e reconstrutivas.

Não houve crescimento bacteriano e de leveduras em nenhuma amostra, independente do período de armazenamento, porém observou-se crescimento de bolores nas amostras aos 21 dias nos grupos G1 e G3, (Figura 2).



Figura 2. Colônias fúngicas (setas vermelhas) em ágar batata dextrose do plasma rico em plaquetas de coelho do grupo um da amostra 21º dia de armazenamento sob refrigeração.

As plaquetas foram mantidas à temperatura ambiente, e pelo risco concomitante de crescimento bacteriano, o armazenamento tem sido limitado à cinco dias (RUMJANTSEVA; HOFFMEISTER, 2010). O isolamento de rotina de muitos patógenos envolve inoculação em placas de ágar sangue e ágar MacConkey, seguidos de incubação por 24-48 horas. Estes meios são utilizados para a identificação de bactérias, por meio da produção de pigmento e de odor tanto no ágar sangue quanto no ágar MacConkey e a produção de hemólise em ágar sangue. Os fungos geralmente são isolados em ágar dextrose Sabouraud ou ágar batata dextrose, o qual possui baixo pH que inibe o crescimento da maioria das bactérias (HIRST; MACLACHLAN; WALKER, 2004; QUINN et al., 2005). No preparo do ágar batata dextrose acrescenta-se 1,0mL de ácido tartárico 10% para cada 100mL de meio, para ocorrer acidificação e consequente inibição do crescimento bacteriano, ao final o meio possui pH de 4,0-4,5 (GAVA, 2002). Apesar de ter ocorrido crescimento de bolores nas amostras de 21 dias pós armazenamento dos grupos um e três, não foi observado alteração macroscópica ou de coloração das amostras. O pH das amostras foram de 7,66 e 7,73, respectivamente, o que não favorece o crescimento fúngico (QUINN et al., 2005). Portanto, supõem-se que houve

contaminação por esporos de fungos durante o armazenamento, e o crescimento dos bolores ocorreu quando foram semeados em meio de pH favorável. Foi possível observar que os microtubos (Eppendorf) mostraram-se eficazes quanto à contaminação bacteriana das amostras durante o armazenamento.

5 CONCLUSÃO

O plasma rico em plaquetas de coelhos pode ser armazenado sob refrigeração entre 4 e 6°C por manter o número de plaquetas, sem alteração significativa do pH e ausência de contaminação bacteriana e fúngica durante 18 dias, nas condições do presente experimento.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, G.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N.; MESQUITA, E.P.; OLIVEIRA, F.F.; ZUBIETA, L.M.V.; ALMEIDA, T.L.C.; GUIMARÃES, A.L.N.; MAIAL, F.C.; ZACARIAS, T.F.L.; SANTOS, S.M.L.G.; LIMA, C.P.S. Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n. 3, p.567-573, abr. 2011.

ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; ZALDUENDO, M.; FUENTE, M.; ORIVE, G.; AZOFRA, J.; ANDÍA, I. Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendo cell activities. **Jornal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 77, n. 2, p. 285-293, mai, 2006a.

ANITUA. E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; NURDEN, P.; ORIVE, G.; ANDÍA, I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 227-234, mai. 2006b

AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L.; SANTOS, A.A. **BIOESTAT 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Ong Mamiraua. 2007. p.364.

BAIN, B.J.; PATH, F.R.C. Diagnosis from the blood smear. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 353, n. 5, p. 498-507, ago., 2005.

BATH, P.; ALGERT, C.; CHAPMAN, N.; NEAL, B. Association of mean platelet volume with risk of stroke among 3,134 individuals with history of cerebrovascular disease. **Stroke**, Dallas, v.35, n.3, p.622-626, fev., 2004.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal: Funep. 1989. p.237.

BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R.J.; GOMES, H.C.; OLIVEIRA, A.C.; MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, B.N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1335-1340, ago. 2008.

BOUDREAUX, M. K. Platelets. In: WEISS, D. J.; Wardrop, K. J. **Schalm's Veterinary hematology**. ed. 6. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. Cáp. 6, p. 561 – 568.

COMAR, S.R.; DANCHURA, H.S.M.; SILVA, P.H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Santos, v.31, n.6, p.431-436, dez., 2009.

DALANHOL, M.; BARROS, M.; MAZUCHELLI, J.; SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; LARGURA, A. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Santos, v. 32, n.1, p. 16-22, mar. 2010.

DEROSSI, R.; COELHO, A.C.A.O.; MELLO, G.S.; FRAZÍLIO, F.O.; LEAL, C.R.B.; FACCO, G.G.; BRUM, K.B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.24, n.4, p.276-281, ago. 2009.

EURIDES, D.; GUIMARÃES, C.P.A.; BELETTI, M.E.; MUNDIM, A.V.; SOUZA, L.A.; GONÇAÇVES, G.F.; EURIDES, G.P. Plasma rico em plaquetas autólogas na cicatrização do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 52, n.1, p. 48-56, 2015

EVERTS, P.A.M.; KNAPE, J.T.A.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J.P.A.M.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, E.P.; BOX, H.A.M.; ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The journal of the American Society of Extra-corporeal Technology**, Richmond, v.38, n.2, p.174-187, jun., 2006.

FELDMAN, B.F; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.1344.

GAVA, M.A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

GEREMICCA, W.; FONTE, C.; VECCHIO, S. Blood componentes for topical use in tissue regeneration: Evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. **Blood Transfusion**, [S.l], v.8, n.2, p.107-112, fev., 2010

GREISENEGGER, S.; ENDLER, G.; HSIEH, K.; TENTSCHERT, S.; MANNHALTER, C. LALOUSCHEK, W. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events?. **Stroke**, Dallas, v.35, n.7, p.1688-1691, jul., 2004.

