

[Digite texto]

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:
EQUINOS

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS RESFRIADO E
CRIOPRESERVADO COM DIMETILSULFÓXIDO E TREALOSE**

Doutorado

LIOMARA ANDRESSA DO AMARAL KWIRANT

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:
EQUINOS

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS RESFRIADO E
CRIOPRESERVADO COM DIMETILSULFÓXIDO E TREALOSE**

Autor: Liomara Andressa do Amaral Kwirant

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Animal, sob orientação da prof. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin.

Porto Alegre, novembro de 2017.

CIP - Catalogação na Publicação

Kwirant, Liomara Andressa do Amaral

Plasma rico em plaquetas de equinos resfriado e criopreservado com dimetilsulfóxido e trealose / Liomara Andressa do Amaral Kwirant. -- 2018.

64 f.

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin.

Coorientadora: Flávio Desessards de La Côte.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Plasma rico em plaquetas. 2. Resfriamento. 3. Criopreservação. 4. DMSO. 5. Trealose. I. Rubin, Mara Iolanda Batistella, orient. II. de La Côte, Flávio Desessards, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LIOMARA ANDRESSA DO AMARAL KWIRANT

PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS RESFRIADO E CRIOPRESERVADO COM DIMETILSULFÓXIDO E TREALOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na área de reprodução animal, sob orientação do prof. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin.

APROVADO POR:

Profa. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
Orientadora

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky - ULBRA
Membro comissão

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho - UNIVATES
Membro comissão

Prof. Dr. Roberta Carneiro da Fontoura Pereira - UNIJUÍ
Membro comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vilmar e Lídia, pela vida, educação, amor, incentivo e apoio durante toda a minha trajetória.

Ao meu irmão Rômulo, por todo o companheirismo e paciência.

A todos os meus familiares e amigos, pela compreensão, paciência e incentivo ao longo destes quatro anos.

À Universidade Federal do Paraná e Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de estudo na graduação e mestrado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, pela oportunidade e conhecimento transmitido durante o doutorado.

À CAPES, pela bolsa de estudos durante o doutorado.

A toda a equipe do Embryolab de Santa Maria, em especial às estagiárias Mariê e Nayrema, por toda a ajuda durante o experimento.

Às colegas de profissão Mariana Cocco e Camila Cantarelli, por todo o apoio e auxílio durante a realização do experimento.

Ao laboratório de virologia da UFSM, em especial à Juliana Cargnelutti e Mathias Martins, pelo auxílio na realização das análises laboratorias.

À colega de profissão Roberta Pereira, por todos os conhecimentos transmitidos e por tanto ter me auxiliado no início dos meus trabalhos com PRP.

Ao professor Flávio De La Corte e professora Karin Erica Brass, pelos ensinamentos e pela ajuda ao longo deste experimento.

Às Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu, ao professor e coordenador João Estevão Sebben e a todos os demais colegas, por todo o apoio e compreensão a mim fornecidos ao longo destes quatro anos.

Em especial à minha orientadora, professora Mara Rubin, pelos conhecimentos, pelo incentivo, compreensão, apoio, confiança, carinho e paciência durante todo o doutorado. Muito obrigada por tudo!!!

A Deus, pela força e iluminação nos momentos mais difíceis.

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.”

Sócrates

RESUMO

PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS RESFRIADO E CRIOPRESERVADO COM DIMETILSULFÓXIDO E TREALOSE

Autor: Liomara Andressa do Amaral Kwirant

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

O plasma rico em plaquetas (PRP) é utilizado na medicina equina para o tratamento de lesões ósseas, articulares, tendíneas e ligamentares. No entanto o PRP deve ser preparado no momento de cada aplicação, pois seu tempo máximo de utilização após o preparo é de apenas oito horas. O objetivo deste estudo foi avaliar o resfriamento e criopreservação como métodos de armazenamento do PRP equino utilizando dois crioprotetores: dimetil sulfóxido (DMSO) e trealose, na tentativa de manter a viabilidade plaquetária após o armazenamento a baixas temperaturas. Duas amostras de PRP foram preparadas a partir da centrifugação do sangue de seis pôneis saudáveis e foram destinadas à criopreservação a -196°C ou ao resfriamento a 4°C . Cada amostra de PRP preparada foi dividida em quatro alíquotas: fresca, com DMSO, com trealose ou sem crioprotetor. As amostras frescas foram avaliadas quanto à contagem plaquetária, determinação do volume plaquetário médio (VPM), concentração plaquetária em relação ao sangue total e quantificação do fator de crescimento de transformação beta 1 (TGF- β 1). As amostras criopreservadas e resfriadas ficaram armazenadas por 14 dias e foram então submetidas às mesmas análises laboratoriais. O número de plaquetas e concentração plaquetária foram similares entre as amostras frescas e resfriadas com ou sem crioprotetor, mas foram superiores nas amostras frescas em relação às amostras criopreservadas. Observou-se aumento do VPM em todas as amostras armazenadas, indicando que as plaquetas sofreram lesões durante o armazenamento. A liberação de TGF- β 1 foi superior no PRP fresco em relação ao PRP resfriado ou criopreservado, não havendo diferença entre as amostras que continham ou não crioprotetores. A adição dos crioprotetores DMSO e trealose não impediu as lesões plaquetárias de

armazenamento. Por outro lado, tanto as amostras resfriadas quanto as criopreservadas liberaram quantidades significativas de TGF- β 1.

Palavras-chave: plasma rico em plaquetas, resfriamento, criopreservação, DMSO, trealose.

ABSTRACT

EQUINE PLATELET-RICH PLASMA COOLED AND CRYOPRESERVED WITH DIMETHYLSULFOXIDE AND TREHALOSE

Author: Liomara Andressa do Amaral Kwirant

Adviser: Mara Iolanda Batistella Rubin

Platelet rich plasma (PRP) is used in equine medicine for treatment of bone, joint, tendon and ligament injuries. However the PRP must be prepared at the time of each application, since its maximum time of use after the preparation is only eight hours. The objective of this study was to evaluate cooling and cryopreservation of equine PRP as storage methods using two cryoprotectants: dimethyl sulfoxide (DMSO) and trehalose, in an attempt to maintain platelet viability after storage at low temperatures. Two PRP samples were prepared from the blood centrifugation of six healthy ponies and were intended for cryopreservation at -196 ° C or cooling at 4 ° C. Each prepared PRP sample was divided into four aliquots: fresh, DMSO, trehalose or without cryoprotectant. The fresh samples were evaluated for platelet count, determination of mean platelet volume (MPV), platelet concentration in relation to whole blood and quantification of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). The cryopreserved and cooled samples were stored for 14 days and then submitted to the same laboratory tests. The number of platelets and platelet concentrations were similar between fresh and cooled samples with or without cryoprotectant, but were higher in fresh samples than in cryopreserved samples. An increase in MPV was observed in all stored samples, indicating that platelets suffered lesions during storage. The release of TGF- β 1 was higher in fresh PRP than in

cold or cryopreserved PRP, with no difference between samples containing or not cryoprotectants. The addition of DMSO and trehalose cryoprotectants did not prevent platelet storage lesions. On the other hand, both the cooled and cryopreserved samples released significant amounts of TGF- β 1.

Key words: Platelet-rich plasma, cooling, cryopreservation, DMSO, trehalose.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Ativação plaquetária e liberação dos fatores de crescimento após estímulo por agonista.....16
- FIGURA 2. Fotografia ultra-estrutural mostrando a medida dos eixos maior e menor de plaquetas normais (A), ativadas (B) e estado incerto (C). Y = gama grânulos, α = alfa grânulos, MT= mitocôndria, G= grânulos de glicogênio ou área onde se encontrariam. Em A e B a barra representa 200nm. Em C, a barra representa 1 μ m.....16
- FIGURA 3. Funções dos fatores de crescimento derivados das plaquetas. Os números indicam a sequência de ações durante as diferentes etapas do processo de cicatrização das feridas.....18

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Fonte e função dos fatores de crescimento (FC) contidos nos grânulos plaquetários alfa.....21
- TABELA 2. Força e tempo de centrifugação dos protocolos usados para obtenção de PRP.....24
- TABELA 3. Técnicas *in vitro* empregadas na avaliação dos concentrados de plaquetas.....37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Plaquetas	15
2.1.1 Estrutura e ativação plaquetária.....	15
2.1.2 Função plaquetária.....	18
2.2 Plasma rico em plaquetas (PRP):.....	19
2.2.1 Fatores de crescimento:	20
2.2.2 Métodos de preparo do PRP	24
2.2.3 Utilização do PRP na medicina humana	26
2.2.4 Utilização do PRP na medicina equina	27
2.3 Armazenamento de plaquetas	28
2.3.1 Lesões plaquetárias de armazenamento.....	29
2.3.2 Armazenamento de plaquetas humanas com DMSO	31
2.3.3 Armazenamento de plaquetas humanas com Trealose	34
2.3.4 Armazenamento do PRP equino.....	35
2.3.5 Métodos de avaliação da qualidade plaquetária após armazenamento a baixas temperaturas.....	36
3. ARTIGO	39
4. CONCLUSÕES	54
5. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

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

Na medicina equina o PRP vem sendo utilizado tanto na forma de gel (ativado com trombina) para o tratamento de feridas cutâneas (CARTER *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2017), como na forma líquida, para o tratamento de tendinites (MAIA *et al.*, 2009; BOSCH *et al.*, 2011), osteoartrites (CARMONA *et al.*, 2007) e laminite (CARMONA *et al.*, 2013), através de uma ou mais aplicações no local da lesão.

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

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

A criopreservação de concentrados de plaquetas utilizando 5% ou 6% de DMSO atualmente é considerada a melhor maneira de armazenar plaquetas humanas (LEE & BLAJCHMAN, 2007). O concentrado de plaquetas pode ser armazenado por mais de três anos, utilizando DMSO a 5% como crioprotetor e congelamento em vapor de nitrogênio líquido (-150°C), sem perda da função hemostática (DALY *et al.*, 1979). Melaragno *et al.* (1985) relataram o sucesso na transfusão de plaquetas (em pacientes humanos) armazenadas por mais de dois anos, congeladas em freezer a -80°C e utilizando DMSO a 6% como crioprotetor.

