

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

RAISSA BRAUNER KAMLA VIEIRA

**PRESERVAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE COELHOS EM
NITROGÊNIO LÍQUIDO E FREEZER**

UBERLÂNDIA

2017

RAISSA BRAUNER KAMLA VIEIRA

**PRESERVAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE COELHOS EM
NITROGÊNIO LÍQUIDO E FREEZER**

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

2017

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

V658p
2017

Vieira, Raissa Brauner Kamla, 1991
Preservação de plasma rico em plaquetas de coelhos em nitrogênio líquido e freezer / Raissa Brauner Kamla Vieira. - 2017.
29 p.

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

1. Veterinária - Teses. 2. Plasma - Teses. 3. Confinamento de plasma - Teses. 4. Eletroforese - Teses. I. Eurides, Duvaldo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

**PRESERVAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE COELHOS EM
NITROGÊNIO LÍQUIDO E FREEZER**

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

Uberlândia, 23 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Duvaldo Eurides

Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV)/Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)/Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Paula Dechichi
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)/Universidade Federal de Uberlândia

Aos animais, em especial aos envolvidos em pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por ter sido minha segunda casa por sete anos seguidos, desde a graduação até agora, me oferecendo oportunidades de desenvolvimento intelectual e amadurecimento profissional e pessoal. Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária desta universidade e todos os profissionais que me conduziram até aqui com primazia.

À Professora Anna Monteiro Correia Lima, ao Professor Francisco Claudio Dantas Mota e à Doutora Danielle Reis Napolitano, um agradecimento especial por sempre estarem ao meu lado nos momentos de dificuldade e sempre oferecerem, além de conhecimento, uma palavra amiga e um abraço, apaziguando as dificuldades do caminho.

Ao Professor Duvaldo Eurides, meu obrigada pela condução durante esse período, me ensinando técnica e paciência na trilha em busca de um futuro como pesquisadora e professora.

Aos Professores Fábio de Oliveira, Marcelo Emílio Beletti, Daise Aparecida Rossi e Antônio Vicente Mundim, muito obrigada pelo auxílio e disponibilidade dos seus respectivos laboratórios para que a pesquisa pudesse ser realizada e concluída. Agradeço ainda aos funcionários, técnicos e pós graduandos do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO), do Laboratório de Biofísica e do Laboratório de Microscopia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e aos residentes do Laboratório de Patologia Animal, em especial Gelsner Skan, por toda valiosa contribuição.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, em especial à secretária Célia Regina Macedo por ser sempre solícita e agradável. 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.

Muito obrigada à minha família, por sempre estar próxima. À minha mãe, por ser um exemplo de força e superação, que me ensinou a nunca desistir e sempre estudar, cada vez mais, em busca de um futuro melhor. Aos meus irmãos, em especial Guilherme, pela disposição e bom humor sempre ao me ajudar. Somos unidos e, por isso, mais fortes.

Sou grata ainda a todas as amizades que se mantiveram e às novas concretizadas nesse período, que me apoiaram, me fizeram crescer e sorrir. Muito obrigada à aluna Laura Machado, por ter me aceitado como coorientadora, me proporcionando aprendizado ao ensinar. Obrigada ao meu companheiro Diego pelas palavras amigas, sinceras e carinhosas.

Obrigada a Deus pela possibilidade de conquistar mais um objetivo, pelas glórias e adversidades que me trouxeram até aqui como a pessoa que sou hoje.

“Coragem é fazer uma coisa mesmo estando derrotado antes de começar (...) e mesmo assim ir até o fim, apesar de tudo. Você raramente vai vencer, mas às vezes vai conseguir.”

Harper Lee

RESUMO

Plasma rico em plaquetas (PRP) é um subproduto sanguíneo obtido por meio de centrifugações e subsequente separação dos elementos sanguíneos. As plaquetas são responsáveis pela produção e liberação de fatores que favorecem o reparo de diferentes tecidos. Este estudo teve como objetivo comparar e avaliar a viabilidade do PRP após congelamento e criopreservação. Foram utilizados 12 coelhos da raça Nova Zelândia adultos saudáveis para coleta de 12 mL de sangue de cada animal por meio de punção cardíaca. Para protocolo de congelamento foi usada centrífuga Centribio 14 cm de diâmetro, e para o protocolo de preservação em nitrogênio foi usada centrífuga fria a 4°C 18 cm de diâmetro Centurion Scientific K3 Series. Foram feitas, para ambos os protocolos, duas centrifugações, a 2000 rpm por 20 minutos cada. O PRP obtido foi submetido a dois protocolos de preservação, sendo um o congelamento em freezer a -20°C (protocolo F) e outro a redução gradativa de temperatura à criopreservação a -196°C (protocolo N), usando DMSO a 6% como crioprotetor e analisados nos momentos zero (0) e decorridos 15, 30, 45 e 60 dias de preservadas. Foram realizadas contagens em câmara de Neubauer, análises através dos testes do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) para viabilidade celular, eletroforese SDS-PAGE para identificação proteica e cultura para fungos e mesófilas. Verificou-se que o PRP preservado sob protocolo N apresentou maior número de plaquetas preservadas quando comparado ao protocolo F ($p<0,05$). Ao teste de MTT o protocolo N exibiu maior variação metabólica, porém, maior viabilidade das plaquetas, confirmado pela eletroforese, onde observou-se prevalência de proteínas nas amostras criopreservadas. Ao teste microbiológico, todas as amostras se mostraram livres de contaminantes de origem bacteriana e fúngica. O método de preservação em nitrogênio líquido foi mais eficaz do que em freezer, mantendo as plaquetas metabolicamente mais ativas, as proteínas de ação reparadora tecidual e a esterilidade.

Palavras-chave: criopreservação, congelamento, PRP, MTT, eletroforese.