GULATI, G.L.; HYLAND, L.J.; KOCHER, W.; SCHWARTING, R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v.126, n.3, p.336-42, mar., 2002.

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

HIRST, D.C.; MACLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L. **Veterinary Macrobiology**. 2.d. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. p.15-25.

KUBOTA, S.; KAWATA, K.; YANAGITA, T.; DOI, H.; KITO, T.; TAKIGAWA, M. Abundant and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN20 by platelets. **The Journal of Biochemistry**, Tóquio, v.136, n.3, p.279-282, Jun. 2004.

MACEY, M.; AZAM, U.; McCARTHY, D.; WEBB, L.; CHAPMAN, E.S.; OKRONGLY, D. ZELMANOVIC, D.; NEWLAND, A. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the Advia 120 hematology system. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.48, n.6, p.891-899, jun., 2002.

MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteo-articulares em animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1279-1286, jul. 2009.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?. **Implant Dentistry**, Baltimore, v.10, n.4, p.225-228, dez., 2001.

MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R., STRAUSS, J.E.; GEORGEFF, K.R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, Saint Louis, v.85, n.6, p.638-646, jun., 1998.

MASSUMOTO, C. M.; MIZUKAMI, S.; CAMPOS, M.F.; SILVA, L.A.G.; MENDRONE JÚNIOR, A.; SAKASHITA, A.; ZAMBON, E.; OSTRONOFF, M.; MACEDO, M.C.A.; MEDEIROS, R.; DORLHIAC, P.; CHAMONE, D.; DULLEY, F. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: Experiência em 86 congelamentos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, n.2, p.93-98, jun. 1997.

MURPHY, S. What's so bad about old platelets? **Transfusion**, Arlington, v.42, n.7, p. 809-811, jun., 2002.

MURPHY, S.; GARDNER, F. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.280, n.20, p.1094-1098, maio, 1971.

MURPHY, S.; REBULLA, P.; BERTOLINI, F.; HOLME, S.; MOROFF, G.; SNYDER, E.; STROMBERG, R. In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates. The BEST (biomedical excellence for safer transfusion) task force of the international society of blood transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**, [s.l.], v.8, n.1, p.29-36, jan., 1994.

NUNES FILHO, D.P.; LUPPINO, F.; YAEDÚ, R.Y.F.; CARVALHO, P.S.P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Implant News**, São Paulo, v.4, n.3, p.263-269, abr., 2007.

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

PISCIOTTO, P.T.; SNYDER, E.L.; NAPYCHANK, P.A.; HOPFER, S.M. In vitro characteristics volume reduced platelet concentrate stored in syringes. **Transfusion**, Arlington, v.31, n.5, p.404-408, jun., 1991.

PORTAL ACTION. 2014. São Carlos, São Paulo, Brasil: Portal Action, 2014. www.portalaction.com.br.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed. 2005, p.512.

RACCHI, O.; RAPEZZI, D. Megathrombocytes and spurious thrombocytopenia. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v.66, n.2, p.140-141, fev., 2001.

R DEVELOPMENT CORE TEAM 2014. [S.I]: R Development, 2014.

ROTHWELL, S.W.; MAGLASANG, P.; REID, T.J.; GOROGIAS, M.; KRISHNAMURTI, C. Correlation of in vivo and vitro functions of fresh and stored human platelets. **Transfusion**, Malden v.40, n.8, p.988-993, ago, 2000.

RUMJANTSEVA, V.; HOFFMEISTER, K.M. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. **Transfusion and Apheresis Science**, Ottawa, v.42, n.1, p.63-70, fev. 2010.

SCOTT, A.; KHAN, A.M.; ROBERTS, C.M.; COOK, J.L.; DURONIO, V. What do we mean by the term “inflammation”? A contemporary basic science update for sports medicine. **British Journal of Sports Medicine**, Loughborough, v.38, n.3, p. 72-380, jun. 2004.

SILVA, A. C. J. R. S. Preservação de fertilidade. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.28, n.6, p.365-372, jun. 2006.

SLICHTER, S.J. In vitro measurements of platelet concentrates stored at 4 and 22°C: correlation with posttransfusion platelet viability and function. **Vox Sanguinis: international journal of blood transfusion and immunohaematology**, Basel, v.40, n.1, p.72-86, 1981.

SUTTER W. W. Autologous Cell-based therapy for tendon and ligament injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**, Ocala, v. 6, n.3, p.198-208, Set. 2007.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999. p. 410.

VANAT, N.; MEDEIROS, T.N.S.; BALARIN, M.R.S.; PEREIRA, P.M.; BIASI, F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.1, p.313-322, mar. 2012.

VOGELAAR, S. A.; POSTHUMA, D.; BOOMSMA, D.; KLUFT, C. Blood stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. **Vascular Pharmacology**, New York, v.39, n.3, p.123-125, ago., 2002.

YAMADA, A.L.M.; CARVALHO, A.M.; OLIVEIRA, P.G.G.; FELISBINO, S.L.; QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; HUSSNI, C.A.; ALVES, A.L.G. Plasma rico em

plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.64, n.2, p.323-332, abr., 2012.

WALLACE, E.L.; SURGENOR, D.M.; HAO, H.S.; AN, J.; CHAMPMAN, R.H.; CHURCHILL, W.H. Collection and transfusion of blood and blood components in the United States, 1989. **Transfusion**, Malden, v.33, n.2, p.139-144, 1993.