Outro crioprotetor que vem sendo utilizado na tentativa de preservar plaquetas humanas é a trealose. A trealose é um dissacarídeo encontrado em altas concentrações em uma variedade de organismos capazes de sobreviver à desidratação severa e é um eficaz estabilizador das células, pois é um crioprotetor extracelular (WOLKERS *et al.*, 2001). Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando-se trealose como crioprotetor no processo de liofilização de concentrados de plaquetas humanas (WOLKERS *et al.*, 2001; CROWE *et al.*, 2003; PIETRAMAGGIORI *et al.*, 2007; SUM *et al.*, 2007), observando-se bons resultados quanto à recuperação plaquetária, porcentagem de células discóides e aceleração do processo cicatricial.

A trealose também vem sendo estudada como protetor celular durante o resfriamento e criopreservação de plaquetas. Liu *et al.* (2009) afirmam que a trealose inibe a fagocitose de plaquetas resfriadas *in vitro*, enquanto que Gläfke *et al.* (2012) observaram excelente recuperação plaquetária (98%) e elevado percentual de plaquetas inativas (76%) após a criopreservação, observando resultados superiores à criopreservação com DMSO 5%.

Visando a praticidade e amplificação do uso do PRP no tratamento de diversas lesões de equinos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do DMSO e da trealose sobre o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) equino resfriado a 4°C e congelado em nitrogênio líquido a -196°C.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plaquetas

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

2.1.1 Estrutura e ativação plaquetária

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

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

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

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

Paes Leme *et al.* (2006) avaliaram a ativação de plaquetas de equinos após a indução da laminite e verificaram que as plaquetas equinas são maiores do que as humanas, evidenciando a ausência do SCA, o que explicaria o fato de plaquetas equinas serem menos sensíveis à indução da agregação pelo ADP. O resultado mais comum nas plaquetas ativadas foi a emissão de pseudópodes, mas as plaquetas apresentaram também mudança de forma,

alteração da relação entre os eixos maior e menor e diminuição do tamanho dos grânulos, que pode ser explicada pela secreção do conteúdo armazenado. Não foram observadas lises celulares ou plaquetas consideradas em estado irreversível de ativação (figura 2).

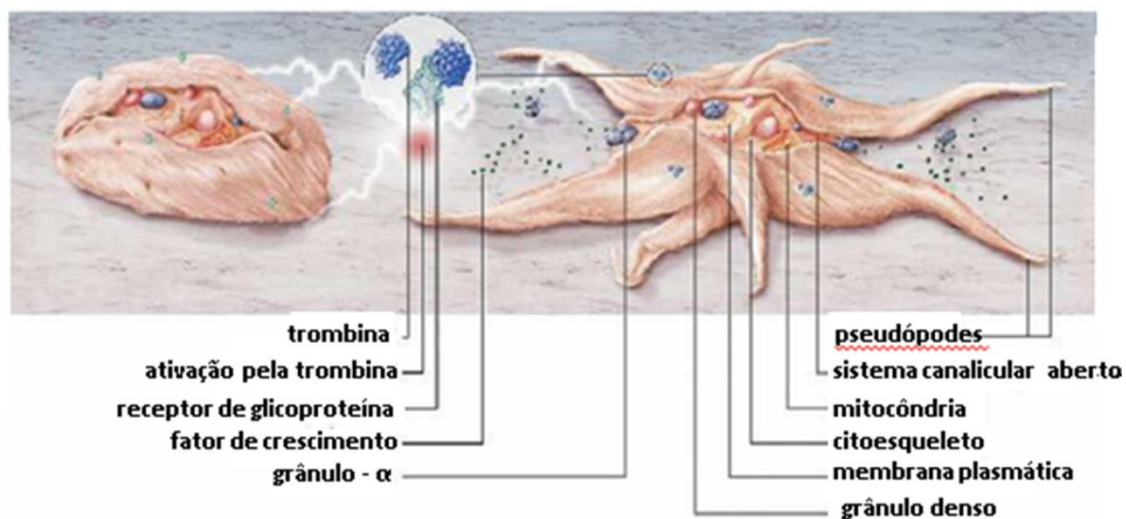


Figura 1 - Ativação plaquetária e liberação dos fatores de crescimento após estímulo por agonista.

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

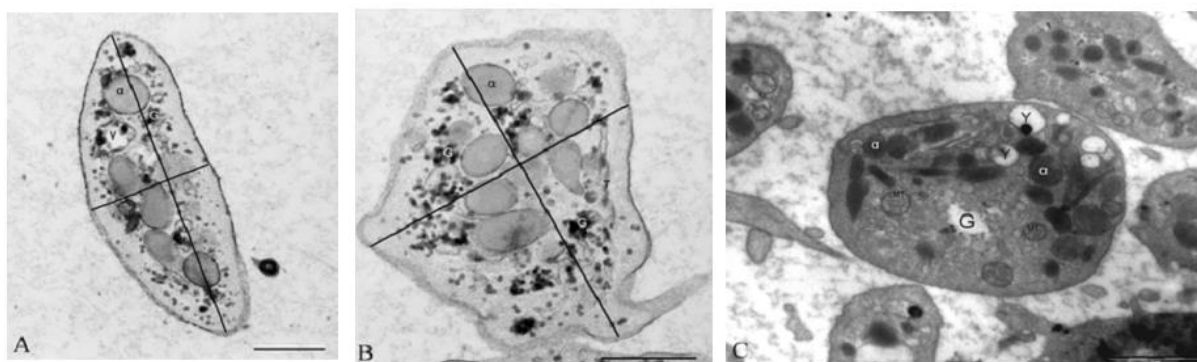


Figura 2 - Fotografia ultra-estrutural mostrando a medida dos eixos maior e menor de plaquetas normais (A), ativadas (B) e estado incerto (C). Y = gama grânulos, α = alfa grânulos, MT= mitocôndria, G= grânulos de glicogênio ou área onde se encontrariam. Em A e B a barra representa 200nm. Em C, a barra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

Fonte: PAES LEME *et al.* (2006).

2.1.2 Função plaquetária

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

O processo de cicatrização se inicia com a formação do tampão plaquetário, ativação da cascata de coagulação e liberação do conteúdo granular das plaquetas, com consequente liberação dos fatores de crescimento (EVERTS *et al.*, 2006). A liberação de proteínas provenientes dos grânulos alfa plaquetários no local da lesão promove o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas, iniciando o processo inflamatório, bem como promovendo a angiogênese, que resulta em neovascularização e formação de um novo tecido conjuntivo, necessário à cicatrização (ZANDIM *et*

al., 2012). Resumidamente, os fatores de crescimento provenientes dos grânulos alfa produzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição da matriz extracelular (EVERTS *et al.*,2006). A figura 3 demonstra como as plaquetas atuam no processo de cicatrização tecidual.

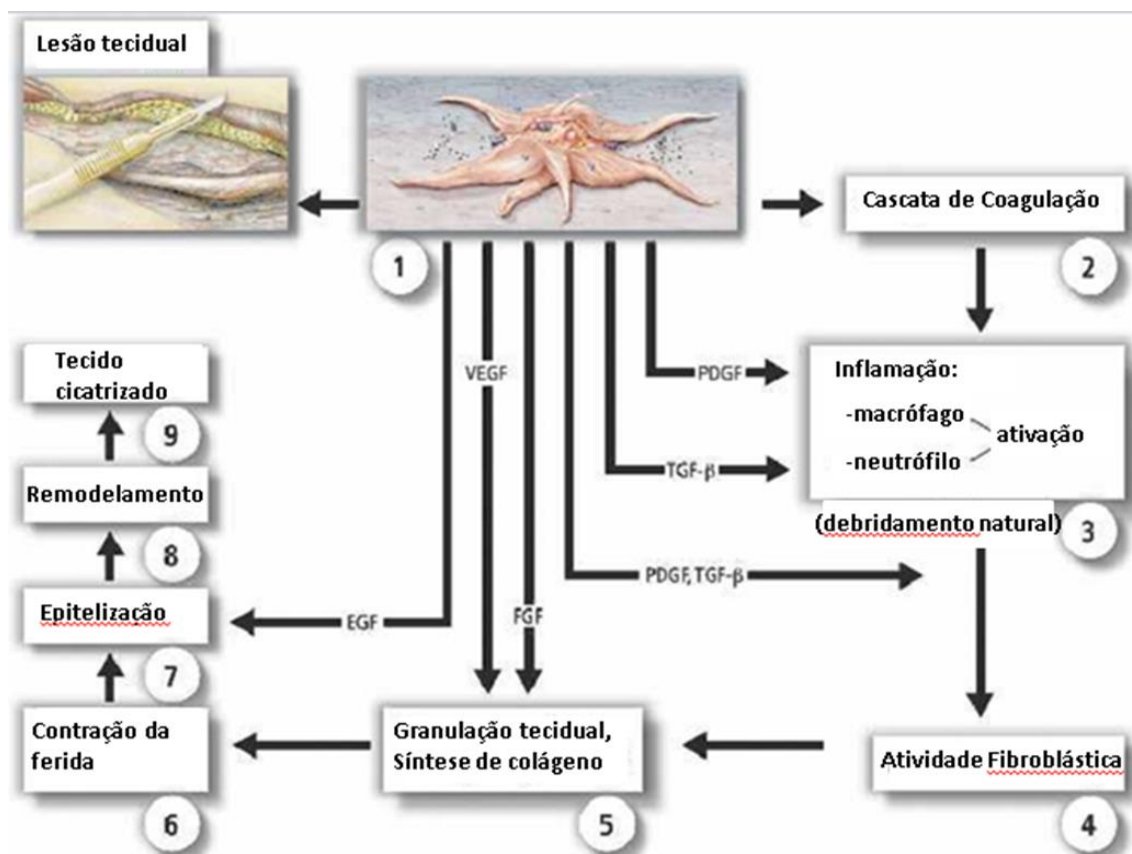


Figura 3 - Funções dos fatores de crescimento derivados das plaquetas. Os números indicam a sequência de ações durante as diferentes etapas do processo de cicatrização das feridas.