ABSTRACT

Platelet rich plasma (PRP) is a blood by-product obtained from centrifugations and subsequent separation of blood elements. Platelets are responsible for the production and release of factors that favor the repair of different tissues. This study aimed to compare and evaluate the viability of PRP after freezing and cryopreservation. Twelve healthy adult New Zealand rabbits were used to collect 12 mL of blood from each animal through cardiac puncture. Centribio centrifuge with 14 cm in diameter was used for the freezing protocol, and Centurion Scientific K3 Series cold centrifuge at 4 ° C 18 cm in diameter was used for the nitrogen preservation protocol. For both protocols, two centrifugations were done at 2000 rpm for 20 minutes each. The obtained PRP was submitted to two preservation protocols, one being the freezing at -20 ° C (protocol F) and the other the gradual reduction of temperature to cryopreservation at -196 ° C (protocol N). In both protocols were used 6% DMSO as cryoprotectant and analysis made at zero (0) times and after 15, 30, 45 and 60 days after preserved. Neubauer chamber counts were performed, tests of 3- (4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide (MTT) for cell viability, SDS-PAGE electrophoresis for protein identification and culture for fungi and mesophiles. It was verified that PRP preserved under N protocol had a higher number of platelets preserved when compared to protocol F ($p <0.05$). In the MTT test, the N protocol showed greater metabolic variation, but a higher platelet viability, confirmed by electrophoresis, where protein prevalence was observed in the cryopreserved samples. At the microbiological test, all the samples were free of contaminants of bacterial and fungal origin. The preservation method in liquid nitrogen was more effective than in freezer, keeping platelets more active metabolically, tissues repairing proteins presents and sterility.

Key-word: cryopreservation, freezing, PRP, MTT, electrophoresis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3	METODOLOGIA.....	14
3.1	Manutenção dos animais e obtenção de sangue.....	14
3.2	Protocolos de obtenção e preservação de PRP.....	15
3.3	Análise de MTT.....	16
3.4	Eletroforese.....	16
3.5	Análise microbiológica.....	17
3.6	Análise estatística.....	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5	CONCLUSÃO.....	23
	REFERENCIAS.....	24
	ANEXO 1	

1. INTRODUÇÃO

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos do megacariócito, relacionados a coagulação, produção e liberação de fatores de crescimento (FC) e reparo tecidual. Plasma rico em plaquetas (PRP) é um subproduto sanguíneo obtido por meio de centrifugações e subsequente separação dos outros elementos sanguíneos, como hemácias e leucócitos (CAVALCANTI, 2010). O PRP detém alto potencial de reparação e reestruturação de tecidos moles ou duros (BARBOSA et al., 2008).

Na medicina humana e veterinária têm-se aprimorado protocolos para obtenção e aplicação de PRP em feridas cutâneas (PAZZINI et al., 2016) e oftálmicas (EURIDES et al., 2010). Também é aplicado na odontologia como terapia suporte para melhor reparação dos tecidos após procedimento cirúrgico (GUERREIRO et al., 2014).

Embora a medicina tenha se dedicado ao aperfeiçoamento do método de obtenção do PRP, não existe padronização de protocolos, principalmente nos procedimentos de criopreservação. Além da contaminação, microbiológica ou por células do sangue, são encontradas dificuldades como a redução do número de plaquetas viáveis e alteração das condições do meio causadas pelas baixas temperaturas (SILVA et al., 2007).

A preservação de plaquetas constituintes do PRP é um desafio ainda a ser superado, sendo realizada por meio de resfriamento, congelamento (MASSUMOTO et al., 1997) ou mesmo em meio de cultura, sob condições ótimas de temperatura e pressão. Por exemplo, células híbridas têm sido cultivadas desde a década de 50, obtendo-se com sucesso sua preservação em meios de cultura em estufa ou congelada em nitrogênio líquido (SKLOOT, 2011). Estas células têm sido cultivadas, congeladas e suas várias linhagens difundidas em todo mundo. Um exemplo dessas células é a HeLa, linhagem celular de câncer de colo de útero preservada e utilizada em pesquisas desde 1955 (SKLOOT, 2011). Protocolos bem estabelecidos de criopreservação e manutenção de células compreendem importante fator para longevidade, minimizando a contaminação e permitindo vigor após descongelamento.

O plasma rico em plaquetas é frequentemente utilizado na medicina veterinária em cirurgias ortopédicas (BARBOSA et al., 2008). A criopreservação dessa substância pode contribuir para pacientes sob procedimento cirúrgico, onde todo tempo de anestesia poupadão é valioso. Além disso, o congelamento de PRP pode preservar o paciente de punção venosa frequente em casos de tratamentos clínicos, que exigem mais de uma aplicação, como tratamento de lesões corneanas (MERLINI, 2014).

Estabelecer um protocolo de criopreservação e determinar o tempo máximo que as plaquetas possam permanecer congeladas, sem que haja perda da viabilidade, pode contribuir para a medicina com implementação de um banco de PRP. Além disso, a obtenção do PRP tornar-se mais eficiente com um protocolo confiável, reproduzível e acessível.

Tendo em vista que o plasma rico em plaquetas é um subproduto sanguíneo já obtido e utilizado em medicina e odontologia, é interessante avançar as pesquisas, no intuito de dar continuidade ao conhecimento científico sobre PRP. Para tanto, este estudo teve como objetivo comparar dois métodos de conservação de plasma rico em plaqueta de coelhos, avaliando-se a viabilidade celular das plaquetas, a presença de fatores de crescimento e esterilidade, após preservação em nitrogênio líquido e congelamento em freezer.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O megacariócito, uma célula grande que amadurece por replicação endomitótica sincrônica (replicação do DNA sem divisão nuclear ou citoplasmática) na medula óssea, é a célula formadora da plaqueta. Quando maduro, desenvolve projeções citoplasmáticas que se fragmentam, formando entre 1000 a 5000 plaquetas. Este processo demora em torno de dez dias e o principal regulador da produção de plaquetas é a trombopoetina, produzida pelo fígado e rins (HOFFBRAND, 2008).