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

2.2 Plasma rico em plaquetas (PRP):

De acordo com Gonshor (2002), o plasma rico em plaquetas deve conter três a cinco vezes mais plaquetas do que o sangue total. O PRP é definido

como um volume de plasma que contém um número de plaquetas superior ao observado no sangue total e apresenta em sua composição plaquetas, fatores de crescimento, proteínas plasmáticas e algumas hemácias e leucócitos, pois o processo de concentração das plaquetas no plasma não elimina totalmente as outras células sanguíneas (TEXTOR, 2011). Ele é uma fonte autógena de fácil aquisição e de baixo custo, que contém diversos fatores de crescimento importantes na reparação tecidual (MAIA, 2008).

Em humanos, a concentração plaquetária que define o PRP é de $1000 \times 10^3/\mu\text{l}$ (MARX, 2004), mas de acordo com Anitua *et al.* (2004), concentrações acima de 300.000 plaquetas/ μl são suficientes para o preparo do PRP. Em equinos, Schnabel *et al.* (2007) observaram efeito anabólico sobre a síntese de matriz tendínea após a utilização de PRP contendo 395.000 plaquetas/ μl , sugerindo que para equinos este número já seria suficiente para se obter o efeito clínico desejado.

2.2.1 Fatores de crescimento:

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

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

Os fatores de crescimento podem ser classificados em dois grupos: morfométricos e mitogênicos. Os morfométricos estão envolvidos no

crescimento ósseo através da transformação de células-tronco mesenquimais multipotentes em células osteoprogenitoras na presença da proteína óssea morfogênica (BMPs). Já os fatores de crescimento mitogênicos estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese (HOCK & CANALIS, 1994).

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

O fator de crescimento fibroblástico além de estar presente nos grânulos alfa plaquetários, também é sintetizado por macrófagos e pelo endotélio. Suas principais funções incluem mitogênese, angiogênese e ativação de macrófagos. Ele também promove a regeneração da derme, através da síntese protéica e de colágeno (ROSS, 1987) e induz a expressão de TGF- β (PIERCE *et al.*, 1989). O TGF- β é particularmente importante porque uma vez ativado, afeta muitos aspectos da reparação tecidual, incluindo o início e o término do processo (CARTER *et al.*, 2003). É encontrado principalmente nas plaquetas (95%), mas uma pequena quantidade pode ser observada nos macrófagos, em forma latente. Entre as funções do TGF- β , está a quimiotaxia e mitogênese de fibroblastos e células precursoras de osteoblastos (EVERTS *et al.*, 2006). As principais funções dos diferentes fatores de crescimento encontrados nas plaquetas se encontram descritas na tabela 1.

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

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

FC	Fonte	Função	Referência
TGF-β	Plaquetas, matriz óssea e cartilaginosa, linfócitos T (Th1) ativados, macrófagos, monócitos e neutrófilos.	Pertence a uma superfamília que inclui: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Estimula a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; estimula quimiotaxia endotelial e angiogênese; regula o efeito mitogênico de outros FC. O TGF- β 1 é o mais importante sendo responsável pela maturação celular, migração fibroblástica e síntese de matriz extracelular. Existe um leve antagonismo entre o TGF- β e o PDGF.	PIERCE et al. (1991); BAMES et al. (1999); MARSOLAIS & FRENETTE (2005); VILELLA (2007).
PDGF	Plaquetas, osteoblastos, células endoteliais, macrófagos, monócitos e células musculares lisas.	Mitogênico para células mesenquimais, osteoblastos, células do tecido conjuntivo e fibroblastos, estimula a quimiotaxia de fibroblastos, macrófagos e neutrófilos, regula síntese de colágeno.	PIERCE et al. (1991) FRIESEL & MACIAG (1995); PONTUAL & MAGINI (2003)
IGF-I	Plaquetas	Mitogênico para células da linhagem osteoblástica, acelera a osteogênese quando combinado com o TGF- β ou PDGF.	GIANNOBILE (1999).
FGF	Plaquetas, células mesenquimais, macrófagos, condrócitos e osteoblastos.	Promove o crescimento e diferenciação dos condrócitos e osteoblastos e é mitogênico para células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos.	ROSIER et al. (1998).
EGF	Plaquetas, macrófagos e	Estimula a quimiotaxia e angiogênese endotelial e a	CANALIS et al. (1989); STEENFOS,

	monócitos.	mitogênese epitelial; regula síntese de collagenase.	(1994).
VEGF	Plaquetas e células endoteliais.	Aumenta a angiogênese e permeabilidade vascular; estimula a mitogênese de células endoteliais.	MARTIN et al. (1992); MARSOLAIS & FRENETTE, (2005);
CTGF	Endocitose por plaqueta na medula óssea	Promove angiogênese; regeneração da cartilagem; fibrose e adesão plaquetária.	HOM & MAISEL (1992); KUBOTA et al. (2004).

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

2.2.2 Métodos de preparo do PRP

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

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

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

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

Outra maneira de se utilizar o PRP é na forma de gel. Whitman *et al.* (1997) e Marx *et al.* (1998) utilizaram o PRP gel no tratamento de lesões maxilofaciais. O PRP

foi preparado a partir de 450ml de sangue, pelo método da aférese e foi ativado com trombina bovina e 10% de cloreto de cálcio para adquirir a forma de gel.

Na medicina veterinária, o método de preparo do PRP é baseado em protocolos já padronizados e em uso na medicina humana. O PRP pode ser preparado através da coleta de sangue em tubos, ou bolsas de coleta com 3,8% de citrato de sódio como anticoagulante, seguido de centrifugação e ativação do PRP (CARTER *et al.*, 2003; CARMONA, 2006; CARMONA *et al.*, 2007). Usualmente são realizadas duas centrifugações no preparo do PRP, sendo que a segunda possui velocidade de rotação superior à primeira (ASPENBERG & VIRCHENKO, 2004; CARMONA *et al.*, 2007). Na tabela 2 podem ser visualizados sete protocolos avaliados por Pereira *et al.* (2013) para a obtenção de PRP e que já se encontram em uso na medicina humana e veterinária.

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

Protocolos	Primeira centrifugação		Segunda centrifugação	
	Força (g)	Tempo (min)	Força (g)	Tempo (min)
CARMONA (2006)	120	5	240	5
CARMONA (2006) modificado	120	10	240	10
VENDRAMIN <i>et al.</i> (2006)	300	10	640	10
VENDRAMIN <i>et al.</i> (2009)	400	10	800	10
PEREIRA <i>et al.</i> (2013)	224	10	440	10
PEREIRA <i>et al.</i> (2013)	113	10	652	5
MAIA (2008)	120	5	473	5

Fonte: adaptado de PEREIRA *et al.* (2013).

No referido estudo os autores identificaram similaridade na concentração plaquetária, bem como nos fatores de crescimento, mas os protocolos IV, V e VI apresentaram menor contaminação de hemácias e leucócitos, sendo mais indicados para a obtenção do PRP em equinos.

2.2.3 Utilização do PRP na medicina humana

O primeiro uso clínico do PRP foi descrito por Marx *et al.* em 1998. Estes pesquisadores utilizaram o PRP associado ao enxerto ósseo esponjoso na reconstrução de grandes defeitos mandibulares em humanos observando que o grupo tratado apresentou significativa melhora radiográfica e histológica em termos de densidade óssea. Desde então, o PRP passou a ser utilizado com frequência em cirurgia oral em humanos. No final da década de 90, Anitua (1999) utilizou PRP no tratamento de 20 pacientes submetidos à extração dentária para futura colocação de implantes. O tratamento revelou regeneração óssea e de tecidos moles rápida, bem como a ausência de risco de infecção e transmissão de doenças, por ser autógeno.

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

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

O PRP tem sido utilizado em cirurgias ortopédicas como auxiliar na fusão de vértebras lombares (LOWERY, 1999), combinado com células mesenquimais na cicatrização de fraturas complicadas (KITOH *et al.*, 2004), na substituição total de uma articulação (ANITUA *et al.*, 2004), correção de defeitos osteocondrais por

artroscopia (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Sánchez *et al.* (2012) utilizaram aplicações intra-articulares de PRP no tratamento da osteoartrite coxofemoral em 40 pacientes. Após seis meses, 30% dos pacientes relataram diminuição na intensidade da dor.

2.2.4 Utilização do PRP na medicina equina

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

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

No tratamento de osteoartrite em quatro equinos, Carmona *et al.* (2007) utilizaram PRP intra-articular como único tratamento, realizando três aplicações com intervalos de 14 dias. Eles observaram melhora no grau de claudicação e redução da efusão articular dois meses após o último tratamento. Nenhum efeito adverso foi observado com a utilização do PRP intra-articular. No entanto, o estudo não contou com um grupo controle. Carmona e López (2011) utilizaram PRP para o tratamento de um equino com fratura da tuberosidade supraglenóide da escápula e do tubérculo menor do úmero com ruptura e hematoma do bíceps braquial, bursite bicaptal e dano

no nervo supra-escapular, devido a um trauma. Eles fizeram três aplicações intra-lesionais de PRP, com intervalos de 14 dias. Após 10 meses do tratamento, o equino estava completamente recuperado, o que indica que o PRP tem efeito terapêutico no tratamento de fraturas e lesões de tecidos moles em equinos, uma vez que animais com este tipo de lesão levam em torno de 18 a 24 meses para se recuperarem.

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

Carmona *et al.* (2013) trataram uma égua com laminite secundária à doença de Cushing com injeções de PRP ao longo da banda coronária. Na atividade foram realizadas três aplicações, com intervalo de 10 dias entre as aplicações. O tratamento produziu rápido crescimento dos cascos (aproximadamente 5mm/semana) e diminuiu consideravelmente a claudicação após duas aplicações de PRP, indicando que o PRP pode ser utilizado como tratamento auxiliar nos casos de laminite. Cabe salientar que este estudo também não contou com a presença de um grupo controle.

O PRP também tem sido utilizado no tratamento de éguas susceptíveis à endometrite pós-cobertura, reduzindo a resposta inflamatória após a inseminação artificial e aumentando os índices de fertilidade (METCAIF, 2014; REGHINI *et al.*, 2014).

2.3 Armazenamento de plaquetas

O aumento da demanda pela transfusão plaquetária gerou a necessidade de se estabelecer padrões para determinar a qualidade das plaquetas durante o armazenamento. Alterações deletérias na estrutura e função plaquetárias, denominadas “lesões plaquetárias de armazenamento”, restringem a vida útil das plaquetas a cinco dias (SHRIVASTAVA, 2009). Após este período, as plaquetas armazenadas nos bancos de sangue são descartadas. Elas não podem ser

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

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

2.3.1 Lesões plaquetárias de armazenamento

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

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

As alterações plaquetárias de armazenamento se iniciam no momento da coleta de sangue e continuam progressivamente durante a preparação do produto requerido e o armazenamento. Entre as lesões observadas estão o desenvolvimento de formas anormais, perda da forma discóide, redução no volume plaquetário médio (VPM), aumento de volume e densidade heterogênea, aumento na liberação de conteúdo dos grânulos alfa e proteínas citosólicas, atividade pró-coagulante aumentada e expressão alterada das glicoproteínas, todas relacionadas com ativação plaquetária (SHRIVASTAVA, 2009).

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

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

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

Um dos principais marcadores de ativação plaquetária em humanos é a p-selectina, que pode ser avaliada através da citometria de fluxo. A p-selectina está presente nos grânulos alfa das plaquetas e atua como receptor de superfície capaz de mediar a interação das plaquetas com neutrófilos e monócitos (HAMBURGER & McEVER, 1990). Ela é um marcador bastante sensível, que aumenta gradualmente com a ocorrência de ativação (RINDER *et al.*, 1991; HOLME *et al.*, 1997). O aumento

da expressão de p-selectina durante o armazenamento das plaquetas humanas é relatado por diversos autores (RINDER *et al.*, 1993; HOLME *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 2005). Entretanto, a avaliação da p-selectina como marcador da ativação plaquetária é controversa em equinos. Segura *et al.* (2006) demonstraram aumento de 2,12% para 15,5% de plaquetas positivas para a p-selectina após a ativação pela trombina, concluindo que a avaliação da p-selectina por citometria de fluxo é um método eficaz para avaliar a ativação plaquetária em equinos. Mas segundo Lalko *et al.* (2003) a p-selectina é expressada naturalmente em 20-25% das plaquetas equinas, sem que seja necessária a ocorrência de ativação.

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

2.3.2 Armazenamento de plaquetas humanas com DMSO

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

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

No entanto, plaquetas armazenadas a 22°C podem ser estocadas pelo período máximo de cinco dias, pois acima disso é grande o risco de bacteremias e

septicemias (HEAL *et al.*, 1987; PUNSALANG *et al.*, 1989). O aparecimento de lesões plaquetárias de armazenamento nas plaquetas estocadas a 22°C também é um motivo para o curto período de estocagem (SHRIVASTAVA, 2009), o que gera um grande desperdício para os bancos de sangue, pois concentrados de plaquetas são frequentemente descartados, apesar da alta demanda. Por este motivo, ao longo dos anos, a criopreservação vem sendo estudada como método de armazenar plaquetas humanas.

A primeira transfusão de concentrados de plaquetas criopreservados foi realizada há mais de cinquenta anos. Klein *et al.* (1956) observaram resultado positivo na correção de hemorragias transitórias após a transfusão de plaquetas congeladas a -15°C, por seis semanas, sem nenhum crioprotetor. Os agentes crioprotetores (como DMSO e glicerol) atuam sobre a permeabilidade da membrana plasmática das células, diminuindo a energia de ativação necessária para o transporte de água durante o processo de congelamento e atuando também sobre a formação de cristais de gelo no interior destas células e vitrificação (STOLL & WOLKERS, 2011). Distintos crioprotetores foram estudados na tentativa de promover o incremento plaquetário pós-transfusão. Taylor (1981) comparou quatro agentes crioprotetores, sendo dois intracelulares (DMSO e glicerol) e dois extracelulares (hidroxietila de amido e dextrano). Os crioprotetores extracelulares se mostraram ineficazes na preservação de plaquetas, enquanto que o DMSO 5% foi o melhor crioprotetor.

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

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

de plaquetas com ThromboSol e com 5% de DMSO verificando maior ocorrência de ativação e lise plaquetária nos concentrados criopreservados com ThromboSol. Na medicina veterinária, a eficiência do ThromboSol também foi inferior ao DMSO 6% no congelamento de plaquetas de cães (APPLEMAN *et al.*, 2009). A reduzida concentração de DMSO na composição do ThromboSol pode ser responsável pela ocorrência de maior lise e de maior ativação plaquetária associada ao uso deste crioprotetor (LANDI, 2004).

A recuperação e sobrevivência pós-transfusão de concentrados de plaquetas criopreservados com 6% de DMSO e mantidos em freezer a -65°C por 7 a 13 dias foi avaliada por Dumont *et al.* (2013). Esta equipe de pesquisadores observou recuperação plaquetária mensurável e sobrevivência na circulação de aproximadamente sete dias após a transfusão, o que sugere a manutenção dos efeitos hemostáticos das plaquetas criopreservadas.

Os concentrados de plaquetas criopreservados com DMSO também vêm sendo utilizados em operações militares, devido às grandes perdas de sangue, quando não há disponibilidade de concentrados de plaquetas frescas (NEUHAUS *et al.*, 2010). A criopreservação das plaquetas resulta na expressão de fosfatidilserina, o que contribui para o aumento da atividade hemostática, conforme demonstrado por Johnson *et al.* (2014), ao criopreservarem plaquetas com 5% de DMSO.

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

2.3.3 Armazenamento de plaquetas humanas com Trealose

A trealose é um dissacarídeo encontrado em altas concentrações em uma variedade de organismos capazes de sobreviver à desidratação severa e é um eficaz estabilizador das células, pois é um crioprotetor extracelular. A substância é rapidamente absorvida pela célula a 37°C e após reidratação, a recuperação celular é de aproximadamente 85% (WOLKERS *et al.*, 2001). Segundo Crowe *et al.* (2003), a porcentagem de células discóides encontrada após a reidratação é similar à de plaquetas frescas, fato este que justifica a investigação sobre seus efeitos no PRP. Quando liofilizado com 50mM de trealose, o PRP humano apresenta bons resultados no tratamento de feridas cutâneas, acelerando o processo de cicatrização, de maneira semelhante ao PRP fresco (PIETRAMAGGIORI *et al.*, 2007; SUM *et al.*, 2007).

Além da liofilização, a trealose também foi avaliada como crioprotetor nos processos de resfriamento e criopreservação plaquetária. Liu *et al.* (2009) armazenaram plaquetas humanas em uma solução de Tyrode livre de cátions contendo 50mg/ml de trealose. Estas plaquetas permaneceram armazenadas sob agitação contínua a 4°C, durante 9 dias. Após o período de armazenamento, a taxa de fagocitose *in vitro* observada nas plaquetas armazenadas com trealose foi semelhante à observada em plaquetas armazenadas à temperatura ambiente por cinco dias e menor do que a observada em plaquetas armazenadas sem o crioprotetor, sob as mesmas condições. Adicionalmente, os concentrados plaquetários que continham trealose mantiveram capacidade de agregação plaquetária.

Em outro estudo, Wang *et al.* (2015) avaliaram a qualidade de plaquetas armazenadas em uma solução aditiva de plaquetas modificada contendo 75,0 g/l de trealose. No estudo, as plaquetas armazenadas a 10° C nesta solução foram comparadas com plaquetas armazenadas em plasma à temperatura ambiente definindo-se que plaquetas armazenadas a 10° C com trealose mantiveram sua função *in vitro* e *in vivo*. A contagem plaquetária e o volume plaquetário médio foram similares entre os dois grupos, bem como a recuperação plaquetária *in vivo* pós-transfusão em ratos.

A trealose também aparece como alternativa no processo de criopreservação plaquetária. Plaquetas armazenadas com trealose (300mM) a -150°C parecem

apresentar maior viabilidade (98% de recuperação plaquetária e 76% de plaquetas inativas), quando comparadas a plaquetas armazenadas com 5% de DMSO (94% de recuperação plaquetária e 54% de plaquetas inativas) (GLÄFKE *et al.*, 2012).

2.3.4 Armazenamento do PRP equino

Piccione *et al.* (2010) demonstraram que o armazenamento do plasma equino por mais de seis horas à temperatura ambiente, ou a 8°C resulta em efeito significativo sobre a agregação plaquetária e que o armazenamento por 24 e 48h a -20°C também altera a função plaquetária. Já a estocagem de plaquetas de equinos a 4°C acima de 24h, altera a conformação da membrana plaquetária, conforme demonstrado por Tsvetkova *et al.* (2000). Esses pesquisadores observaram que nestas condições ocorrem múltiplas fases de transição, presumivelmente devido à separação lateral dos lipídios da camada bilipídica da membrana. Tablin *et al.* (2001) afirmam que esta fase de separação também ocorre nas plaquetas humanas quando armazenadas a baixas temperaturas, resultando em ativação plaquetária.

Algumas tentativas de se armazenar o PRP equino também já foram realizadas. Tablin *et al.* (2008) liofilizaram PRP equino utilizando a trealose e observaram que o sobrenadante de plaquetas liofilizadas e reidratadas liberaram os fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF e foram capazes de estimular a proliferação de fibroblastos *in vitro*.

Quando criopreservadas com DMSO, plaquetas contidas no PRP equino também parecem manter sua viabilidade. Kwirant *et al.* (2016) armazenaram o PRP equino em freezer mecânico a -80° C utilizando DMSO 6% como crioprotetor. Após 14 dias, observaram que a contagem plaquetária e o VPM não diferiram entre o PRP fresco e o criopreservado com DMSO, mas foram superiores aos valores observados no PRP armazenado sem o crioprotetor. Neste estudo o DMSO também foi capaz de prevenir a ativação plaquetária causada pelo armazenamento a baixas temperaturas. Por outro lado, Fantini *et al.* (2016) observaram maior concentração plaquetária no PRP fresco do que no PRP criopreservado com 3% ou 6% de DMSO, a -197°C. Estes autores avaliaram o PRP resfriado com as mesmas concentrações de DMSO e também encontraram maiores concentrações plaquetárias nas amostras frescas.