Com diâmetros de 3,0 x 0,5 µm, as plaquetas são muito pequenas e discoides, apresentando glicoproteínas de membrana, importantes para adesão e agregação no início do processo de hemostasia. A glicoproteína Ia é importante para adesão ao colágeno, enquanto as glicoproteínas Ib e IIb são importantes na ligação das plaquetas ao fator de Von Willebrand e ao endotélio vascular. Além disso, o sítio de ligação das glicoprotéinas IIb e IIIa também são receptores de fibrinogênio, importante na agregação plaqueta-plaqueta (HOFFBRAND, 2008).

Segundo Scott e colaboradores (2004), as plaquetas são responsáveis pelo armazenamento e expressão de produtos de membrana relacionados aos processos de dor, hemostasia primária, recrutamento de células do sistema imunológico, além de regularização do tônus vascular e neovascularização. Também intervêm na produção de matriz extracelular, proliferação de células mesenquimais e pluripotentes, promovendo a diferenciação celular (MAIA; SOUZA, 2009; VANAT et al., 2012). Essas atividades são

promovidas pelas substâncias contidas nos grânulos plaquetários. Três são os tipos de grânulos presentes nas plaquetas, sendo o mais numeroso e específico o grânulo alfa, que contém antagonista da heparina (PF4), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), β -tromboglobulina, fibrinogênio, fator de Von Willebrand e outros fatores de coagulação. Os outros grânulos, menos numerosos, são os grânulos densos, com fatores de coagulação, e os lisossomos (HOFFBRAND, 2008; VANAT et al., 2012).

Na degranulação plaquetária são liberados fatores de crescimento como de transformação beta, derivado da plaqueta, epidermal, transformação alfa, vascular endotelial, além de fibrinogênio, tromboplastina plaquetária, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (HARRINSON; CRAMER, 1993). Também estão presentes nas plaquetas outros fatores, como o de crescimento fibroblástico (EVERTS et al., 2006), o de crescimento de tecido conjuntivo e o semelhante à insulina I (KUBOTA et al., 2004).

O PRP é obtido por meio de centrifugações do sangue total e separação de seus componentes por gradiente de concentração. Dessa maneira, o produto final dessas centrifugações consiste em um pequeno volume de plasma com grande densidade de plaquetas, logo, rico em fatores de crescimento (VANAT et al., 2012). A obtenção desse produto sanguíneo é fácil, pouco oneroso, além de ter ampla aplicação, uma vez que o método baseia-se em centrifugações (MAIA; SOUZA, 2009).

É importante ressaltar que o PRP não contém leucócitos, melhorando a homogeneidade desse extrato sanguíneo e reduzindo o risco de reações. Essa é uma informação relevante, pois os neutrófilos expressam enzimas degradantes de matriz, como as metaloproteinases de matriz, e liberam espécies reativas de oxigênio que destroem as células vizinhas, sendo estas de tecido saudável ou lesionado (SCOTT et al., 2004).

O PRP tem sido aplicado em medicina humana e odontologia há algum tempo, principalmente em procedimentos cirúrgicos de reparação óssea (MAIA; SOUZA, 2009). Segundo Vanat e colaboradores (2012), o PRP tem sido usado ainda como auxiliar na reparação em transplantes de córnea e de feridas em diabéticos. Também, segundo Merlini e colaboradores (2014) demonstraram o efeito reparador do PRP sobre úlceras de córneas caninas, apresentando melhorias em até dez dias, sendo aplicado na forma de colírio ou tampão, para tratamento clínico e cirúrgico. Por ser um produto autógeno, o PRP é biocompatível e seguro, não apresentando nenhum risco de reação imunológica ao paciente (DEROSSI et al., 2009).

A associação de fatores de crescimento em estudos *in vitro* apresentou a proliferação de células de tendões humanos e produção de fatores angiogênicos. 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* (ANITUA et al., 2006). Em animais, o concentrado de plaquetas tem sido usado com bons resultados como apoio terapêutico no tratamento de laminita crônica (CARMONA, LÓPEZ e SAMUDIO, 2013). Merlini e colaboradores (2014) demonstraram o efeito reparador do PRP sobre úlceras de córneas caninas.

Embora o PRP seja costumeiramente preparado momentos antes de sua utilização, existem relatos sobre a refrigeração desse produto, visando seu armazenamento. Contudo, a criopreservação tem sido considerada como um método em potencial para a preservação, senão uma opção para o prolongamento da viabilidade das plaquetas (ROTHWELL et al., 2000), mesmo que estes processos possam trazer implicações para o material a ser conservado (FANTINI et al., 2016).

Variações térmicas abruptas e o rápido congelamento celular podem interferir no transporte de água através da membrana celular, propiciando a formação de cristais de gelo e depósitos de sais no interior da célula, podendo levar à ruptura mecânica das estruturas celulares. No processo de congelamento gradativo, onde há o decréscimo gradual e constante da temperatura, a formação de gelo é primariamente extracelular, provocando menor dano às células (MASSUMOTO et al., 1997). Para que haja a queda gradativa da temperatura e redução das injúrias causadas às células em virtude do processo de congelamento, são adicionadas ao meio celular soluções crioprotetoras. São produtos com alta solubilidade em água e baixa citotoxicidade, que impedem a formação de cristais de gelo no interior das células, processo esse chamado vitrificação (ZHOU et al., 2010).

Os crioprotetores podem ser classificados como álcoois (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanodiol e glicerol), açúcares (glicose, lactose e sacarose) e o dimetil sulfóxido (DMSO). Os crioprotetores podem ser classificados ainda em agentes penetrantes e não penetrantes, de acordo com a permeabilidade celular (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006). O dimetil sulfóxido é considerado um crioprotetor penetrante, responsável pela redução do grau de desidratação celular. Por isso, sua aplicação em meio às células hematopoiéticas, por exemplo, gera uma adequada criopreservação (MASSUMOTO et al., 1997).

Os índices de viabilidade celular são definidos pelo comportamento celular durante o processo de congelamento e descongelamento, onde se tem maior probabilidade de morte celular concentrada no início do congelamento e período do descongelamento, onde há o retorno às ações fisiológicas (ÁVILA-PORRILLO et al., 2006). Aleixo e colaboradores (2011) recomendam, como técnica para avaliar a qualidade do PRP, a observação morfológica das plaquetas em esfregaço sanguíneo. Isso se explica pelo fato das plaquetas emitirem pseudópodes citoplasmáticos quando estão ativadas.

A morfologia das plaquetas pode ser avaliada como no trabalho de Rothwell e seus colaboradores (2000), onde plaquetas humanas, tratadas ou não com DMSO, congeladas a -145°C durante 14 dias ou mantidas a 4°C durante 14 dias, foram avaliadas. Nesse estudo, observou-se que as plaquetas de todas as amostras apresentaram alterações morfológicas, sendo que as plaquetas congeladas não tratadas com DMSO não mantiveram sua função hemostática, enquanto que as amostras congeladas tratadas e as mantidas a 4°C mantiveram suas funções hemostáticas, comparadas às plaquetas frescas, pois as alterações morfológicas não alteraram sua função hemostática.

As plaquetas são ricas em fatores de agregação, coagulação e reparação tecidual e o plasma rico em plaquetas é um biomaterial alternativo que pode ajudar na aceleração do reparo de tecidos pela orientação e adesão de células mesenquimais, responsáveis pela reparação tecidual (ANDRADE et al., 2016). Assim, seria interessante estudos no sentido de desenvolver protocolos de obtenção e armazenamento de PRP para ampliar suas possibilidades de utilização.

3. METODOLOGIA

3.1 Manutenção dos animais e obtenção de sangue

Com aprovação pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), protocolo 057/15, foram utilizados para obtenção de sangue o total de 12 coelhos brancos da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas adultos, pesando entre 3,5 a 4,0 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração para coelho e água a vontade e submetidos ao hemograma completo e, após constatados saudáveis, iniciou-se as coletas de sangue para preparo de PRP, as quais tinham intervalo de um a dois meses para cada animal.

Para cada experimento era coletado sangue de quatro animais. Cada animal foi submetido a anestesia com cloridrato de xilazina (3,0 mg/kg IM) e cloridrato de cetamina

(10 mg/kg IM) e posicionados em decúbito lateral esquerdo para assepsia com álcool etílico 70% na região do quinto ao sétimo espaços intercostais. Através de punção intracardíaca realizou-se a coleta de 12 mL de sangue por animal com tubos de VHS a vácuo e agulha de coleta específica (25 x 0,8 mm). Cada tubo com volume total de 3,5 ml, sendo 3,0 mL de sangue e 0,5 ml previamente preenchido com anticoagulante (citrato de sódio 3,2%) (ANDRADE et al., 2016).

3.2 Protocolos de obtenção e preservação de PRP

Os tubos de coleta com sangue foram encaminhados ao Laboratório de Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia para preparo de PRP. O sangue dos quatro animais foi transferido para tubos Falcon® de 15 mL estéreis até completar 12 mL, procedimento realizado em fluxo laminar esterilizado com álcool etílico 70% e luz ultravioleta (UV), por 20 minutos. Foi utilizado sangue total dos quatro animais misturado para que não houvesse baias por seleção de animal para cada protocolo. Logo, para ambos os protocolos foram usados os mesmos animais. Os tubos foram separados em dois grupos, sendo o protocolo F, com PRP preparado em centrifuga comum (Centribio 14 cm de diâmetro) seguido de congelamento em freezer -20 °C, e o protocolo N, com PRP preparado em centrifuga resfriada (4 °C 18 cm de diâmetro Centurion Scientific K3 Series), congelado em freezer a -80 °C durante 12 horas e então imergido em nitrogênio líquido a -196°C.

Em ambos os protocolos, a primeira e segunda centrifugações foram de 2000 rpm por 20 minutos. A primeira resultou em ambos os grupos, na divisão do sangue em três fases, onde a superior era constituída de plasma, a intermediária formada pelo anel leucocitário e no fundo do tubo, as hemácias. Em fluxo laminar previamente esterilizado com álcool etílico 70% e luz UV por 20 minutos, o plasma foi aspirado e transferido para novos tubos Falcon® de 15 mL estéreis, que foram submetidos à segunda centrifugação. Em seguida, os tubos foram retornados ao fluxo laminar previamente esterilizado, onde descartou-se dois terços do plasma sobrenadante e, com o volume final, ressuspendeu-se o botão plaquetário formado no fundo do tubo (SILVA et al., 2007).

Ao total de dois mL de plasma rico em plaqueta obtido foi adicionado 120 µL (6%) de criopreservante DMSO. A amostra de cada grupo foi fracionada em cinco criotubos, correspondendo ao momento inicial zero (0), 15, 30, 45 e 60 dias submetidos a baixas temperaturas de maneira ininterrupta. Nos períodos experimentais, o tubo correspondente

foi descongelado a temperatura ambiente do laboratório de 25 °C e realizadas as contagens e os experimentos de conversão de brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), eletroforese e microbiologia.

A contagem, tanto do sangue total quanto das amostras de PRP, foi feita em câmara de Neubauer. Para tanto foi diluído 20 µL de PRP ou sangue total em dois mL de diluente oxalato de amônio a 1% em tubo de ensaio de vidro com tampa de borracha. A seguir, a solução foi homogeneizada por inversão do tubo, preencheu-se a câmara de Neubauer com auxílio de tubo de vidro capilar e foi mantida em câmara úmida por 20 minutos antes da contagem. A contagem foi feita em cinco quadrados médios de cada lado da câmara. A soma dos valores de cada lado foi multiplicada por 2525 (UFRGS, 2016). Este procedimento foi repetido quatro vezes, possibilitando análise estatística.

3.3 Análise de MTT

Este ensaio é baseado na conversão de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) em cálculos de formazan de MTT por meio da metabolização de enzimas mitocondriais (Lee, 2009), para verificar a viabilidade celular. Em placa de 96 poços de fundo em V, foi colocado 180 µl/poço de amostra e 20 µl/poço de MTT 1,0 mg/mL. Para controle foi usado 180 µl/poço de tampão PBS com 20 µl/poço de MTT 1,0 mg/mL. Foram feitos três poços por amostra e três para controle. A placa foi mantida em estufa a 37 °C a 5% de CO₂ por um período máximo de quatro horas. Após esse período, foi realizada leitura de absorbância cromatográfica em leitor de placa (Molecular Devices, VERSA max tunable microplate reader) no programa soft max pro 5,0 a 570 nm (RISS et al., 2013). Este procedimento foi repetido quatro vezes, possibilitando análise estatística.