Estes autores também avaliaram a função plaquetária através do teste de agregação, encontrando maior agregação plaquetária nas amostras a fresco do que em todas as amostras armazenadas.

2.3.5 Métodos de avaliação da qualidade plaquetária após armazenamento a baixas temperaturas

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

Testes *in vitro* podem auxiliar na avaliação da morfologia plaquetária, características bioquímicas, secreção granular, glicoproteínas de superfície, formação de superfície pró-coagulante e a resposta funcional das plaquetas (LANDI, 2004) (tabela 3).

Kunicki *et al.* (1975) avaliaram a qualidade dos concentrados de plaquetas estocados à temperatura ambiente, através de avaliação morfológica pela microscopia de fase. Os autores classificaram estas estruturas conforme as alterações apresentadas em discóides, que mantiveram a forma discóide das plaquetas frescas; esféricas, que sofreram alteração da forma; dendríticas, que apresentaram emissão de pseudópodes e balonadas, que estavam totalmente rompidas após o armazenamento.

Através da microscopia eletrônica, Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990) classificaram as plaquetas da seguinte forma: 0 – normal – ligeiramente oval, com organelas uniformemente dispersas no citoplasma; 1 – incerta – perfil arredondado, organelas não centralizadas; 2 – ativada – forma oval irregular com centralização de organelas e emissão de pseudópodes; 3 – com alteração irreversível – discóide com

organelas na periferia; 4 – lise total – perda da arquitetura normal. A determinação do VPM também é uma forma de se avaliar a qualidade das plaquetas após o armazenamento, uma vez que segundo Böck (1995) e Landi (2004) ocorre aumento no volume após o processo de congelamento.

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

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

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

Segura *et al.* (2006) utilizaram a avaliação morfológica através da microscopia eletrônica, citometria de fluxo e testes de agregação plaquetária para verificar a função de plaquetas equinas. No referido estudo as plaquetas equinas mantidas a 37°C foram identificadas com a mesma forma discóide da plaqueta humana e quando ativadas pela trombina, tiveram sua forma alterada e apresentaram fusão dos grânulos alfa com conseqüente liberação do conteúdo granular. Os autores também observaram que as plaquetas respondem bem ao ADP e colágeno no teste de agregação, respondendo pouco ao ácido araquidônico e tromboxano e não respondendo à epinefrina ou ristocetina. Adicionalmente, ficou demonstrado que a citometria de fluxo pode ser um método eficaz de avaliar a ativação plaquetária em equinos, uma vez que houve aumento na expressão de p-selectina e glicoproteínas de membrana após a ativação com agonistas.

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

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

Fonte: LANDI (2004).

Tendo em vista a crescente utilização do PRP, bem como a necessidade da sua utilização logo após o preparo, devido à curta vida útil das plaquetas, o objetivo deste estudo foi buscar um método prático e eficaz de armazenar o PRP equino, facilitando sua utilização na medicina equina, sem perda da função deste material.

3. ARTIGO

COOLING AND CRYOPRESERVATION OF EQUINE PLATELET-RICH PLASMA WITH DIMETHYL SULFOXIDE AND TREHALOSE

Liomara Andressa do Amaral Kwirant^{a*}, Flávio Desessards De La Corte^b, Camila Cantarelli^c, Juliana Felipetto Cargnelutti^c, Mathias Martins^c, Mariê Wolski Cabral^d, Nayrema Maciel^d, Mara Iolanda Batistella Rubin^{ab}

^aGraduate Program in Animal Medicine: Equine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

^bDepartment of Large Animals – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

^cGraduate Program in Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

^dGraduation in Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Corresponding author: Tel: +55 41 996101081 E-mail adress: liomara_amaral@hotmail.com (L.A.A. Kwirant).

Abstract

Equine platelet-rich plasma (PRP) has been used in horses to repair bone, articular and tendinous lesions, laminitis, and even endometritis; However, fresh PRP lifespan is limited to 8 hours, which is too short to prepare and use the PRP, except *in loco*. In order to get higher platelet viability for clinic purposes the effect of the cryoprotectants dimethyl sulfoxide (DMSO) and trehalose on equine platelet-rich plasma (PRP) was evaluated by cooling at 4°C and cryopreserved at -196°C. The protocols of cooling and cryopreservation were performed independently, comparing the following treatments: fresh PRP, PRP+6%DMSO, PRP+300Tre, PRP only. Each PRP sample was prepared by double centrifugation of the blood of six ponies and was further divided into four aliquots. The cooled or cryopreserved aliquots were stored for 14 days. All samples were evaluated for platelet counts, mean platelet volume (MPV) and release of the transforming growth factor beta 1 (TGF-β1). There were similarities in the number of platelets in the fresh PRP and in the cooled samples; however platelet counts were higher in the fresh PRP than in the cryopreserved samples. Release of TGF-β1 was higher in fresh PRP (105891 ± 52398 pg/ml), but all stored samples released significant amounts of this growth factor (27291 ± 9625 pg/ml).

Key words: platelet-rich plasma (PRP), cooling, cryopreservation, DMSO, trehalose.

1. Introduction

Platelet-rich plasma (PRP) is a product derived from whole blood that contains high concentrations of platelets exerting an effect on the healing process due to the fact that once activated, platelets release several growth factors that have chemotactic, neovascular and mitogenic pharmacological effects [1].

In horses, PRP became popular and it has been used to repair different type of lesions, such as the ones located on bones [2], joints [3] and tendons [4]. In addition, the use of PRP has been reported in the treatment of skin wounds [5], laminitis [6] and also endometritis [7]. Important to make a note that most of the PRP publications are derived from isolated clinical cases, case reports or case series which do not have a control group to draw more substantiated conclusions [8,9].

One has to consider that the maximum viability of fresh PRP is eight hours after its preparation [10]. Therefore, alternatives should be develop to allow more than one application of PRP in clinical cases. Growth factors are actively released from the alpha granules during the first 10 minutes after platelet activation and an excess of 95% of pre-synthesized factors are released within the first hour after this event [11].

Because platelets have a very limited lifespan in human blood banks, the platelets are stored at room temperature for a maximum of 5 days, then platelets loose viability and the risk of bacterial contamination increases significantly [12]. On the other hand, when stored at temperatures below 20°C, platelets go through several storage morphological changes that are comparable with the physiological activation process, such as discoid-to-spherical shape change, pseudopodia emission and release of the contents of platelets granules [13].

For this reason, over the years, several storage methods attempting to increase platelet survival have been studied. Studies demonstrated that human platelets can remain viable after cryopreservation with 6% and 5% DMSO for two or three years, respectively [14, 15]. According to Slichter et al. [16], about half of the platelets are recovered after DMSO cryopreservation, but platelet survival after transfusion is minimally reduced when compared to platelet transfusions of fresh platelets, and DMSO cryopreserved platelets. Therefore, it seems that there is room for more studies on new techniques for platelet cryopreservation.

Another method of storage being extensively studied is trehalose storage. Trehalose is a disaccharide found in high concentrations in a variety of organisms capable of surviving severe dehydration and, as an extracellular cryoprotector, is efficient cellular stabilizing factor [17]. When freeze-dried with 50mM trehalose, human PRP presents good results in the treatment of

skin wounds, accelerating the healing process, in a similar fashion as fresh PRP [18]. When cryopreserved with 300mM of trehalose at -150°C, platelets maintain their membranes intact and they remain in an inactive state to latent state after thawing [19]. When cooled at 10°C with trehalose, platelets maintain an adequate measure of their function and bacterial contamination is reduced [20].

Sometimes, to achieve desirable clinical effects more than one application of PRP is often necessary [2, 9] and currently, this material needs preparation at the time of use. Considering these factors, this study evaluated the cooling and cryopreservation of equine PRP with the cryoprotectants DMSO and trehalose, aiming to secure the storage and use after thawing without impairing platelets function.

2. Material and methods

This experiment was approved by the Committee of Ethics for the Use of Animals of the Federal University of Santa Maria, under protocol number 4542290515.

In the experimental design, different procedures were analyzed. Group 1 platelet rich plasma (PRP 1) was used for cooling with and without cryoprotectant at 4°C; group 2 (PRP 2) consisted of cryopreserved PRP with or without cryoprotectant, stored in liquid nitrogen canister at -196°C. In each group the cryoprotectant DMSO and trehalose were analyzed. The PRP prepared for each treatment group was distributed into four aliquots: fresh PRP, PRP+6% DMSO, PRP+300Tre and PRP only.

2.1 PRP preparation

In this study, six healthy 10-year-old male ponies averaging 200kg were used. The blood (450ml) was aseptically collected through jugular puncture in a bag for blood collection containing citrate, phosphate, dextrose and adenine (CPDA) as anticoagulants. A 2.5 ml aliquot of blood was sent to a laboratory for platelet count and mean platelet volume (MPV) determination. Each PRP sample was produced by manual method according to the protocol described by Pereira et al. [21]: 100 ml of blood were distributed in three polypropylene tubes (50 ml), which were centrifuged at 224 g for 10 minutes to obtain the plasma. The obtained plasma was then centrifuged at 440g for 10 minutes to obtain 10ml of PRP. Each 10ml-PRP sample obtained was divided into four aliquots: fresh PRP (2.5ml), PRP+6%DMSO (2.35ml), PRP+300Tre (2ml) and PRP only (2.5ml). All PRP preparation was carried out in a laminar

flow hood with the objective of minimizing the possibility of bacterial contamination. Soon after preparation, fresh PRP (groups 1 and 2) was submitted to laboratory analysis for platelet count, determination of MVP and quantification of transforming growth factor Beta 1 (TGF- β 1).