3.4 Eletroforese

Para confirmar a viabilidade celular das plaquetas, foi aplicado às amostras o teste de eletroforese, objetivando-se detectar proteínas liberadas pelas plaquetas, como fatores de crescimento, ou sua ausência com o passar dos momentos de observação (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Para evitar inferência de proteínas presentes previamente no plasma (como a albumina) após descongeladas à temperatura ambiente de 25°C, as amostras foram novamente centrifugadas a 2000rpm por 20 minutos (Centribio 14 cm de diâmetro), retirado o plasma e o botão plaquetário formado ressuspandido em tampão PBS.

Posteriormente, foi adicionado tampão de amostra na proporção de 1:1 e aquecido em banho-maria a 100 °C por cinco minutos. Logo após, as amostras foram armazenadas em freezer – 20 °C até o preparo da última amostra (60 dias) tanto as que seguiram o protocolo em freezer quanto as em nitrogênio líquido. Depois de todas preparadas, foram submetidas à corrida em gel de poliacrilamida à concentração de 12% em tampão Tris 0,375 M, pH 8,8 ± 0,1, persulfato de amônio 0,06% e N, N, N', N'-tetrametilelenodiamina 0,07% (TEMED). As eletroforeses foram realizadas a 30 mA e 200 V por uma h/gel em cuba vertical. Logo após a corrida, os géis foram imersos em solução corante azul brilhante por 30 minutos e descorados com solução de álcool 30% (MIRANDA et al., 2011). Em seguida, foram lavados com água destilada e os resultados registrados por fotografia.

3.5 Análise microbiológica

Foram realizados testes para detecção de crescimento fúngico e bacteriano, em triplicata. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente do laboratório (25 °C), os criotubos acomodados em recipiente de isopor e transportador ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os meios utilizados passaram por teste de esterilidade, sendo mantidos previamente por dois dias em estufa a 37 °C.

Para avaliação da presença de fungos, em capela de fluxo laminar esterilizada com álcool 70% e aplicação de luz UV por 20 minutos, foi aplicada um mL de amostra diluída em três placas de Petri, contendo meio Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) solidificado. Para cada um mL de amostra foram usadas três placas, sendo 300 µL de amostra sobre a superfície de duas placas e 400 µL sobre a superfície da terceira placa. A amostra foi espalhada de forma homogênea sobre toda a superfície do ágar com uma alça agulha. As três placas contendo diluições de uma mesma amostra foram tampadas, identificadas, empilhadas e mantidas em estufa 25 °C por cinco dias. Após esse período, foi verificado em aparelho contador de colônias o crescimento de colônias nas placas.

Para avaliação de presença de bactérias, foi realizado teste para averiguação de mesófilas totais. Em capela de fluxo laminar esterilizada, as placas de Petri foram preenchidas com um mL de amostra e 20 mL de meio Plate Count Agar (PCA) liquefeito e estéril. A placa foi delicadamente movimentada para homogeneizar a amostra ao meio e, quando solidificado, a placa foi tampada, identificada e mantida com a tampa virada para

baixo em estufa 35 °C durante dois dias. Após esse período, foi verificado em aparelho contador de colônias, o crescimento de colônias nas placas.

3.6 Análise estatística

Foi usado delineamento inteiramente ao acaso no esquema de parcela subdividida no tempo, sendo as parcelas F e N e as subparcelas nos períodos de congelamento 0 (zero), 15, 30, 45 e 60 dias, com quatro repetições. Para a comparação de médias foi utilizado teste de Tukey com 5% de significância (BANZATTO e KRONKA, 1989) com análises no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao tempo e rotação de centrifugação para obtenção do PRP pode-se afirmar que, apesar da diferença dos diâmetros das centrífugas, o tempo e rotação foram adequados, já que houve a separação dos componentes sanguíneos, tornando possível a produção do plasma rico em plaquetas sem interferência de células sanguíneas ou alteração das plaquetas à observação em câmara de Neubauer.

Após testes com MTT foi possível identificar a alteração da coloração das amostras de PRP, tanto do protocolo N quanto no protocolo F, em todos os dias, gerada pela metabolização da substância pelas plaquetas. Em contrapartida, não houve alteração de coloração dos poços contendo apenas PBS e MTT (controle), mostrando que a alteração da cor não ocorre por reação química do MTT, mas devido ao seu processamento celular.

Foram analisadas as predisposições da análise de variâncias, sendo à normalidade, homogeneidade de variâncias pelos testes de Anderson Darling e teste de Levene considerando 5% de significância. O teste de Anderson Darling mostrou normalidade para a absorbância e não normalidade para a contagem. Dessa forma, para haver a normalidade, os dados de contagem foram transformados em logaritmo, conforme recomenda Banzatto e Kronka (1989). Para absorbância houve diferença (tabela 1) enquanto para contagem não houve (tabela 2).

Tabela 1. Comparação da análise cromatográfica de MTT entre os protocolos F (congelamento em freezer a -20 °C) e N (nitrogênio líquido a -196°C) e entre os períodos de tratamento 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

Absorbância			
Dias	F	N	Médias
0	2,148±0,919 aA	2,788±0,324 aA	2,468 B
15	1,596±0,336 aA	2,559±0,354 bA	2,078 AB
30	1,394±0,288 aA	2,350±0,249 bA	1,872 AB
45	1,459±0,567 aA	2,105±0,636 aA	1,782 AB
60	1,242±0,190 aA	2,160±0,491 bA	1,707 A
	1,568 a	2,392 b	

Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

À contagem das amostras de tempo 0 dos dois protocolos, apresentaram número três vezes maior que o encontrado em sangue total, classificado como PRP (MARX et al., 1998). Contudo, aos 15, 30 e 60 dias de congelamento, a amostra F exibiu valor menor que o referido por Marx e colaboradores (1998). Já a amostra N apresentou menor valor à contagem das amostras 30 e 45 dias de criopreservadas. Contudo, à estatística, não houve diferença significativa (tabela 2).

Tabela 2. Comparação da contagem de plaquetas entre os diferentes protocolos F (congelamento em freezer a -20 °C) e N (nitrogênio líquido a -196 °C) entre os tempos de tratamento 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

Contagem de plaquetas			
Dias	F	N	Médias
0	1788962±1160875 aA	1320575±217218 aA	1554768,75 A
15	880593±953393 aA	2266818±1658476 aA	1573706,25 A
30	829462±525380 aA	759393±922890 aA	794428,125 A
45	1584437±1354402 aA	616100±584227 aA	1100268,75 A
60	603475±393090 aA	1404531±1471519 aA	1004003,12 A
	1137386,25 a	1273483,75 a	

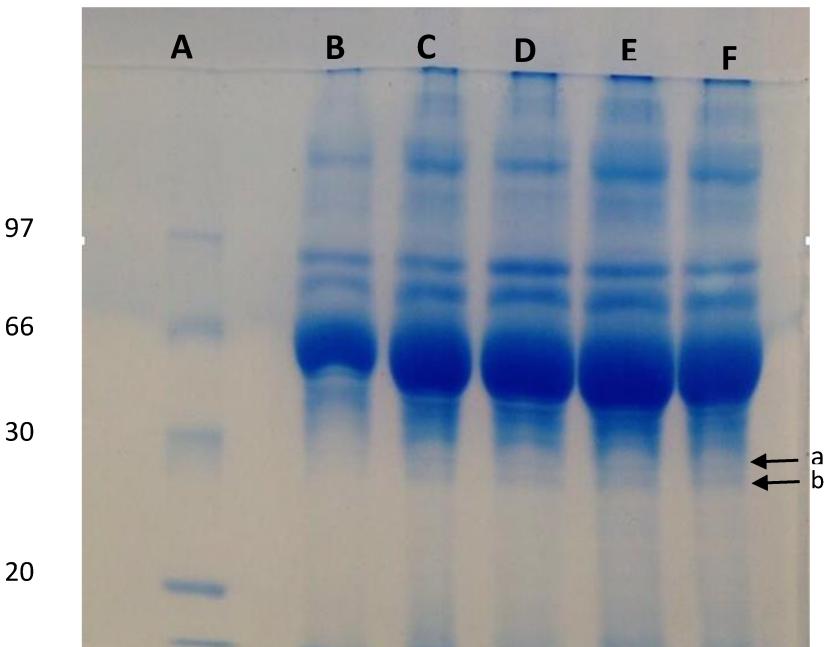
Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Devido à alteração de coloração no teste de MTT, verificou que as plaquetas permaneceram vivas e ativas após até 60 dias de preservação tanto em freezer (-20°C) quanto em nitrogênio líquido (-196°C), com superioridade da capacidade metabólica nas

plaquetas criopreservadas. Provavelmente, pela variação estatisticamente relevante entre os valores de absorbância entre os períodos do protocolo N, plaquetas que se encontravam inativas no momento da criopreservação se manifestaram ativas ao longo do período, aumentando a taxa metabólica e, portanto, a absorbância (FANTINI et al., 2016). Contudo, diferente do apresentado por Kwikrant (2013), mesmo depois de mantidas sob baixas temperaturas por vários dias, as plaquetas permaneceram viáveis, demonstrando um resultado promissor na preservação plaquetária. Estudo de Connor e colaboradores (1996) com plaquetas corroboram com os resultados obtidos neste experimento, tendo em vista que células armazenadas em baixas temperaturas quando descongeladas se mantiveram viáveis e funcionais *in vitro*. Contudo, ainda se fazem necessárias mais pesquisas a fim de avaliar a eficiência do PRP criopreservado e congelado *in vivo*, para que possa ser utilizado da mesma maneira que o produto a fresco em procedimentos cirúrgicos, por exemplo (BARBOSA et al., 2008).

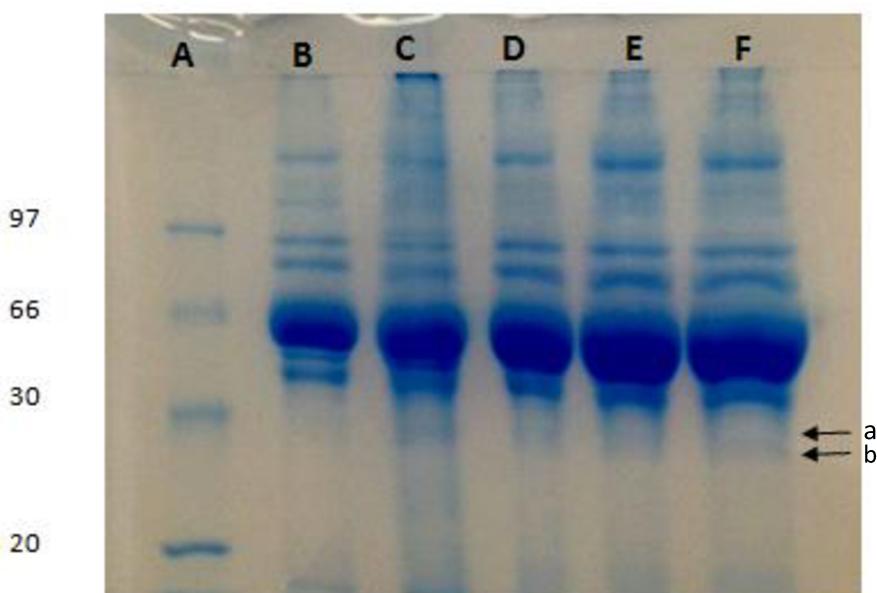
Em gel de eletroforese foi possível visualizar proteínas presentes no plasma rico em plaquetas com tamanhos que variam de 97 a 14 KDa (figura 1). Os fatores de crescimento de interesse, nesse trabalho, foram o de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e de transformação beta 1 (TGF- β 1), sendo os responsáveis pela reparação tecidual promovida pelas plaquetas. O PDGF tem dimensão molecular variando de 28 a 31 KDa (SANTOS, 2007) e o TGF- β 1 possui tamanho molecular de 25 KDa (KINDT, 2008). Nos períodos de observação da preservação em nitrogênio líquido, notou-se a presença de bandas com peso molecular aproximado ao citado por Kindt (2008) e Santos (2007) para os fatores de crescimento PDGF e TGF- β 1, o que sugere sua presença e liberação pelas plaquetas, mesmo após período de criopreservação.