2.2 Sample PRP+6%DMSO preparation

To the samples for storage with DMSO, 0.15 ml of DMSO was added slowly (1 ml/minute), under homogenization, to obtain the final concentration of 6% DMSO and final volume of 2.5 ml. Samples 1 and 2 were then destined for cooling and cryopreservation, respectively.

2.3 Sample PRP + 300Mm trehalose preparation

Samples destined for storage with trehalose received 0.5 ml of a 1.5M solution of trehalose, previously prepared by diluting 5.675 g of trehalose in 10 ml of 0.9% physiological solution in Becker's beaker (20 ml) at 37°C for three minutes to dissolve the trehalose. Then 0.5ml of this solution was added to each PRP aliquot (2ml) to reach the final concentration (300mM) and volume (2.5ml) of trehalose. The samples were kept in a 37°C-water bath for two hours to favor trehalose within platelets. PRP 1 and PRP 2 containing trehalose were destined to the cooling and cryopreservation process, respectively.

2.4 Cooling process

In the cooling process, samples of PRP 1 containing 6% DMSO, 300mM trehalose, or PRP only were directly kept in a refrigerator at 4°C for 14 days, and the temperature was verified twice a day. Samples were taken from the refrigerator and after remaining for five minutes at room temperature were subjected to the same laboratory analysis as fresh PRP.

2.5 Cryopreservation process

The cryopreservation process was conducted following the technique described by Fantini et al. [22]. The samples were submitted to slow cooling, at rest, in a hermetically sealed container with capacity for room temperature isolation (Botuflex®) until reaching a

temperature of 4°C. The PRP samples were then pre-frozen in liquid nitrogen vapor for 20 minutes at 4cm from the nitrogen surface and subsequently submerged in liquid nitrogen at -196°C, where the samples remained for 14 days.

The thawing protocol was carried out by withdrawing the samples out of the liquid nitrogen and exposing them for two minutes at room temperature, and then heating them in a 37°C water bath for five minutes until complete thawing. Subsequently, the samples were submitted to the same laboratory analyzes conducted for fresh PRP samples.

2.6 Laboratory analysis

Laboratory analysis consisted of platelet counts, determination of MPV and amount of TGF- β 1. A trained professional, unaware of the group settings, performed all platelet counts in a Neubauer chamber as previously described [23]. The MPV was determined in automated hematology counter (Mindray BC-2800Vet).

For the quantification of TGF- β 1, the samples were submitted an ELISA test using the Human TGF- β 1 kit (RAB0460) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), according to the manufacturer's recommendations. For TGF- β activation, initially 0.5ml of each sample was incubated in 0.1ml of 1N HCl solution for 10 minutes. The acidification of the sample was then neutralized by the addition of 0.1 ml of 1.2N NaOH / 0.5 M HEPES (pH 7-7.6). The activated platelet samples were diluted 1:10 and submitted to ELISA. The reading was performed in a spectrophotometer with a 450nm filter and the absorbance values were corrected using the dilution factor. The amount of TGF- β 1 in each sample tested was determined by the standard curve constructed with the absorbances and concentrations of the eight standards of the kit.

2.7 Statistical analysis

The results were analyzed using ANOVA and multiple mean comparisons using the Tukey test. All analyses were performed with the software Graphpad Prism 7.03 with 95% confidence interval. Results are presented as the mean \pm standard deviation of the mean.

3. Results

3.1 Group 1 – Cooling process

The number of platelets in whole blood samples was $180.12 \pm 26.85 \times 10^3 /\mu\text{l}$. The number of platelets in fresh PRP samples was $840.82 \pm 335.2 \times 10^3 /\mu\text{l}$, and did not differ from the number of platelets observed in the other groups: PRP + 6% DMSO ($1143 \pm 602.7 \times 10^3 /\mu\text{l}$), PRP + 300mM trehalose ($594.21 \pm 277.6 \times 10^3 /\mu\text{l}$) or PRP only ($897.22 \pm 260.0 \times 10^3 /\mu\text{l}$) (figure 1).

The fresh PRP presented 4.8 ± 1.8 times more platelets than whole blood, not differing from the concentration observed in the cooled samples.

The mean platelet volume in the fresh PRP samples ($5.1 \pm 0.21\text{fL}$) was lower than in whole blood samples ($5.9 \pm 0.16\text{fL}$) ($P < 0.0001$) and still lower than the values found for samples cooled with 6% DMSO ($5.6 \pm 0.24\text{fL}$) ($P = 0.0021$), 300mM trehalose ($5.5 \pm 0.21\text{fL}$) ($P = 0.0219$), or for PRP only ($5.5 \pm 0.20\text{fL}$) ($P = 0.0114$). Mean platelet volume was similar among cooled samples.

TGF- β 1 concentration was higher in fresh PRP samples ($102028 \pm 30889\text{pg/ml}$) than in the PRP + 6% DMSO cooled samples ($24577 \pm 4487\text{pg/ml}$) ($P < 0.0001$), or in the PRP + 300mM trehalose samples ($20883 \pm 2804\text{pg/ml}$) ($P < 0.0001$) or PRP only ($23850 \pm 3877\text{pg/ml}$) ($P < 0.0001$) treated samples. Samples with or without cryoprotectant had similar growth factor concentration.

3.2 Group 2 – Cryopreservation process

The number of platelets in the fresh PRP samples was $1025.1 \pm 234.6 \times 10^3 /\mu\text{l}$, higher than the number of platelets observed in PRP + 6% DMSO frozen samples ($533.6 \pm 237.1 \times 10^3 /\mu\text{l}$) ($P = 0.0036$), PRP + 300mM trehalose frozen samples ($457 \pm 166.9 \times 10^3 /\mu\text{l}$) ($P = 0.0007$) or PRP only ($562.2 \pm 283.7 \times 10^3 /\mu\text{l}$) ($P = 0.0064$). Among cryopreserved samples, there was similarity on the number of platelets after thawing. Platelet count was 5.8 ± 1.6 times greater in fresh PRP samples than in the whole blood and, higher than in the frozen samples ($P < 0.05$).

The MVP from fresh PRP samples of Group 2 was $5.3 \pm 0.13\text{fL}$, lower than the MVP of whole blood ($5.9 \pm 0.16\text{fL}$) ($P < 0.0001$) and lower ($P < 0.05$) than the observed in PRP + 6% DMSO samples ($5.6 \pm 0.21\text{fL}$) ($P = 0.0141$), PRP + 300mM trehalose ($5.6 \pm 0.10\text{fL}$) ($P = 0.0496$), or in PRP only samples ($5.6 \pm 0.16\text{fL}$) ($P = 0.0141$). MVP was similar among cryopreserved samples.

The release of TGF- β 1 growth factor was higher ($P < 0.05$) in fresh PRP, when compared to any of the cryopreserved samples. In Figure 2 it is indicated that there was

similarity in the release of TGF- β 1 growth factor in samples exposed to DMSO, trehalose, or untreated samples with such cryoprotectants ($P > 0.05$).

4. Discussion

PRP has been widely used in equine medicine and surgery for the treatment of various injuries [24, 25, 26, 27, 28, 29]. However, according to some clinical studies, more than one application of PRP has been reported in the literature as necessary to achieve the desired clinical effect [2, 8, 9, 30, 31, 32]. Therefore, the horse needs to be in a clinical facility or be transported to one in order to get its blood collected and processed each time PRP is to be prepared. Because the fresh prepared PRP should be used no more than eight hours after its preparation [10], an availability of this frozen material would favor its clinical use, eliminating the need for multiple blood collection and preparation at each local application. It's already known that cryopreserved human platelet concentrates were successfully applied in military operations where there is no availability of fresh platelets [33]. Analogous situations occur in the routine of the veterinarian who works in the equine clinic.

Important to consider that the minimal number of platelets required to produce a clinical effect is still controversial. Marx et al. [34] stated that for a product to be considered PRP, it should contain 3-5 times more platelets than whole blood without referring to a minimum amount to be effective. In horses, plasma with platelet concentrations anywhere between 100,000 and 350,000 platelets/ μ l has been indicated as a promising therapeutic alternative [35]. In the present study, both fresh and cooled or cryopreserved PRP samples had more than 300,000 platelets/ μ l, which would be clinically relevant, according to Fontenot et al. [36], who suggested a minimum number of 250,000 platelets/ μ l.

In the present study, there was no reduction in platelet counts following the cooling process, even in the absence of a cryoprotectant. This result is contrary to observed in previous studies, which showed a reduction both in platelets recovery and survival rates in transfusions performed with human platelet concentrates cooled to 4°C [37]. However, when using trehalose as cryoprotectant, Wang et al. [20] observed that storage of platelet concentrates at 10°C was superior to the traditional method (at 22°C), because in addition to platelets counts, platelet function was also maintained and the risk of bacterial contamination was reduced. In our study, platelet counts in fresh and cooled samples were similar, suggesting that the process preserved platelets in PRP, regardless of the use of cryoprotectants. On the other hand, a significant reduction in platelet counts was seen after cryopreservation, despite of the presence of

cryoprotectants. Platelet recovery recorded in the cryopreserved platelets with DMSO in the present study was 58.08%, similar to those observed previously in which platelet recovery was $52.00 \pm 12.00\%$ in cryopreserved platelets with 6% DMSO when compared to transfused fresh platelets [16].

Other authors [22] evaluating equine PRP also described a higher number of platelets in fresh PRP samples than in frozen samples at -196°C with both 3% or 6% DMSO. By contrast, in a previous study done by the same team [38], differences were not detected in the platelet count in fresh and cryopreserved PRP with 6% DMSO. However, these authors performed cryopreservation at -80°C , which may have favored a higher platelet recovery rate. Therefore, one can conclude that there is room for more research in this area.

When it comes to platelet cryopreservation, trehalose may also be an alternative. Gläflke et al. [19] cryopreserved platelets with 300mM of trehalose and verified a higher platelet recovery rate and a lower platelet activation rate at thawing when comparing with frozen platelets with 5% DMSO. However, in the current study platelet recovery rate after cryopreservation was similar between samples stored with trehalose, DMSO or without cryoprotectants, suggesting that the concentration of trehalose used to cryopreserve human platelets may not be ideal for preserving equine platelets.

When stored at low temperatures, platelets usually develop a variety of functional and morphological defects, such as reduction of adhesion, aggregation, release of granular contents and increase in the number of spherical cells [39]. The increase in the MVP observed in this study after the cooling and cryopreservation processes also suggests the occurrence of platelet damage. According to Ohto and Nollet [40], an initial reduction in MVP can be seen because of cellular fragmentation, or formation of microparticles followed by increase in the MVP that results from the increase in the platelet volume of the stored platelets. Both in the cooled and cryopreserved samples, with or without cryoprotectant, an increase of the MVP was observed, suggesting that the cryoprotectants did not prevent the occurrence of platelet injury in either process.

Another important phenomenon indicating platelet damage is the release of their granular contents, since growth factors are actively secreted shortly after the platelet activation process [11]. Among the growth factors contained in the platelets α -granules of the tables are TGF- β 1, responsible for cell maturation, fibroblast migration and synthesis of extracellular matrix [1]. The highest release of TGF- β 1 was observed in fresh PRP. After the cooling and cryopreservation processes, there was a significant reduction in the release of this growth factor, regardless of the use or not of cryoprotectants. On the other hand, even samples stored

without cryoprotectants were capable to release TGF- β 1 14-days after storage. How much of these α -granules are lost in the process and their impact in the clinical effect remains to be determined.

Thus, the required amount of TGF- β 1 for desirable clinical effects to take place is not yet determined. Favorable results have been reported by different authors with different values of TGF- β 1. Tablin et al. [41] reported in vitro stimulation of fibroblasts by trehalose freeze-dried equine PRP, observing the release of 1719 pg/ml of TGF- β 1 after PRP rehydration. Estrada et al. [42] failed to identify improvements on superficial digital flexor tendon lesions treated with an autologous equine platelet concentrate with 16,000 platelets/ml and a TGF- β 1 concentration of 8752 pg/ml. In the current study, the concentration of TGF- β 1 in fresh PRP and in all stored samples was higher than what was previously reported in other studies, but are similar to the results observed by Roffi et al. [43] who evaluated the effect of freezing on human PRP. These authors report the release of 107861.6 pg/ml of TGF- β 1 in fresh PRP and 33849.8 pg/ml in PRP cryopreserved at -30°C without the use of cryoprotectants. In the study mentioned above, no differences in chondrocyte and synoviocytes proliferation were identified when fresh and frozen PRP were compared, confirming that frozen PRP retains its ability. Despite platelet reduction observed in the cryopreservation process, all stored samples had enough platelets within a 14 day storage period. All samples were able to release significant amounts of TGF- β 1 growth factor, despite the observed release reduction compared to fresh PRP.

5. Conclusion

It is possible to conclude that the cooling and cryopreservation processes reduce platelet concentration and consequent release of the TGF- β 1 growth factor from the equine PRP, but that the stored samples still maintain enough platelets. The use of the DMSO and trehalose cryoprotectants did not protected platelets against storage injuries due to cooling and cryopreservation process.

6. References

- [1] Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 2006; 38: 174-87.

- [2] Carmona, JU, López, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *J Equine Vet Sci* 2011; 31: 506-10.
- [3] Pichereau F, Décory, M, Ramos, GC. Autologous platelet concentrate as a treatment for horses with refractory fetlock osteoarthritis. *J Equine Vet Sci* 2014, 34: 489-93.
- [4] Maia L, Souza MV, Ribeiro Júnior JI, Oliveira AC, Alves GES, Benjamin LA, et al. Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J Equine Vet Sci* 2009; 29: 618-26.
- [5] Pereira RCF, De La Côte FD, Brass KE, Azevedo MS, Gallio M, Cantarelli C, et al. Evaluation of Three Methods of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Equine Distal Limb Skin Wounds. *J Equine Vet Sci* 2017; in press.
- [6] Carmona JU, Gómez WA, López C. Could platelet-rich plasma be a clinical treatment for horses with laminitis? *J Equine Vet Sci* 2018; 61: 46-57.
- [7] Metcalf ES. The effect of platelet-rich plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis (PMIE). *J Equine Vet Sci* 2014; 34: 128.
- [8] Iacopetti I, Perazzi A, Ferrari V, Busetto R. Application of platelet-rich gel to enhance wound healing in the horse: a case report. *J Equine Vet Sci* 2012; 32: 123-28.
- [9] Carmona JU, López C, Samudio IJ. Autologous platelet concentrates as an adjunctive treatment for chronic laminitis in a mare with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Equine Vet Sci* 2013; 33: 191-95.
- [10] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 489-96.
- [11] Kevy S, Jacobson M. Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel. Proc. 27th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, St. Paul, Minnesota, p.262, 2001.
- [12] Schoenfeld H, Griffin M, Muhm M, Doepfmer UR, Von Heymann C, Göktas O, et al. Cryopreservation of platelets at the end of their conventional shelf life leads to severely impaired in vitro function. *Cardiovasc J S Afr* 2006; 17: 125-29.
- [13] Tablin F, Wolkers WS, Walker NJ, Oliver AE, Tsvetkova NM, Gousset K, et al. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets. *Cryobiology* 2001; 43: 114-23.
- [14] Daly PA, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Successful transfusion of platelets cryopreserved for more than 3 years. *Blood* 1979; 54: 1023-27.

- [15] Melaragno AJ, Carciere R, Feingold H. Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80 degrees C. Effects of 2 years of frozen storage at -80 degrees C and transportation in dry ice. *Vox Sang* 1985; 49: 245-58.
- [16] Slichter SJ, Jones M, Ransom J, Gettinger I, Jones MK, Christoffel T, et al. Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. *Transfus Med Rev* 2014; 28: 212-25.
- [17] Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology* 2001; 42: 79-87.
- [18] Pietramaggiore G, Kaipainen A, Ho D, Orser C, Pebley W, Rudolph A, et al. Trehalose lyophilized platelets for wound healing. *Wound Rep Reg* 2007; 15: 213-20.
- [19] Gläufke C, Akhoondi M, Oldenhof H, Sieme H, Wolkers WF. Cryopreservation of platelets using trehalose: the role of membrane phase behavior during freezing. *Biotechnol Prog* 2012; 28: 1347-54.
- [20] Wang X, Fan Y, Shi R, Li J, Zhao S. Quality assessment of platelets stored in a modified platelet additive solution with trehalose at low temperature (10° C) and in vivo effects on rabbit model of thrombocytopenia. *Platelets* 2015; 26: 72-9.
- [21] Pereira RCF, Zacarias GVF, Cantarelli C, Corrêa MMB, Silva GB, Barbosa ALT, et al. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. *Ciênc Rural* 2013; 43: 1122-27.
- [22] Fantini P, Palhares MS, Prades M, Macedo VC, Silva Filho JM, Leme FOP, et al. Criopreservação do plasma rico em plaquetas de equinos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2016; 68: 73-81.
- [23] Brecher G, Schneiderman M, Cronkite EP. The reproducibility and consistency of the platelet count. *Am J Clin Pathol* 1953; 23: 15-26.
- [24] De Rossi R, Coelho AC, Mello JS, Frazílio FO, Leal CR, Facco GG, et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir Bras* 2009; 24: 276-81.
- [25] Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HT. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports* 2011; 21: 554-61.
- [26] Textor, J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011; 27: 275-98.

- [27] Torricelli P, Fini M, Filardo G, Tschon M, Pischedda M, Pacorini A, et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop* 2011; 35: 1569-76.
- [28] López C, Carmona JU. Platelet-rich plasma as an adjunctive therapy for the management of a severe chronic distal limb wound in a foal. *J Equine Vet Sci* 2014; 34: 1128-33.
- [29] Geburek F, Gaus M, van Schie HT, Rohn K, Stadler PM. Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies – a randomized prospective controlled clinical trial. *BMC Vet Res* 2016; 12: 191.
- [30] Carmona JU, Argüelles D, Climent F, Prades, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Sci* 2007; 27: 167-70.
- [31] López C, Carmona JU, Samudio I. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como tratamiento de una fractura escapular y una lesión del plexo braquial producidas por un disparo en un caballo. *Arch Med Vet* 2010; 42: 209-14.
- [32] Romagnoli N, Rinnovati R, Ricciardi G, Lambertini C, Spinella G, Spadari A. Clinical evaluation of intralesional injection of platelet-rich plasma for the treatment of proximal suspensory ligament desmitis in horses. *J Equine Vet Sci* 2015; 35: 141-46.
- [33] Neuhaus SJ, Wishaw K, Lelkens C. Australian experience with frozen blood products on military operations. *Med J Aust* 2010; 192: 203-05.
- [34] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-46.
- [35] Feldman BF, Sink CA, Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
- [36] Fontenot RL, Sink CA, Were SR, Weinstein NM, Dahlgren LA. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Can Vet J* 2012; 53: 1266-72.
- [37] Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability – deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med* 1969; 280: 1094-98.
- [38] Kwirant LAA.; De La Côte FD, Brass KE, Rubin MIB, França RT, Vieira PS, et al. Cryopreservation protocol for equine platelet-rich plasma. *Semin Cien Agrar* 2016; 37: 1389-96.
- [39] Lee DH, Blajchman MA. Platelet substitutes and novel methods of platelet preservation. In: Michelson AD. *Platelets*. San Diego: Elsevier; 2007, p.1297-309.

- [40] Ohto H, Nolle KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2011; 44: 321-25.
- [41] Tablin F, Walker NJ, Hogle SE, Pratt SM, Norris JW. Assessment of platelet growth factors in supernatants from rehydrated freeze-dried equine platelets and their effects on fibroblasts in vitro. *Am J Vet Res* 2008; 69: 1512-19.
- [42] Estrada R, van Weeren R, van de Lest C, Boere J, Nagaly R, Ionita J-C. Effects of autologous conditioned plasma* (ACP) on the healing of surgically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendon. *Pferdeheilk* 2014; 30: 633-42.
- [43] Roffi A, Filardo G, Assirelli E, Cavallo C, Facchini A, Grigolo B. Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? *Biomed Res Int* 2014; 2014: 1-10.

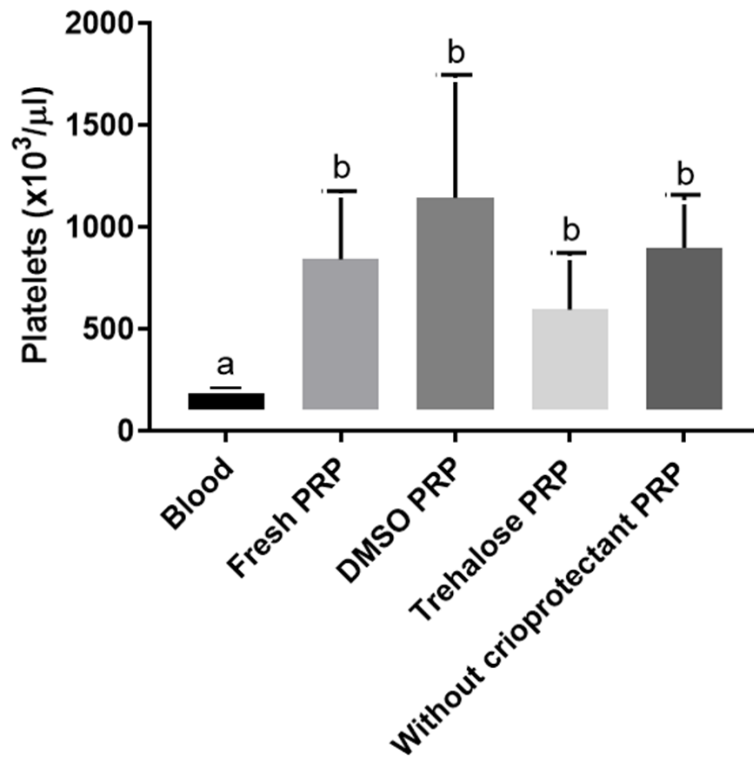


Figure 1. Number of platelets in blood, fresh equine platelet-rich plasma (PRP) and in the samples cooled to 4°C with 6% dimethyl sulfoxide (DMSO), 300mM trehalose, or without cryoprotectant after 14 days of refrigerated storage. Results are presented as mean \pm standard deviation of the mean. Means with different letters differ significantly from each other ($P < 0.05$).

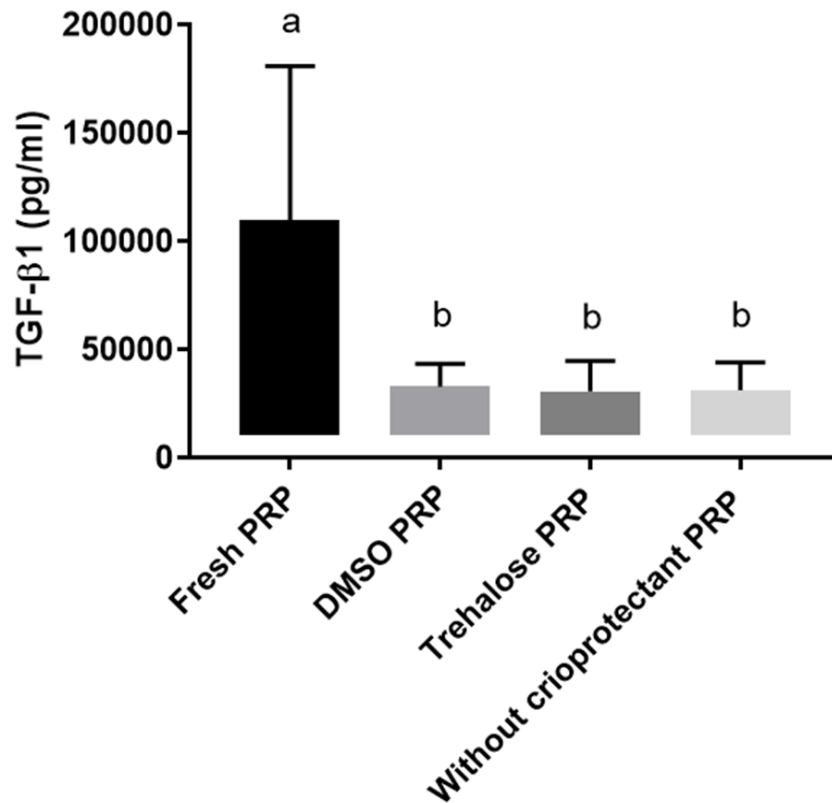


Figure 2. Concentration of transforming growth factor beta 1 (TGF-β 1) in fresh equine platelet-rich plasma (PRP) and in cryopreserved samples at -196°C in liquid nitrogen with 6% dimethyl sulfoxide (DMSO), 300mM trehalose or without cryoprotectant after 14 days of freezing. Results are presented as mean ± standard deviation of the mean. Means with different letters differ from each other (P <0.05).

4. CONCLUSÕES

1. O processo de resfriamento não altera o número de plaquetas contido no PRP, enquanto que a criopreservação reduz a contagem plaquetária.
2. O resfriamento e a criopreservação causam lesões às plaquetas.
3. Os protocolos de resfriamento e de criopreservação das plaquetas reduzem a liberação de TGF- β 1 das plaquetas.
4. O PRP armazenado a baixas temperaturas preserva a capacidade de liberação de TGF- β 1.
5. Os crioprotetores na concentração de 5% de DMSO e de trealose não interferiram no processo de resfriamento, ou na criopreservação do PRP equino.

5. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- BLOCKMANS, D. *et al.* Platelet activation. **Blood Reviews**, v.9, n.3, p.143-156, 1995.
- BÖCK, M. *et al.* Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function. **Transfusion**, v.35, n.11, p.921-924, 1995.
- BOSCH, G. *et al.* The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v.21, n.4, p.554-561, 2011.
- CARDIGAN, R. *et al.* Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. **Vox Sanguinis**, v.88, n.3, p.153-163, 2005.
- CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse.** 2006. 91f. Tese de doutorado em Medicina e Sanidade Animal, Universidade Autônoma de Barcelona.
- CARMONA, J.U. *et al.* Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, p.167-170, 2007.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.31, n.9, p.506-510, 2011.
- CARMONA, J.U. *et al.* 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.
- CARTER, C.A. *et al.* Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, n.3, p.244-255, 2003.
- CROWE, J.H. *et al.* The role of vitrification in anhydrosis. **Annual Review of Physiology**, v.60, p.73-103, 1998.

CROWE, J.H. *et al.* Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.122, n.1, p.41-52, 2003.

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

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

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

DUMONT, L.J. *et al.* A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers. **Transfusion**, v.53, n.1, p.128-137, 2013.

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

FANTINI, P. *et al.* Criopreservação do plasma rico em plaquetas de equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.1, p.73-81, 2016.

GLÄFKE, C. *et al.* Cryopreservation of platelets using trehalose: the role of membrane phase behavior during freezing. **Biotechnology progress**, v.28, n.5, p.1347-1354, 2012.

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

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

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

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

HEROUY, Y. *et al.* Autologous platelet-derived wound healing fact or promotes angiogenesis via $\alpha v \beta 3$ integrin expression in chronic wounds. **International journal of molecular medicine**, v.6, n.5, p.515-524, 2000.

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

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

JOHNSON, L. *et al.* The hemostatic activity of cryopreserved platelets is mediated by phosphatidylserine-expressing platelets and platelet microparticles. **Transfusion**, v.54, n.8, p.1917-1926, 2014.

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

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

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

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

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

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

KWIRANT, L.A.A. *et al.* Cryopreservation protocol for equine platelet-rich plasma. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.3, p.1389-1396, 2016.

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

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

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

LIU, Q. *et al.* Trehalose inhibited the phagocytosis of refrigerated platelets in vitro via preventing apoptosis. **Transfusion**, v.49, n.10, p.2158-2166, 2009.

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

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

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

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

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

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

METCAIF, E.S. The effect of platelet-rich plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis (PMIE). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 128, 2014.

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

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

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

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

MURPHY, S. Platelet storage for transfusion. **Seminars in Hematology**, v.22, n.3, p.165-177, 1985.

NEUHAUS, S.J. *et al.* Australian experience with frozen blood products on military operations. **The Medical Journal of Australia**, v.192, n.4, p.203-205, 2010.

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

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

PEREIRA, R.C.F. *et al.* Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. **Ciência Rural**, v.43, n.6, p.1122-1127, 2013.

PEREIRA, R.C.F. *et al.* Evaluation of three methods of platelet-rich plasma for treatment of equine distal limb skin wounds. **Journal of Equine Veterinary Science**, *in press*, 2017.

PICCIONE, G. *et al.* Effect of different storage conditions on platelet aggregation in horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, n.7, p.371-375, 2010.

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

PIETRAMAGGIORI, G. *et al.* Trehalose lyophilized platelets for wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.15, n.2, p.213-220, 2007.

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

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

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

REGHINI, M.F.S. *et al.* Effect of use of platelet rich plasma on post-breeding uterine inflammatory response of mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, n.1, p.127, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

SCHOENFELD, H. *et al.* Cryopreservation of platelets at the end of their conventional shelf life leads to severely impaired *in vitro* function. **Cardiovascular Journal of South Africa**, v.17, n.3, p.125-129, 2006.

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

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

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

SUM, R. *et al.* Wound healing properties of trehalose-stabilized freeze-dried outdated platelets. **Transfusion**, v.47, n.4, p.672-679, 2007.

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

TABLIN, F. *et al.* Assessment of platelet growth factors in supernatants from rehydrated freeze-dried equine platelets and their effects on fibroblasts *in vitro*. **American Journal of Veterinary Research**, v.69, n.11, p.1512-1519, 2008.

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

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

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

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

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

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

WANG, X. *et al.* Quality assessment of platelets stored in a modified platelet additive solution with trehalose at low temperature (10° C) and in vivo effects on rabbit model of thrombocytopenia. **Platelets**, v.26, n.1, p.72-79, 2015.

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

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

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

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

WOLKERS, *et al.* Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. **Cryobiology**, v.42, n.2, p.79-87, 2001.

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

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

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