Figura 1. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas plaquetárias em PRP de coelho sob protocolo N (nitrogênio líquido a -196 °C).



A. Padrão de peso molecular (kDa); B. amostra N0; C, D, E e F, decorridos 15, 30, 45 e 60 dias criopreservadas, respectivamente. Observar as bandas referentes às proteínas PDGF (seta a) e TGF- β 1 (seta b).

Figura 2. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas plaquetárias em PRP de coelho sob protocolo F (congelamento a -20°C).



A. Padrão de peso molecular (kDa); B. amostra F0; C, D, E e F, decorridos 15, 30, 45 e 60 dias congeladas, respectivamente. Observar as bandas referentes às proteínas PDGF (seta a) e TGF- β 1 (seta b).

Ao analisar a figura 2, resultante da eletroforese das amostras dos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias preservadas em freezer (protocolo F), pode-se visualizar as bandas do padrão de peso molecular. As bandas de tamanho entre 25 a 30 KDa das amostras 45 e 60 dias não são bem definidas, enquanto que as amostras obtidas em 0, 15 e 30 dias é possível verificar a banda de tamanho 30 KDa, sendo referente ao PDGF. A não marcação das bandas sugere degradação proteica, o que sugere a não preservação dos fatores PDGF e TGF- β 1 sob congelamento a -20°C pelo período de até 60 dias.

Pela eletroforese, sugere-se que as bandas proteicas de peso molecular entre 28 e 31 KDa sejam o fator de crescimento PDGF e que as bandas proteicas com 25 KDa, sejam o fator TGF- β 1 (SANTOS, 2007; KINDT, 2008). Foi referido por Lynch e colaboradores (1991) e Giannobile, Finkelman e Lynch (1994), que o PDGF age de forma sinérgica com o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), auxiliando na reparação tecidual. Segundo Aufdemorte e colaboradores (1992), o fator TGF- β 1 estimula a proliferação de células adjacentes às da injúria tecidual, como os osteoclastos em lesões ósseas. Sabe-se ainda que este fator de crescimento é essencial na reparação de tecidos moles, sobretudo somado às outras substâncias liberadas pelas plaquetas quando ativadas em sítios de reparo (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). O avanço da preservação de PRP, material concentrado com fatores de crescimento que atuam sozinhos ou em sinergia com outras proteínas reparadoras teciduais, oferece novas possibilidades para tratamento de feridas com abordagem clínica e até mesmo cirúrgica, facilitando o acesso do profissional da saúde a esse material, uma vez que não há necessidade de interromper procedimentos para preparar o PRP, apenas descongelar conforme necessidade de aplicação. Tais observações confirmam a importância do plasma rico em plaquetas como catalisador de reparação de tecidos, como elucidado por Barbosa e colaboradores (2008) e a importância de preservação desse material.

Com relação à avaliação da presença de fungos nas amostras dos momentos 0, 15, 30, 45 e 60 dias em ambos os protocolos, não se verificou o crescimento de colônias nas placas com meio DRBC após os cinco dias mantidas em estufa a 25°C. Quanto à averiguação de presença de mesófilas totais nas amostras dos protocolos N e F cultivadas em meio PCA, também não foram encontradas colônias nos períodos de observação de ambos os protocolos. Sugere-se, portanto, segurança microbiológica do PRP preservado tanto a -20°C (protocolo F) quanto a -196°C (protocolo N), reforçando a capacidade de

manutenção de PRP sob baixas temperaturas de forma segura, possibilitando sua inserção em âmbito clínico e hospitalar para tratamento de lesões em tecidos moles e duros.

5. CONCLUSÃO

Através da eletroforese observou-se a presença de proteínas PDGF e TGF- β 1 em todas as amostras do protocolo N até 60 dias, enquanto para o protocolo F foram observadas apenas em 0, 15 e 30 dias.

Constatou-se a viabilidade e atividade celular das plaquetas pelo método de MTT em ambos os protocolos, sendo mais eficaz no protocolo N.

Nos momentos de observação de 0, 15, 30, 45 e 60 dias, em ambos os protocolos, não foram verificados a presença de fungos ou mesófilas totais.

A criopreservação é um método mais eficaz com relação ao congelamento em freezer -20°C para a preservação de plaquetas e suas proteínas de interesse.

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**, v. 63, n. 3, p.567-573, 2011.
- ANDRADE, M. G. M. G., RODRIGUES, G. M., LIMA, D. P., FARIA, L. M., SILVA, L. V. P., SOUZA, R. R., EURIDES, D. Utilização de plasma rico em plaquetas de coelhos com poucos leucócitos e hemácias para a consolidação de ossos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p.276-282, 2016.
- ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; NURDEN, A. T.; ZALDUENDO, M.; FUENTE, M. de la.; ORIVE, G.; AZOFRA, J.; ANDIA, 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, 2006.
- AUFDEMORTE, T. B.; FOX, W. C.; HOLT, G. R.; MCGUFF, H. S.; AMMANN, A. J.; BECL, L. S. An intraosseous device for studies of bone-healing. The effect of transforming growth-factor beta, **The journal of bone and joint surgery**, v.74, n.8, p. 1153-1161, 1992.
- ÁVILA-PORTILLO, L. M.; MADERO, J.I.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M. F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L. G.; GÓMEZ, C.; LOZANO, J. M.; REGUERO, M. T. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, Bogota, v. 57, n. 4, p. 291-300, 2006.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. FUNESP, p. 247, 1989.
- BARBOSA, A. L. T.; CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; 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, 2008.
- 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**, v. 33, n. 3, p. 191-195, 2013.
- CAVALCANTI, G. A. S. A. **Plasma rico em plaquetas: obtenção, momento de produção e uso na integração de flapes cutâneos de avanço em cães**. 131 f. 2010. Tese (doutorado em ciência veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- FIOCRUZ. Manual de Utilização de Animais/FIOCRUZ.** Ministério da Saúde, 1º edição, Rio de Janeiro, 2008.
- CONNOR, J.; CURRIE, L. M.; ALLAN, H.; LIVESEY, S. A. Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4° C and treated with second-messenger effectors. **Transfusion**, v. 36, n.8, p. 691-698, 1996.

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, 2009.

EURIDES, D.; MANTOVANI, M.M.; MENEZES, G.F.; LUIZ, A.F. SILVA, L.A.F.; SOUZA, L.A.; OLIVEIRA, B.J.N.A.; BAUNGARTEN, L.B.; DELBEN, A.F.P.A Efeito do concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.105, n.573-576, p.39-43, 2010.

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

FANTINI, P.; PALHARES, M. S.; PRADES, M.; MACEDO, V. C.; SILVA FILHO, J. M.; LEME, F. O. P.; CARMONA, J. U. Criopreservação do plasma rico em plaquetas de equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n. 1, p. 73-81, 2016.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258, 2000.

GUERREIRO, J. P. F.; DANIELI, M. V.; QUEIROZ, A. O.; DEFFUNE, E.; FERREIRA, R. R. Plasma rico em plaquetas (PRP) aplicado na artroplastia total do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.5, n. 2, p.186-194, 2014.

GIANNOBILE, W. V.; FINKELMAN, R. D.; LYNCH, S. E. Comparison of Canine and Non-Human primate animal Models for periodontal regenerative Therapy: Results Following a Single Administration of PDGF/IGF-I. **Journal of periodontology**, v. 65, n. 12, p. 1158-1168, 1994.

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

HOFFBRAND, A. V. **Fundamentos em hematologia**. Editora Artmed, 5º edição, Porto Alegre, 2008.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de kuby**, Editora Artmed, 6º edição, Porto Alegre, 2008.

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

KWIRANT, L. A. A. **Criopreservação do plasma rico em plaquetas (PRP) de equinos**. 2013. 57 f. Mestrado (Clínica Médica) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

LEE, Y. Activation of apoptotic protein in U937 cells by a component of turmeric oil. **BMB reports**, v.42, n. 2, p. 96-100, 2009.

LYNCH, S. E.; BUSER, D.; HERNANDEZ, R. A.; WEBER, H. P., STICH, H.; FOX, C. H.; WILLIAMS, R. C. Effects of the Platelet-Derived Growth Factor/Insulin-Like Growth Factor-I Combination on Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants. Results of a Pilot Study in Beagle Dogs. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 11, p. 710-716, 1991.

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

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 and Endodontology**, v.85, n.6, p.638-646, 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, 1997.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de dermatologia**, Ribeirão Preto, v.84, n.3, p.257-262, 2009.

MERLINI, N. B.; FONZAR, J. F.; PERCHES, C. S.; SERENO, M. G.; SOUZA, V. L.; ESTANISLAU, C. A.; RODAS, N. R.; RANZANI, J. J. T.; MAIA, L.; PADOVANI, C. R.; BRANDÃO, C. V.S. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. **Arquivo Brasileiro em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.6, p.1742-1750, 2014.

MIRANDA, A. C. S.; GONÇALVES, C. G.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas para certificação de linhagens celulares. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.1, n.70, p. 77-80, 2011.

PAZZINI, J.M.; DE NARDI, A.B.; HUPPES, R.R.; GERING, A.P.; FERREIRA, M.G.P.A.; SILVEIRA, C.P.B., LUZZI, M.C.; OLIVEIRA, J.A. Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.2, p. 108-118, 2016.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; GAL-EDD, N.; ARKIN M.; AULD, D.; AUSTIN, C.; BEJCEK, B.; GLICKSMAN, M.; INGLESE, J.; LEMMON, V.; LI, Z.; MCGEE, J.; MC MANUS, O.; MINOR, L.; NAPPER, A.; RISS, T.; TRASK, O. J.; WEIDNER, J.; (ed), **Assay Guidance Manual**, BETHESDA, M. D. Elli & Company and the national center for advancing translation sciences, 2004.

ROTHWELL, S. W.; MAGLASANG, P.; REID, T. J.; GOROGIAN, 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, 2000.

SANTOS, L. A. U. Efeito da Utilização de plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. São Paulo, 2007

SCOTT, A.; KHAN, K. M.; ROBERTS, C. R.; 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. 372-380, 2004.

SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1045-1051, 2007.

SKLOOT, R. **A vida imortal de Henrietta Lacks**. Editora Companhia das Letras, 1º edição, São Paulo, 2011.

UFRGS, 2016. Contagem de plaquetas. Disponível em:
<https://www.ufrgs.br/lacvet/plaquetas.htm>. Acesso em 30/12/2016.

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

ZHOU, X. L.; NAIB, A. al.; SUN, D. W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v. 64, n. 3, p. 66-72, 2010.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 161/15 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 057/15**

Projeto pesquisa: “Criopreservação de plasma rico em plaquetas de coelhos”.

Pesquisador Responsável: Duvaldo Eurides

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 11 de setembro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Criopreservação de plasma rico em plaquetas de coelhos”, protocolo nº 057/15, sob a responsabilidade de Duvaldo Eurides – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 04/09/2015.

(We certify that the project entitled " Criopreservação de plasma rico em plaquetas de coelhos ", protocol 057/15, under the responsibility of Duvaldo Eurides - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of 04/09/2015).

Vigência do Projeto	Início: 1/11/2015 - Término: 1/02/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Oryctolagus cuniculus familiaris
Número de animais	12
Peso / Idade	Adultos / 3-4,5 Kg
Sexo	Machos + Fêmeas
Origem / Local	Criatório Coelho Real
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 11 de setembro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU