



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA AVALIAÇÃO DE
CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO

PORTO ALEGRE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

***PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA AVALIAÇÃO DE
CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO***

CAMILA SERINA LASTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias – UFRGS como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Patologia Clínica Veterinária sob
orientação do Prof. Félix H. Díaz González

Porto Alegre, 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Lasta, Camila Serina
PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA
AVALIAÇÃO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO /
Camila Serina Lasta. -- 2016.
186 f.
Orientador: Félix H. Díaz González.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2016.

1. cães. 2. hemoterapia veterinária. 3. lesões de
armazenamento. 4. metabolismo plaquetário. 5.
concentrado de plaquetas. I. González, Félix H. Díaz,
orient. II. Título.

Camila Serina Lasta

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA AVALIAÇÃO DE
CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO**

Aprovado em 01 de abril de 2016.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix H. D. González

Orientador e Coordenador da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten (UFRGS)

Membro da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Rafael Figuera (UFSM)

Membro da Comissão Avaliadora

Prof^a. Dr^a. Simone Tostes de Oliveira Stedile (UFPR)

Membro da Comissão Avaliadora

“O conhecimento científico é um conjunto de afirmações de graus variados de certeza – algumas mais incertas algumas quase certas, nenhuma absolutamente certa.”

(RICHARD P. FEYNMAN)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser concluído sem o apoio da maravilhosa equipe que acreditou na ideia e dedicou tempo, energia e conhecimentos para que tudo terminasse da melhor maneira possível. Cada um de vocês, com seu talento particular, contribuiu de maneira inenarrável (mas que tentarei narrar) para o sucesso deste experimento.

Nico, minha irmãzinha de projeto e madrinha deste trabalho. Nossa professorinha querida foi quem começou tudo isso e me deu o prazer de dividir todas as emoções que viriam. Veterinária competente, muito organizada, foi uma madrinha/mãe, sempre presente - mesmo longe - não preciso dizer que sem tua ajuda nada disso seria possível. Seu super-poder: organização e persistência.

Mag, meu irmãozinho da vida. Obrigada por acreditar em nós e topou participar da nossa maratona plaquetária; por nos acompanhar cedinho em coletas que dependiam “da autoestima da veia”, por arranjar tempo para nos ajudar a pensar, a discutir, a escrever. Acabamos descobrindo um talento estatístico que nos salvou em mais de uma ocasião. Obrigada por ser esta pessoa maravilhosa e multitalentos: coletador, estatístico, autor, amigo. Seu superpoder: inteligência nas ciências biológicas, exatas e humanas.

Sílvia, obrigada por toda a dedicação que tivestes a este projeto. Sua experiência foi indispensável para o sucesso do mesmo. Agradeço de coração sua ajuda, sua humildade nos ensinando tudo o pôde sobre citometria, nunca cansando de repetir se fosse necessário. Viagens com amostras, kits, nitrogênio, empréstimo de congelador, aulas particulares... A Sílvia é aquela pessoa que não pensa duas vezes antes de te dar o casaco dela em um dia frio. E passar frio! Seu superpoder: generosidade extrema que faz com que ela sempre dê um jeito para tudo.

Natália foi um anjo que caiu e acertou em cheio este projeto. Tua participação foi decisiva para que este trabalho transcorresse com sucesso. Assim como a Silvia, nos ensinou muita coisa. Prática e organizada, fez praticamente todas as citometrias e ainda dava conta da rotina do laboratório. Resolveu participar de verdade, nos ajudando a pensar, procurando artigos de veterinária, e conheceu um mundo novo, onde os pacientes não falam o que sentem, mas também merecem pesquisas que visem melhorar de alguma forma suas vidas. Seu superpoder: pipetadora mais rápida do velho oeste, diante de 60 tubos de ensaio sabe exatamente ‘quem é quem’.

Bruninha, minha Gold-Girl. Outro anjo que caiu neste projeto sem pedir licença. Nem tenho palavras para explicar o quanto esta menina nos ajudou. Ela simplesmente conseguiu e organizou mais de uma centena de cães candidatos a doadores com tutores dispostos a deixar seus cães participarem deste projeto. Não sendo o bastante, madrugou conosco, ajudou nas avaliações dos cães, nas coletas de bolsas, no manejo dos doadores. Nunca perguntou o que

ganharia em troca da ajuda, nunca reclamou de estar cansada, ou de nada. Seu superpoder: ela é a Gold-Girl, encanta cães e pessoas. Tem meu carinho e respeito para sempre.

Carol, Ceci e Dani, nossas estagiárias iniciantes no mundo da pesquisa. Obrigada pela ajuda nas coletas, no processamento das amostras e das bolsas e também nas avaliações das amostras que algumas vezes parecia interminável, mas com ajuda de vocês foi mais fácil.

Agradeço também ao pessoal do transporte da UFRGS, especialmente o Alexandre, que compreendeu que não poderíamos fazer apenas uma saída por mês; Seu João, motorista muito querido que nos acompanhou no sol e na chuva sempre de bom humor; apesar de ter medo de cachorro e não descer do carro.

Lu e Vanessa, que nos cederam o espaço e os equipamentos da Blut's para a realização deste trabalho. Obrigada principalmente pela compreensão quando atrasamos e atrapalhamos a rotina do laboratório, quando fizemos bagunça com vários doadores pela Blut's, e por confiarem a chave para nós em domingos e feriados. Hematologista e pesquisadora, quando eu não conseguia mais pensar, a Lu dedicou seu tempo e experiência me ajudando a finalizar a tese com seus retoques finais.

Meu orientador Félix, após 10 anos de minha chegada a Porto Alegre - como tua residente - agradeço sua confiança em mim e a compreensão quando tudo atrasou.

Não posso deixar de registrar minha gratidão à minha mãe, que sempre confiou em mim e nas minhas escolhas. Trabalhou duro para me oferecer o melhor que pôde, sempre me mostrando que o estudo é a coisa mais valiosa que eu poderia ter na vida. Ela acertou parcialmente, pois além do estudo tenho minha valiosíssima família mista. Obrigada Ricardo, pela paciência, compreensão e pela força que me deste durante todo este longo caminho acadêmico. Sem teu apoio não sei se teria forças. Tu e nossos filhos de bigodes e 4 patas deixam minha vida mais completa e feliz. Depois de 10, 13 horas de trabalho, sábados, domingos... tudo fazia mais sentido ao chegar em casa e receber o carinho do Ricardo e da Pretinha (que ainda queria passear! Nos deixando muito felizes) e os protestos do Fino, do Borges e da Mocinha – que miavam como dizendo: “Por onde tu andavas mãe?? E esses cheiros estranhos?? Queremos carinho e comida!!”

Por último, mas não menos importante, preciso agradecer com muito carinho todos os tutores que confiaram em nós e permitiram a participação de seus cães; e também aos cães - que humildemente deitaram na nossa mesa e doaram seu sangue por este projeto. Vocês são os alvos do nosso estudo e esperamos sinceramente que possamos contribuir com a hemoterapia canina na medicina veterinária.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padronização das centrifugações das bolsas de sangue total e PRP canino.	84
Tabela 2. Metabolismo plaquetário (média \pm desvio padrão) <i>in vitro</i> de plaquetas caninas armazenadas por 5 dias.....	85
Tabela 3. Parâmetros de qualidade em CPs caninos com menor ou maior número de plaquetas por unidade.	88
Tabela 4. Agregação plaquetária durante armazenamento por 5 dias.	97
Tabela 5, 6, 7. Correlações de Pearson nos 3 dias de avaliação.	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da biogênese plaquetária (Patel et al., 2005).	26
Figura 2. Receptores envolvidos na adesão e agregação plaquetária no sítio de injúria (Jackson, 2007).	28
Figura 3. Microscopia eletrônica de plaqueta em repouso (Semple, Italiano e Freedman, 2011).	29
Figura 4. Estrutura da mitocôndria (Mohamad et al., 2005).	30
Figura 5. Recrutamento de plaquetas ao sítio de injúria (Semple, Italiano e Freedman, 2011).	31
Figura 6. Microscopia eletrônica evidenciando mudança de forma e formação de pseudópodes em plaquetas ativadas (Wagner et al., 2002).	32
Figura 7. (A) A ligação de agentes patogênicos e agonistas presentes no meio infeccioso acarreta ativação plaquetária e reforça a resposta inflamatória e o sistema imune; (B) Micropartículas plaquetárias carregam IL-1B, aumentando a permeabilidade vascular (Rondina e Garraud, 2014).	34
Figura 8. Mudança de forma associada à diminuição do swirling (Maurer-Spurej e Chipperfield, 2007).	38
Figura 9. Obtenção de CP através do método do PRP (Anvisa, 2014).	44
Figura 10. Pellet de plaquetas no fundo da bolsa após segunda centrifugação.	45
Figura 11. Metabolismo plaquetário. (A) glicólise; (B) ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Tynngård, 2009).	47
Figura 12. Via extrínseca de ativação da apoptose. DD, domínio de morte; DED, efetor do domínio de morte (Grivicich, Regner, Rocha, 2007).	55

Figura 13. Via intrínseca da apoptose (Grivicich, Regner, Rocha, 2007).....	55
Figura 14. Citômetro de fluxo (Brown e Wittwer, 2000).....	57
Figura 15. Representação esquemática da ligação da Anexina V à fosfatidilserina em células apoptóticas (BD, 2007).....	59
Figura 16. Bolsas de CP canino com cânulas para coleta através da introdução de agulha (círculo vermelho).	67
Figura 17. Potenciômetro utilizado para mensuração de pH em CP canino.	69
Figura 18. Analisador de gases i-Stat utilizado para determinação de diversos parâmetros em CP canino.....	70
Figura 19. Fita colorimétrica para mensuração de pH.....	70
Figura 20. Princípio básico do agregômetro (Jackson, 2007).	72
Figura 21. Agregômetro utilizado para avaliar CP canino.	73
Figura 22. Gráfico de agregação plaquetária.....	74
Figura 23. Gate inicial da população de plaquetas.	75
Figura 24. Gráficos mostrando a porcentagem de marcação para CD61 e CD62P ao longo do período de estoque.....	102
Figura 25. Diminuição do $\Delta\Psi_m$ e aumento do swelling durante o armazenamento de concentrado de plaquetas armazenado por 5 dias. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 5.....	108
Figura 26. Diminuição do $\Delta\Psi_m$ durante o armazenamento caracterizada pelo deslocamento da população analisada para FL1.	110

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Concentração de plaquetas nas unidades de CP canino armazenado por 5 dias. 86
- Gráfico 2. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro do pH 22°C (método do pHmetro) dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 90
- Gráfico 3. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da pressão parcial de oxigênio dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 91
- Gráfico 4. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da pressão parcial de dióxido de carbono dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 92
- Gráfico 5. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da concentração de bicarbonato dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 92
- Gráfico 6. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da concentração de ATP dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 93
- Gráfico 7. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da concentração de glicose e lactato dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 94
- Gráfico 8. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da determinação do PDW e MPV dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 95
- Gráfico 9. Gráfico de barras representando a avaliação do swirling durante o armazenamento de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). 96

Gráfico 10. Agregação induzida por colágeno e ADP de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.	97
Gráfico 11. Agregação induzida por ácido araquidônico de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.	98
Gráfico 12. Expressão de CD62P na superfície plaquetária de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.	101
Gráfico 13. Exposição de PS de acordo com ligação a Anexina V em concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.	103
Gráfico 14. Apoptose plaquetária induzida por estaurosporina. Observa-se deslocamento das plaquetas com caspase ativa.	105
Gráfico 15. Plaquetas com marcação para caspase ativa durante 5 dias de armazenamento.	105
Gráfico 16. Liberação de LDH de concentrados de plaquetas armazenados por 5 dias.	106
Gráfico 17. Técnica de sondas MitoTracker para avaliação da viabilidade mitocondrial em concentrados de plaquetas armazenados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).	108
Gráfico 18. Avaliação do $\Delta\Psi_m$ em concentrados de plaquetas armazenados por 5 dias com JC-1 (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). Observar redução da marcação de JC-1 agregados (FL2, JC-1ativas) (A) e aumento da marcação para JC-1 monômeros (FL1, JC-1 baixo potencial) (B) ao longo do tempo.	109

LISTA DE ABREVIATURAS

- $\Delta\Psi_m$ – potencial de membrana mitocondrial
- AABB – American Association of Blood Banks
- ACD - ácido cítrico-dextrose
- ADP – adenosina difosfato
- ALT – alanina amino transferase
- Apaf-1 – fator de ativação de protease associada à apoptose
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATP – adenosina trifosfato
- BSA – albumina bovina
- BTHC - butiril tri-n-hexil citrato
- CID – coagulação intravascular disseminada
- CD – denominação de grupamento
- CF – citometria de fluxo
- CP – concentrados de plaquetas
- DED – efetor do domínio de morte
- DEHP – di (2-etilhexil) ftalato
- DINCH – Di(isononil) ciclohexano 1,2 dicarboxilato
- DnDP – di-n-deciltalato
- DMSO – dimetil sulfóxido
- ELISA – enzyme linked immunosorbent assay
- EROS – espécies reativas de oxigênio
- FADD - proteína de morte associada ao Fas

FITC – isotiocionato de fluoroceína

GP – glicoproteína

H⁺ – íon hidrogênio

HCO₃⁻ – bicarbonato

IAP – proteínas inibidoras de apoptose

IL – interleucinas

JC-1 – sonda fluorescente J-aggregate forming cation

LDH – lactato desidrogenase

MoAB – anticorpo monoclonal

MPV – volume plaquetário médio

MTG – MitoTracker Green

MTR – MitoTracker Red

PAF – fator ativador de plaquetas

PAS – solução aditiva plaquetária

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PCO₂ – pressão parcial de dióxido de carbono

PDW – distribuição média do tamanho plaquetário

PE – ficoeritrina

PO₂ – pressão parcial de oxigênio

PPP – plasma pobre em plaquetas

PRP – plasma rico em plaquetas PS – fosfatidilserina

PSL – lesões plaquetárias de armazenamento

PVC – policloreto de vinila

SAGM – salina, adenina, glicose, manitol

SCA – sistema canicular aberto

Smac/DIABLO – segundo ativador mitocondrial de caspase/Proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI

TCA – ciclo dos ácidos tricarboxílicos

TOTM – tri(2-etilhexil) trimelitato

vWF – fator de von Willebrand

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA AVALIAÇÃO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO

Autor: Camila Serina Lasta

Orientador: Félix H. D. González

RESUMO

A hemoterapia veterinária tem evoluído muito nos últimos anos, sempre seguindo os padrões de hemoterapia humana. Ao mesmo tempo em que a transfusão de concentrado de plaquetas tem sido cada vez mais requisitada em medicina veterinária ainda são escassas as pesquisas com alvo no concentrado de plaquetas canino. Este trabalho apresenta uma revisão da literatura sobre os aspectos estruturais e funcionais das plaquetas, indicações do uso de concentrado de plaquetas em cães, métodos de preparo e características desejadas em um concentrado de plaquetas; além de uma revisão sobre metabolismo, lesões plaquetárias de armazenamento e o uso da citometria de fluxo para avaliação de plaquetas. O presente estudo teve como objetivo padronizar técnicas de avaliação do concentrado de plaquetas canino relatando as mudanças observadas durante 5 dias de armazenamento. Para tal, foram avaliados aspectos de morfologia, ativação, função, metabolismo e indicadores de lesão mitocondrial e morte celular em CP canino através de técnicas de agregação plaquetária, bioquímica celular e citometria de fluxo durante o armazenamento. Foram utilizadas 22 bolsas de CP canino, avaliadas nos dias 1, 3 e 5 após a coleta. Todas as bolsas apresentaram-se negativas quanto ao isolamento de micro-organismos. Houve diminuição significativa da concentração de glicose, pCO₂, bicarbonato, ATP, pH e *swirling*; aumento da concentração de lactato e da pO₂; poucos sinais de ativação plaquetária; e diminuição do potencial de membrana mitocondrial no final do período estudado. Não foram observadas mudanças nos testes de exposição de fosfatidilserina e caspase durante o período avaliado. As sondas MitoTracker Green e MitoTracker Red podem ser utilizadas na avaliação de lesão mitocondrial de plaquetas com resultados fidedignos. Foram padronizadas técnicas que não foram descritas na avaliação de plaquetas caninas, e que poderão ser utilizadas em outros estudos sobre o tema. Com este trabalho, é possível ter dados concretos a respeito das alterações metabólicas ocorridas ao longo do período de armazenamento. Estes dados servem como base para outros estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados ao uso de concentrado de plaquetas. Espera-se gerar conhecimento e motivar mais pesquisas nas áreas de hematologia e hemoterapia veterinária.

PALAVRAS - CHAVE: cães, hemoterapia veterinária, lesões de armazenamento, metabolismo plaquetário.

STANDARDIZATION OF BIOCHEMICAL TECHNIQUES FOR CANINE PLATELET CONCENTRATE EVALUATION

Author: Camila Serina Lasta

Advisor: Félix H. D. González

ABSTRACT

Veterinary hemotherapy has evolved in the last years, following standards of human blood therapy. While the transfusion of platelet concentrate has been increasingly requested in veterinary medicine are insufficient studies on concentrate of canine platelets. This paper presents a review about structural and functional aspects of platelets, indications for the use of platelet concentrates in dogs, preparation methods and characteristics desired in a platelet concentrate; metabolism, platelet storage lesion and the use of flow cytometry to evaluate platelets. This study aimed to standardize canine platelet concentrate techniques reporting observed changes in 5 days of storage. For this purpose, were evaluated morphology, activation, function, metabolism, indicators of mitochondrial damage and cell death through the use of platelet aggregation techniques, biochemistry and cell flow cytometry. We evaluate standard techniques no earlier used in the evaluation of canine platelets, which can be used in other studies on the subject. For this, 22 canine platelet concentrates were evaluated on days 1, 3 and 5 after collection. All samples were negative for contamination. There was observed a significant decrease in glucose concentration, pCO₂, bicarbonate, ATP, pH and swirling; enhance lactate and pO₂ concentrations; few platelet activation signals; and decreased mitochondrial membrane potential in the end of the study period. There were no changes in phosphatidylserine and caspase exposure tests during the study period. The results reveal the the MitoTracker Green and MitoTracker Red dyes can be used in evaluation of platelets mitochondrial injury with reliable results. With this work, it was possible to have concrete information about the metabolic changes in canine platelet concentrate during the storage period. These data serve as a basis for other in vitro and in vivo studies regarding the use of canine platelet concentrate. The expectation of this research was to generate knowledge and encourage more research in hematology and veterinary hemotherapy.

KEY-WORDS: dogs, veterinary hemotherapy, platelet storage lesions, platelet metabolism.

SUMÁRIO

1.	JUSTIFICATIVA	20
2.	QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO	23
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1.	INTRODUÇÃO	25
3.2.	PLAQUETAS – ESTRUTURA E FUNÇÃO	25
3.3.	USO DE PLAQUETAS NA CLÍNICA MÉDICA	35
3.4.	O CONCENTRADO DE PLAQUETAS	37
3.5.	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS	43
3.6.	METABOLISMO PLAQUETÁRIO DURANTE O ARMAZENAMENTO	45
3.7.	CITOMETRIA DE FLUXO NA ANÁLISE DE PLAQUETAS	56
4.	OBJETIVOS E METAS	61
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	62
5.1.	AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO	66
5.1.1.	PARÂMETROS DESCRITIVOS	67
5.1.2.	AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PLAQUETÁRIO	68
5.1.3.	AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	72
5.1.4.	AVALIAÇÃO DE ATIVAÇÃO, APOPTOSE E LESÃO MITOCONDRIAL PLAQUETÁRIA ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO	75
5.2.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	81
5.3.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	81
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83

6.1.	PADRONIZAÇÃO DA CENTRIFUGAÇÃO	83
6.2.	PARÂMETROS DESCRITIVOS	85
6.3.	AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PLAQUETÁRIO	89
6.4.	MORFOLOGIA PLAQUETÁRIA	95
6.5.	FUNÇÃO PLAQUETÁRIA	97
6.6.	GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	99
6.7.	MARCADORES DE APOPTOSE E NECROSE CELULAR.....	102
6.8.	LESÃO MITOCONDRIAL	107
7.	ARTIGOS	113
8.	CONCLUSÕES	165
	APÊNDICES.....	167
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170

1. JUSTIFICATIVA

A transfusão de concentrado de plaquetas (CP) canino é indicada no manejo clínico e profilático de sangramentos devidos a trombocitopenias ou trombocitopatias, como em casos de coagulação intravascular disseminada (CID) ou quando há necessidade de intervenção cirúrgica em pacientes com alteração da hemostasia primária (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Schubert e Devine, 2010). Avanços principalmente nas áreas de terapia intensiva e oncologia veterinária nos últimos anos foram um impulso para a maior demanda dos hemocomponentes, entretanto, a disponibilidade especialmente de concentrado de plaquetas é escassa, devido principalmente a dificuldades na sua obtenção e ao curto período de viabilidade. Soma-se a isto o fato que muitos destes pacientes necessitam de múltiplas transfusões de plaquetas. Enquanto a disponibilidade é escassa, a procura por CP aumenta à medida que as vantagens do fracionamento sanguíneo difundem-se no meio veterinário (Callan, Appleman e Sachais, 2009).

Durante o estoque as plaquetas sofrem alterações estruturais, bioquímicas e funcionais chamadas de lesões de armazenamento ou “lesões plaquetárias de estoque ou armazenamento” (PSL, do inglês *platelet storage lesions*), um processo multifatorial que inclui consumo de energia, ativação e apoptose plaquetárias; limitando o uso clínico de CPs (Leytin *et al.*, 2008; Ohto, H. e Nollet, K. E., 2011). Segundo Schubert & Devine (2010), as PSL podem ser definidas como “*a soma de todas as alterações deletérias que ocorrem desde a coleta do doador até o momento da transfusão a um receptor e que conduzem a danos progressivos na estrutura e função plaquetárias*”. Segundo tais autores, essas mudanças cursam com reorganização do citoesqueleto plaquetário e mudanças na membrana lipídica, perda da expressão de glicoproteínas de membrana de modo a diminuir a função e a viabilidade plaquetárias, e conseqüentemente a qualidade do hemocomponente.

As PSL são um processo multifatorial e estão relacionadas com a diminuição da funcionalidade e da meia-vida plaquetária após a transfusão (Hayashi *et al.*, 2011; Ohto, H. e Nollet, K. E., 2011), de forma que entendê-las e minimizá-las deve ser um objetivo a ser alcançado na hemoterapia veterinária (Kaufman, 2006; Callan, Appleman e Sachais, 2009). As PSL podem ser avaliadas através de: 1) marcadores de superfície expressos nestas situações, 2) liberação de citocinas, 3) capacidade de agregação das plaquetas em resposta a um agonista e 4) avaliação da atividade metabólica - indicada por mudanças no pH, aumento

na produção de lactato e na liberação de lactato desidrogenase (LDH), bem como diminuição da disponibilidade de glicose (Kaufman, 2006; Tynngård, 2009; Tynngård, Trinks e Berlin, 2010; Ohto, Hitoshi e Nollet, Kenneth E., 2011; Picker, 2011). Também são importantes os marcadores de apoptose e a avaliação mitocondrial das plaquetas, pois estes mecanismos não foram avaliados em plaquetas caninas sob condições de armazenamento de banco de sangue (22°C e agitação constante) e não se sabe o papel exato da apoptose no desenvolvimento das PSL (Perrotta, Perrotta e Snyder, 2003; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; 2013). Entender o mecanismo da apoptose e as alterações mitocondriais das plaquetas estocadas em condições padrão de banco de sangue poderá servir de base para pesquisas que visem desenvolver estratégias de bloqueio da apoptose, aumentando a viabilidade celular e assim o tempo de estoque do CP (Li *et al.*, 2000; Leytin *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2011; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; 2013).

Por serem armazenadas a temperatura ambiente (20-24°C), as plaquetas mantêm seu metabolismo ativamente e também estão mais sujeitas a proliferação bacteriana - fatos que restringem seu tempo de armazenamento a cerca de cinco dias (4 a 7), dependendo da legislação local (Burns e Werch, 2004; Schubert e Devine, 2010; Ohto, H. e Nollet, K. E., 2011). Desta forma, pesquisas em centros de hemoterapia humana têm sido feitas com o foco no aumento do tempo de armazenamento das plaquetas (Slichter *et al.*, 2006; Amorini *et al.*, 2007). Para isso, soluções aditivas que têm sido utilizadas e avaliadas (Karnicki *et al.*, 2003; Tynngård, Trinks e Berlin, 2012; Leitner *et al.*, 2015) em plaquetas humanas, podem ter valor na Medicina Veterinária, desde que técnicas de avaliação de CPs caninos em plasma sejam padronizadas (Van Der Meer *et al.*, 2010; Alhumaidan e Sweeney, 2012).

É preciso entender melhor o metabolismo das plaquetas caninas armazenadas em CP “padrão”, ou seja, no próprio plasma, para que estudos futuros possam ser realizados no sentido de estender o tempo de armazenamento através do uso de soluções aditivas. Para que os bancos de sangue veterinários possam oferecer um produto de qualidade, é necessária a padronização da produção do CP e também das técnicas que avaliam a função e a viabilidade das plaquetas caninas estocadas. Entendendo melhor o metabolismo das plaquetas caninas armazenadas poder-se-á avaliá-las *in vivo*, futuramente, com estudos que visem investigar a sua sobrevivência no receptor, após a transfusão, pois sabe-se que redução da viabilidade plaquetária *in vivo* está relacionada com mudanças observadas *in vitro*, de modo que descobrir

quais parâmetros *in vitro* representam verdadeira correlação com a sobrevivência plaquetária pós transfusão é um desafio na medicina e também na veterinária.

O presente trabalho propõe avaliar o CP canino através de técnicas de agregação plaquetária, bioquímica celular e citometria de fluxo durante o armazenamento a fim de descrever as mudanças ocorridas, bem como padronizar as técnicas utilizadas para que possam ser úteis em outros estudos sobre o tema. Com este trabalho, espera-se entender melhor o metabolismo plaquetário canino, gerando conhecimento na área de hematologia e hemoterapia veterinária.

2. QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO

As plaquetas são extremamente sensíveis a estímulos, de forma que a coleta e o processamento, por si só, já são estímulos suficientes para a ativação (Holme, Heaton e Courtright, 1987; Solheim *et al.*, 2004). Durante o período de estoque, as plaquetas mantêm seu metabolismo de forma ativa, resultando em mudanças estruturais e funcionais que culminam em perda de viabilidade e baixo sucesso transfusional (Tynngård, 2009; Ohto & Nollet, 2011).

Infelizmente, não existe um teste único que possa avaliar com precisão a qualidade e viabilidade plaquetária, de modo que atualmente são utilizados diversos testes em conjunto na tentativa de assegurar que o banco de sangue disponha de um produto de qualidade (Tynngard *et al.*, 2008; Zhang, Carter, Devine, *et al.*, 2008; Devine e Serrano, 2010). Para fins de validação, qualificação e composição do CP são recomendados testes adicionais aos comumente utilizados, que revelem alterações na morfologia celular, no metabolismo ou estado bioquímico e na ativação plaquetária, como expressão de marcadores de ativação na membrana externa e mudanças na resposta fisiológica (Solheim *et al.*, 2004; Maurer-Spurej e Chipperfield, 2007).

Existem poucos dados sobre a avaliação de função plaquetária e qualidade do CP canino sob condição de rotina de processamento e armazenamento, o que limita o desenvolvimento e avanço da hemoterapia veterinária (Klein, Adamik e Mischke, 1999; Sink, 2002; Costa, 2011; Hoareau *et al.*, 2014). As alterações ocorridas podem ser demonstradas através de mudanças na morfologia da plaqueta e em indicadores bioquímicos, na liberação de grânulos, na expressão de glicoproteínas de superfície e de marcadores de apoptose (Solheim *et al.*, 2004; Jandrey, 2012). Segundo Cookson *et al.* (2010), marcadores de apoptose *in vitro*, como mensuração de $\Delta\Psi_m$ (potencial de membrana mitocondrial), caspases, exposição de fosfatidilserina e geração de micropartículas podem ser bons indicadores de sobrevivência pós-transfusão em humanos. Estudos similares podem e devem ser realizados em cães. A padronização das técnicas utilizadas em CP humanas para utilização em CP caninas permitirá que as mesmas sejam utilizadas em pesquisas que tenham por objetivo aumentar a qualidade e o tempo de armazenamento de plaquetas caninas. Ainda, permitirá que no futuro possamos

realizar testes *in vivo* de sobrevivência de plaquetas pós-transfusão, contribuindo com o avanço da hemoterapia veterinária. Cookson *et al.* (2010), por exemplo, demonstraram que plaquetas armazenadas por 12 dias na solução aditiva Composol (Fresenius HemoCare) apresentaram índices de metabolismo/ativação plaquetária equivalentes a plaquetas armazenadas em plasma aos nove dias, gerando expectativa de avanços promissores.

Apesar de alguns dados conflitantes, a citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada na avaliação de lesão de estoque plaquetário (*platelet storage lesion* – PSL) em bancos de sangue humanos. Embora não exista um consenso a respeito de quais testes devem obrigatoriamente ser realizados a fim de assegurar a melhor qualidade do CP, os autores escolheram arbitrariamente avaliar importantes marcadores de função plaquetária – como ativação (CD62P), apoptose e morte celular (caspase, anexina V, lactato desidrogenase), lesão mitocondrial (Mitotracker e JC-1), metabolismo plaquetário (pH, pO₂, pCO₂, glicose, lactato, bicarbonato e ATP), funcionalidade plaquetária (agregometria) e características morfoestruturais de qualidade do CP canino (volume e anisocitose plaquetárias, número de plaquetas e leucócitos e presença de *swirling*) nos dias 1, 3 e 5 de armazenamento. Desta forma, propõe-se padronizar técnicas ainda não descritas em CPs caninos para que possam ser utilizadas na avaliação de plaquetas em bolsas de concentrado canino, agregando valor ao serviço de hemoterapia veterinária e visando atender às expectativas de mercado ao oferecer produtos e serviços de qualidade aos pacientes caninos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. INTRODUÇÃO

As plaquetas são os menores elementos celulares sanguíneos. Sua importância na manutenção da hemostasia é reconhecida desde o final do século 19 (Jackson, 2007), entretanto, apenas mais recentemente seu envolvimento no processo inflamatório, defesa contra patógenos e no recrutamento celular foi identificado (Semple e Freedman, 2010; Semple, Italiano e Freedman, 2011; Rondina e Garraud, 2014; Cognasse *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2015). A fim de contextualizar a presente tese, esta introdução começa fornecendo uma breve descrição da estrutura, formação e função plaquetária; histórico da hemoterapia veterinária; o papel das plaquetas na medicina transfusional - incluindo as características e métodos de preparo do concentrado de plaquetas (PC). Também será abordada a utilização da citometria de fluxo na análise de plaquetas e uma revisão sobre as mudanças sofridas pelas plaquetas durante o armazenamento, a fim de fornecer uma base para posterior discussão em forma de artigos científicos.

3.2. PLAQUETAS – ESTRUTURA E FUNÇÃO

Em mamíferos as plaquetas não são consideradas células verdadeiras, pois são fragmentos do citoplasma dos megacariócitos (Boudreaux, 2010b; Russell, 2010), mas para fins de simplificação serão tratadas como tais no texto que segue.

A megacariocitopoiese tem início a partir de uma célula pluripotencial que avança em sua diferenciação estimulada principalmente pela trombopoietina - secretada principalmente pelo fígado – mas também por fatores de crescimento e citocinas como interleucinas (IL-1, IL-3, fator estimulador de colônia granulocítica-monocítica, eritropoietina, entre outros). A produção das plaquetas é regulada de acordo com a massa plaquetária de cada indivíduo, podendo aumentar mais de 20 vezes em casos de grande demanda. As plaquetas possuem receptores que se ligam à trombopoietina, internalizando e degradando-a, de forma que em caso de trombocitopenia, a grande quantidade de trombopoietina livre atuará estimulando a produção e liberação de plaquetas. Os megacariócitos possuem pseudópodes que penetram nos entre as células endoteliais e, através de um processo de fragmentação citoplasmática as

plaquetas vão sendo liberados para a circulação periférica gradativamente (Patel, Hartwig e Italiano, 2005; Kickler, 2006; Jurk e Kehrel, 2008; Russell, 2010). Cada megacariócito pode gerar centenas de plaquetas (Figura 1), que nos cães possuem meia-vida na circulação de 5 a 7 dias, quando então são removidas da circulação por macrófagos, principalmente no baço e fígado (Russell, 2010).

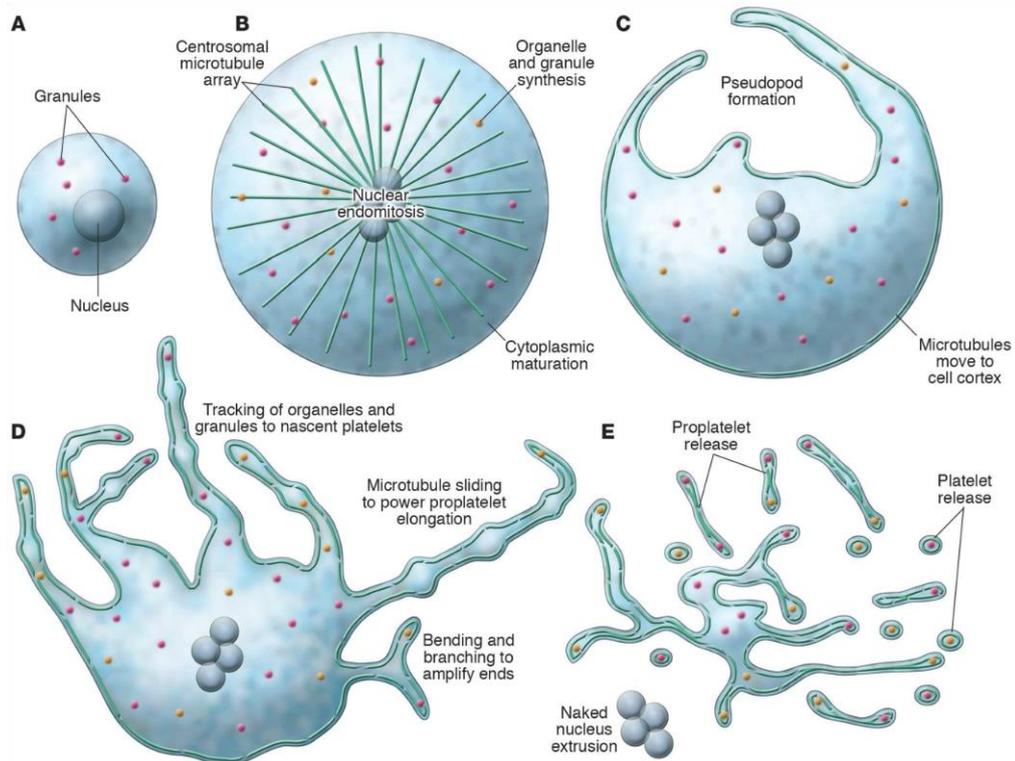


Figura 1. Visão geral da biogênese plaquetária. A) Megacariócito imaturo; B) Megacariócito sofre endomitose nuclear, síntese de organelas e maturação citoplasmática; C) Formação da pró-plaqueta começa com o desenvolvimento de grossos pseudópodos; D) Deslizamento dos microtúbulos impulsiona a formação das extremidades pró-plaquetárias, que se expandem por toda a célula, enquanto ocorre a ramificação ampliada destas extremidades pró-plaquetárias existentes; E) O citoplasma do megacariócito é convertido em uma massa de plaquetas liberadas individualmente a partir da extremidade pró-plaquetária; eventualmente ocorre extrusão do núcleo (Patel et al., 2005).

As plaquetas são células extremamente complexas, que possuem receptores de superfície capazes de reconhecer sinais em seu ambiente e interagir com íons, proteínas, nucleotídeos e fosfolípidos em uma rede heterogênea de biomoléculas (Boudreaux, 2010b). Em repouso possuem formato discoide, cerca de 2 a 5 µm de diâmetro, e não apresentam filopodia, alteração conformacional caracterizada por projeções citoplasmáticas (Jurk e Kehrel, 2008; Boudreaux, 2010b).

As plaquetas possuem citoesqueleto, uma rede tridimensional de microfilamentos compostos por actina, espectrina, aducina, filamina e GPIb/X/V. É o citoesqueleto que determina o formato da plaqueta, bem como sua estrutura geral, sendo uma estrutura dinâmica, responsável também pelo movimento celular e transporte de organelas pelo citoplasma. Alterações no citoesqueleto podem levar à fragmentação e formação de micropartículas (Boudreaux e Catalfamo, 2010).

A chamada zona periférica da plaqueta é a região mais externa, uma membrana plasmática, constituída por uma bicamada lipoproteica, com glicoproteínas (GP) que atuam como receptores, proteínas adesivas, enzimas e fosfolípidos (Figura 2). As GP de membrana são receptores especializados na mediação de importantes respostas fisiológicas. GPIb-IX-V ou como é mais conhecida, glicoproteína Ib (GPIb), e GPVI, por exemplo, são receptores envolvidos na ligação das plaquetas ao fator de von Willebrand (fvW) e ao colágeno, respectivamente. As GPs do complexo IIb/IIIa (CD41 e CD61), integrinas dependentes de cálcio, são as mais abundantes da superfície plaquetária; sua função está relacionada com a agregação plaquetária através da ligação da plaqueta ao fibrinogênio (Jurk e Kehrel, 2008; Boudreaux, 2010b). O termo integrina refere-se a proteínas integrais de membrana que servem de ponte entre o citoesqueleto celular e a matriz extracelular (Kickler, 2006). A ligação acontece, pois apesar de estarem presentes na superfície das plaquetas em repouso, após a ativação plaquetária mudanças conformacionais ocorrem e este complexo atua como sítio de ligação ao fibrinogênio ligando-se à sequência de aminoácidos arginina – glicina – aspartato - serina (presente na molécula de fibrinogênio, fvW e fibronectina), e à sequência lisina – glutamina – alanina – glicina – aspartato – valina, também do fibrinogênio (Kickler, 2006; Boudreaux e Catalfamo, 2010).

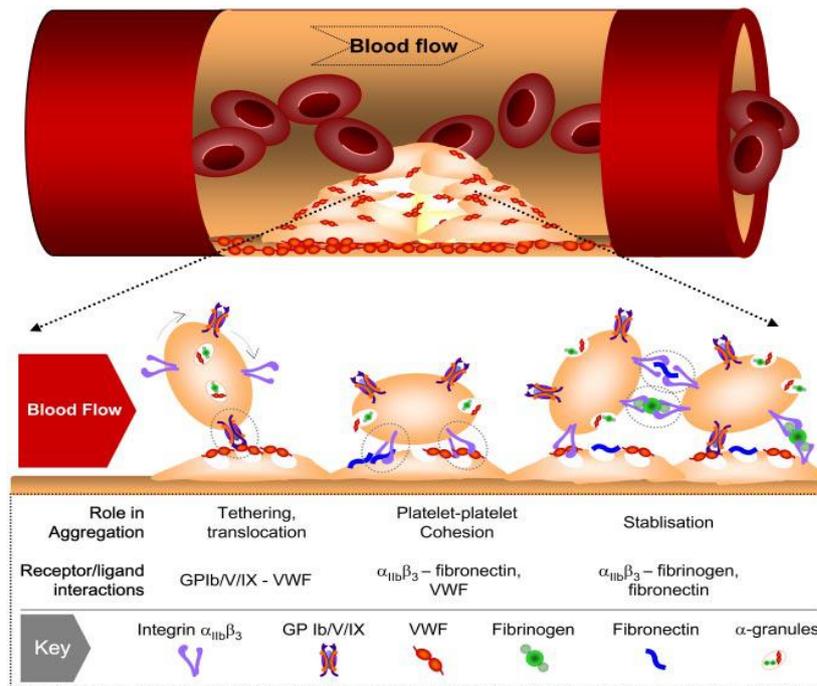


Figura 2. Receptores envolvidos na adesão e agregação plaquetária no sítio de injúria (Jackson, 2007).

Na membrana existem numerosas invaginações que formam as paredes do sistema canicular aberto (SCA) (Figura 3), um sistema tubular conectado à superfície a partir da zona periférica e ao longo do citoplasma que se comunica com o ambiente extracelular. O SCA é uma via de secreção do conteúdo granular durante a exposição e ativação de receptores de superfície na agregação (Jurk e Kehrel, 2008; Russell, 2010). As plaquetas possuem três tipos de grânulos – densos, alfa e lisossomais – heterogêneos tanto em seu conteúdo e quanto morfologia. Os grânulos densos estocam principalmente serotonina, ATP, ADP e cerca de 70% do cálcio da plaqueta. A liberação de cálcio pelos grânulos densos desencadeia uma série de eventos que convergem para a agregação plaquetária. Grânulos alfa contêm proteínas e peptídeos e liberam seus componentes em resposta ao estímulo de receptores (Kickler, 2006; Boudreaux e Catalfamo, 2010; Panzer e Jilma, 2011). P-selectina (CD62P) é uma proteína estocada em grânulos alfa, relacionada com as interações adesivas das plaquetas com neutrófilos, monócitos e células endoteliais durante o processo de hemostasia e também no processo inflamatório. É classicamente utilizada como marcador de ativação plaquetária, pois é rapidamente transportada à membrana após ativação (Yeo *et al.*, 1993; Gutensohn *et al.*, 2002; Leytin *et al.*, 2008; Tynngård *et al.*, 2008; Tynngård, 2009) e tem sido amplamente

estudada em CPs humanos, pois a ativação plaquetária é uma manifestação bem documentada nas PSL (Vetlesen *et al.*, 2007; Leytin *et al.*, 2008; Gyulkhandanyan *et al.*, 2013; Mutlu *et al.*, 2013). Com base em análises por eletroforese, a P-selectina humana e a canina são indistinguíveis, mas apesar da similaridade (Yeo *et al.*, 1993), a relação entre o processo de agregação, a expressão de CD62P e a modificação de sua expressão durante a ativação plaquetária em cães necessita ser aprofundada a fim de avaliar o papel funcional da P-selectina nesta espécie (Pelagalli *et al.*, 2011). Estudo que buscou a compreensão do papel da hemostasia nos casos em endotoxemia em cães sugeriu que a expressão de CD62P em plaquetas e a agregação de plaquetas e leucócitos, podem ser biomarcadores de septicemia seguida por coagulação intravascular disseminada (CID) nesta espécie (Yu, Noh e Park, 2015).

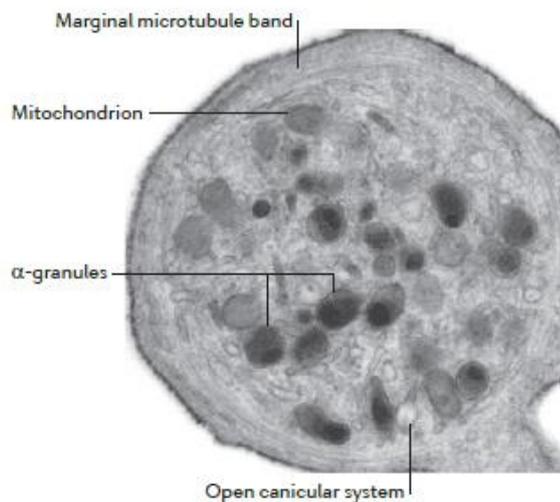


Figura 3. Microscopia eletrônica de plaqueta em repouso (Semple, Italiano e Freedman, 2011).

Embora alguns estudos tenham apontado uma correlação negativa entre P-selectina e viabilidade plaquetária *in vivo* (Rinder *et al.*, 1991; Holme *et al.*, 1997; Leytin *et al.*, 2004), a informação não foi confirmada em pesquisas posteriores (Goodrich *et al.*, 2006; Slichter *et al.*, 2006). Os grânulos alfa ainda contêm fibrinogênio, fibronectina, fator V e fvW e fator plaquetário 4 (Boudreaux, 2010b). Por fim, os grânulos lisossomais contêm hidrolases, enquanto a membrana lisossomal contém proteínas - LIMP ou CD63, por exemplo - que se

exteriorizam durante a reação de secreção granular e desempenham papel importante na manutenção do pH, pois medeiam o transporte de íons e aminoácidos através da membrana (Boudreaux e Catalfamo, 2010).

As plaquetas possuem mitocôndrias (Figura 4), organelas de grande importância tanto no provimento de energia celular (produção de ATP) quanto no processo de apoptose. As mitocôndrias são consideradas uma espécie de usina da célula, tamanha sua importância na produção de energia. Possuem uma composição lipoprotéica característica, localizam-se no citoplasma e geralmente são estruturas cilíndricas que possuem grande número de enzimas e coenzimas, envolvidas no processo de fosforilação oxidativa. As mitocôndrias possuem duas membranas distintas tanto no aspecto relacionado à estrutura quanto à função. A membrana interna possui diversas invaginações para o interior da organela, formando as chamadas ‘cristas mitocondriais’, onde se localizam os componentes da cadeia respiratória (Mohamad *et al.*, 2005; Hattori, Saiki e Imai, 2014).

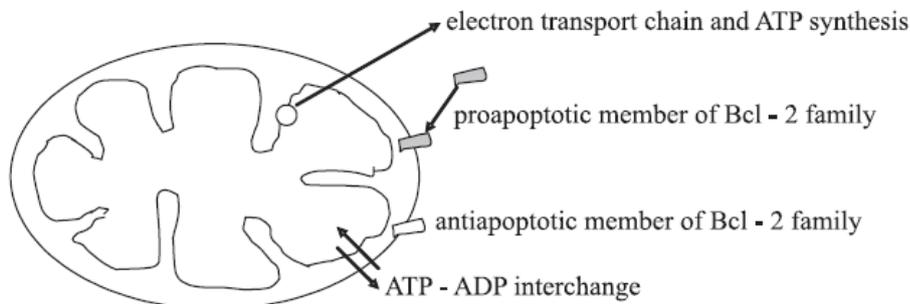


Figura 4. Estrutura da mitocôndria (Mohamad et al., 2005).

As plaquetas circulantes encontram-se em uma interação dinâmica com o endotélio vascular e com os outros elementos sanguíneos. Possuem papel fundamental no processo de coagulação, manutenção da integridade vascular e controle da hemostasia (Russell, 2010). Após o dano tecidual ligam-se ao fvW (fator de von Willebrand) e iniciam o processo de adesão, que culmina na formação do *plug* plaquetário - através da interação do fibrinogênio com o complexo glicoproteico GPIIb/IIIa - que é estabilizado pela trombina, gerada com a ativação

sucessiva dos fatores de coagulação. A falta ou disfunção de qualquer componente envolvido nesta delicada e complexa reação resulta em risco de sangramentos (Boudreaux, 2010a; Boudreaux e Catalfamo, 2010).

O papel fisiológico principal das plaquetas é participar do processo hemostático (Figura 5). Didaticamente, o processo será descrito como temporal e sequencial, entretanto, sabe-se que a hemostasia primária e secundária ocorrem de forma muito rápida e sinérgica, sendo a hemostasia primária um evento muito mais complexo e dinâmico do que previamente relatado. Atualmente sabe-se, por exemplo, que um dos principais elementos que influencia a agregação plaquetária é o fluxo sanguíneo local, pois o mecanismo de agregação se comporta de forma diferente frente a diferentes condições de fluxo (Jackson, 2007). Após uma lesão vascular, constituintes da matriz extracelular - como colágeno, fibronectina e outras GPs - são expostos, desencadeando as reações de adesão e alteração de forma, reações de secreção e finalmente de agregação plaquetária (Long *et al.*, 2015; Smith, Travers e Morrissey, 2015; Travers, Smith e Morrissey, 2015). Com a agregação ocorre a produção de trombina, que participa da cascata de coagulação, com a geração da rede de fibrina (Semple, Italiano e Freedman, 2011).

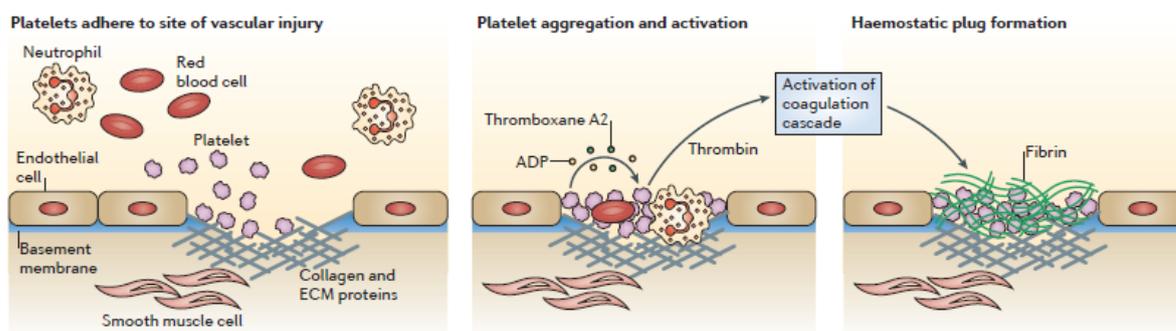


Figura 5. Recrutamento de plaquetas ao sítio de injúria (Semple, Italiano e Freedman, 2011).

A adesão das plaquetas à matriz extracelular exposta se dá através de um receptor plaquetário para o colágeno e por interações entre as GP de superfície GP Ib e o fvW, que atua como uma

ponte entre os receptores de superfície das plaquetas. Com a ligação ao fvW e ao colágeno as plaquetas são ativadas e sofrem uma reorganização estrutural que promove uma mudança de forma (Jurk e Kehrel, 2008; Boudreaux e Catalfamo, 2010) (Figura 6). A seguir - desencadeada pela ligação de agonistas aos receptores de superfície e por uma cascata de fosforilação de proteínas intracelulares - ocorre a degranulação plaquetária, quando o conteúdo dos grânulos é despejado no sistema canalicular aberto, que é contínuo com a superfície plaquetária. O mecanismo contrátil das plaquetas facilita a dispersão do conteúdo dos grânulos (ADP, serotonina e Ca, por exemplo) no plasma, onde irão auxiliar na agregação plaquetária. Além dos produtos secretados pelos grânulos, tromboxano A₂, trombina e fator ativador de plaquetas presentes no plasma são importantes agonistas que promovem a agregação, aumentando a exposição e ativação da GPIIb/IIIa, receptor de superfície que se liga ao fibrinogênio, de maneira que moléculas de fibrinogênio são ligadas simetricamente entre si e aos receptores de superfície formando um agregado plaquetário (tampão primário) crescente - mas ainda reversível - que é suficiente para cessar o sangramento de pequenos vasos. Com a continuidade do processo, este *plug* de plaquetas é estabilizado pela fibrina (Nachman e Leung, 1982; Jurk e Kehrel, 2008; Boudreaux e Catalfamo, 2010; Semple, Italiano e Freedman, 2011).

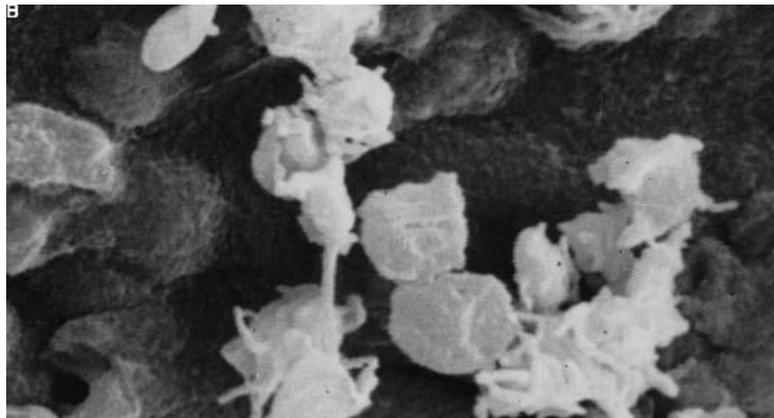


Figura 6. Microscopia eletrônica evidenciando mudança de forma e formação de pseudópodes em plaquetas ativadas (Wagner et al., 2002).

Plaquetas e resposta inflamatória

As plaquetas são classicamente conhecidas por sua importância no processo de coagulação e reparo vascular, entretanto, cada vez mais estudos têm como alvo identificar o papel das plaquetas no processo inflamatório (Andonegui *et al.*, 2005; Semple e Freedman, 2010; Semple, Italiano e Freedman, 2011; Rondina e Garraud, 2014; Bergmann *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Já está estabelecida, mas não completamente elucidada, a participação das plaquetas de forma ativa tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, atuando na primeira linha de defesa, junto aos neutrófilos, como sentinelas circulantes que rapidamente se ligam a patógenos ativando o sistema retículo endotelial e induzindo hiperativação de neutrófilos para produção de moléculas pró-inflamatórias (Semple e Freedman, 2010; Semple, Italiano e Freedman, 2011).

A superfície plaquetária possui não apenas receptores que medeiam o processo hemostático, mas também receptores (têm sido chamados imunoreceptores) que servem de gatilho para as cascatas imunológica e pró-inflamatória (Rondina e Garraud, 2014). Ao expressar moléculas imunomodulatórias como CD154, as plaquetas servem de ponte entre os sistemas inato e adaptativo (Semple e Freedman, 2010; Semple, Italiano e Freedman, 2011). A GP-VI, exclusiva de plaquetas, por exemplo, está relacionada com a liberação de sinais inflamatórios através da interleucina -1 e é um receptor para o vírus da hepatite C.

A interação adesiva das plaquetas com leucócitos e células endoteliais via P-selectina é um dos mecanismos envolvidos na ativação de eventos pró-inflamatórios como a rolagem e ativação de neutrófilos, produção de citocinas e recrutamento de leucócitos ao sítio de injúria. Ratos sem os genes de P e E-selectina apresentam maior risco de infecção, pois a rolagem de leucócitos e o recrutamento de monócitos ao sítio da inflamação estão prejudicados (Bullard *et al.*, 1996).

Receptores TLR (do inglês *toll-like receptors*) são capazes de reconhecer estruturas bem conservadas (RNA bacteriano, lipopolissacarídeos, peptídeoglicanos, por exemplo) presentes em diversos micro-organismos. TLR são comumente expressados em células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. A descoberta de que plaquetas humanas e murinas expressam TLR abriu um promissor campo de pesquisa que afirma que os TLR

plaquetários são funcionais e estão envolvidos na produção de TFNa *in vivo* (Andonegui *et al.*, 2005; Jenne, 2014; Rondina e Garraud, 2014). Patógenos virais como influenza e o vírus da imunodeficiência humana são reconhecidos por receptores TLR 7 e estão associados com a presença de trombocitopenia, o que sugere que receptores TLR 7 plaquetários servem de mediadores no mecanismo de defesa contra estes vírus. Ainda, doenças de grande importância na área de saúde pública, como dengue e malária, podem ter sua patofisiologia fortemente influenciada pelos mecanismos de defesa plaquetários; o que tem recebido atenção por parte dos pesquisadores, com o alvo no desenvolvimento de novas terapias (Rondina e Garraud, 2014). Em medicina veterinária, esta é uma área que merece atenção e ainda não foi devidamente explorada.

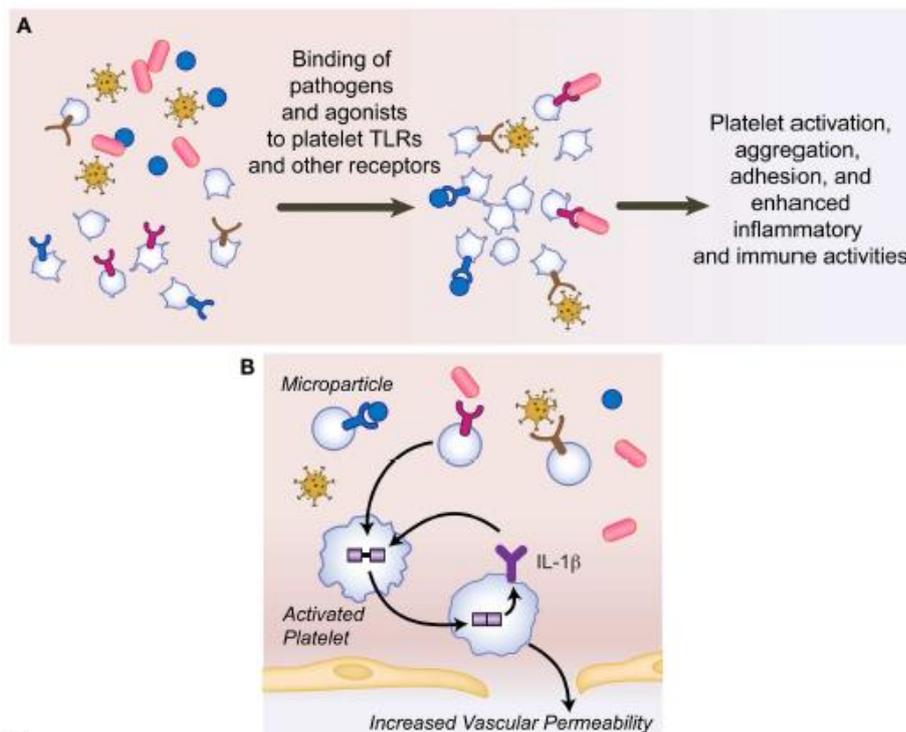


Figura 7. (A) A ligação de agentes patogênicos e agonistas presentes no meio infeccioso acarreta ativação plaquetária e reforça a resposta inflamatória e o sistema imune; (B) Micropartículas plaquetárias carregam IL-1B, aumentando a permeabilidade vascular (Rondina e Garraud, 2014).

3.3. USO DE PLAQUETAS NA CLÍNICA MÉDICA

Histórico e perspectivas da hemoterapia em medicina veterinária

Data de 1665 o primeiro relato de transfusão sanguínea em animais, quando Richard Lower retirou sangue de um cão e repôs com sangue de outro. Este é referido como o período ‘pré-científico’, quando ocorreram diversas experiências de “transfusão”; entre seres humanos e animais, inclusive. Não existem registros oficiais ou exatos sobre a história da hemoterapia veterinária. Sabe-se que foi com o advento das tecnologias utilizadas em bancos de sangue humanos que o interesse pela medicina transfusional despertou no meio veterinário, e este foi oficialmente registrado em 1950, na 87ª Reunião Anual da AVMA (*American Veterinary Medical Association*). Na década de 1960 foram comercializadas as bolsas plásticas para coleta por sistema fechado, e na década de 1970, foi definido o princípio básico da medicina transfusional atual, ou seja, transfundir apenas o componente que o paciente necessita. Desde então, a medicina veterinária segue os avanços no campo da medicina transfusional humana, embora a passos mais lentos. Atualmente existem bancos de sangue veterinários em diversos países e em algumas capitais brasileiras, entretanto, assim como em medicina humana, nem sempre é possível atender à demanda constante (Junqueira, Rosenblit e Hamerschalk, 2005; Lacerda, 2005; Davidow, 2013).

O processamento e fracionamento do sangue, a tipagem sanguínea e o controle das doenças infecciosas transmitidas pela transfusão - apesar de algumas limitações - são hoje uma realidade também na medicina veterinária (Callan, Appleman e Sachais, 2009); no entanto, ainda há um longo caminho a ser percorrido na busca pela excelência. Os hemocomponentes caninos são produtos escassos e de grande demanda, e por este motivo infelizmente ainda é comum em medicina veterinária o uso de doadores sem triagem e a administração de sangue total quando o paciente necessitaria de apenas um hemocomponente. No caso da transfusão de plaquetas, soma-se ainda a escassa disponibilidade especialmente deste hemocomponente, devido à logística de processamento e também ao curto período viável das bolsas após a coleta. Por outro lado, os estudos sobre o tema cresceram nos últimos anos e podemos dizer que, apesar do longo caminho a ser percorrido, o Brasil tem acompanhado esta evolução, com pesquisas a respeito de tipagem sanguínea, processamento de hemocomponentes e reações

transfusionais (Lacerda, 2005; Gonçalves, 2006; Lacerda *et al.*, 2009; Costa, 2011; Esteves *et al.*, 2011; Casari, 2012; Lacerda *et al.*, 2014).

O conhecimento sobre triagem de doadores, doenças infecciosas e dos métodos de coleta, fracionamento e estoque dos hemocomponentes evoluiu muito nas últimas décadas. Entretanto, estes avanços trazem consigo a necessidade de se estabelecer normas específicas e de controle para a hemoterapia veterinária. Apenas assim poderemos garantir a qualidade do serviço e dos produtos oferecidos pelos bancos de sangue veterinários, pois esta é a única forma de respeitarmos nossos pacientes, nossos doadores e seus tutores.

Transfusão de CP em cães

A transfusão de CP é utilizada principalmente na prevenção e tratamento de hemorragias espontâneas em pacientes com trombocitopenia severa (condições que cursem com CID, aplasia de medula óssea induzida por drogas e distúrbios na medula óssea). Transfusão de CP também é indicada em casos de intervenção cirúrgica em pacientes com risco de sangramentos devido ao baixo número de plaquetas (Abrams-Ogg, 2003; Callan, Appleman e Sachais, 2009; Davidow, 2013). Dentre as vantagens da administração de CP está principalmente o menor volume (cerca de 60 mL) em relação ao sangue total fresco ou ao PRP. Destaca-se ainda que, atualmente preconiza-se o uso apenas do hemocomponente necessário a cada paciente, de forma que um paciente com trombocitopenia beneficia-se com a administração exclusiva de plaquetas, sem o risco de sobrecarga de volume ou da infusão de componentes sanguíneos desnecessários (Davidow *et al.*, 2012; Davidow, 2013; Kaufman *et al.*, 2015).

Trombocitopenia é a condição em que o paciente apresenta contagem plaquetária abaixo do valor de referência para a espécie, sendo a desordem hemostática adquirida mais comum tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária; e ocorre devido a um ou vários dos seguintes mecanismos: produção ausente ou diminuída, aumento do consumo ou da perda, ou distribuição anormal (Abrams-Ogg, 2010; Boudreaux, 2010a; Russell, 2010; Stokol, 2010). Existem ainda os casos de trombocitopatias hereditárias, como a trombopatia do Basset Hound, trombostenia de Glanzman e doença do estoque plaquetário do Cocker Spaniel Americano, que podem cursar com sinais clínicos de déficit hemostático primário (Abrams-

Ogg, 2010; Boudreaux, 2010a; Jandrey, 2012; Jandrey *et al.*, 2012). Sinais clínicos de trombocitopenia incluem petéquias, equimoses e sangramento de superfícies mucosas, tais como a cavidade oral, cavidade nasal, trato gastrointestinal e urinário. A intensidade do sangramento varia e pode colocar o paciente em risco de morte (Davidow *et al.*, 2012).

Recomenda-se transfusão de plaquetas em pacientes com contagens em torno de $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ devido ao risco de sangramento espontâneo, especialmente naqueles sob tratamento quimioterápico ou com disfunções na medula óssea; ou pacientes com trombocitopenia discreta, mas que sofrerão intervenção cirúrgica, principalmente se for bastante invasiva, como na retirada de tumores, por exemplo (Abrams-Ogg, 2003; Callan, Appleman e Sachais, 2009; Abrams-Ogg, 2010; Jandrey, 2012; Davidow, 2013).

Como qualquer hemoterapia existem riscos inerentes à transfusão de plaquetas, como transmissão de doenças infecciosas (apesar do risco ser baixo), sepse devido contaminação bacteriana do hemocomponente (o fato das plaquetas serem estocada à temperatura ambiente cria um meio eficiente para o crescimento bacteriano) e reações transfusionais febris não hemolíticas ou alérgicas, que em seres humanos são mais comuns em transfusão de plaquetas do que em transfusões de qualquer outro hemocomponente (Kaufman (Kaufman, 2006; Callan, Appleman e Sachais, 2009; Abrams-Ogg, 2010; Davidow, 2013). Davidow *et al.* (2012) compararam o uso de plaquetas frescas e liofilizadas em cães e observaram que apesar da ocorrência de cerca de 10% de reações transfusionais, não houve diferença significativa entre os grupos. Gonçalves (2006), observou maiores índices de reações transfusionais em cães após administração de CP, cerca de 36%, sendo as manifestações gastrointestinais, seguidas por aquelas alérgicas e inflamatórias as mais comumente vistas. Interessantemente, a hipertermia, tida como a principal manifestação clínica em humanos após a administração de CP, foi observada em apenas um cão; comprovando que são necessários mais estudos sobre o tema em medicina veterinária, e que, apesar das inúmeras similaridades, existem diferenças no metabolismo e particularidades referentes a cada espécie.

3.4. O CONCENTRADO DE PLAQUETAS

De acordo com a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (Anvisa, 2014a) - que regulamenta os bancos de sangue humanos no Brasil - o CP produzido por PRP deve ter

volume entre 50 e 70 mL, contagem de plaquetas superior a $5,5 \times 10^{10}$ por unidade de CP, hematócrito inferior a 1%, contagem de leucócitos residuais inferior a 2×10^8 por unidade, análise microbiológica negativa, ausência de lipemia, grumos ou alteração de cor, $\text{pH} \geq 6,2$ e presença do efeito *swirling* até o final do período de estoque. Quando expostas à luz, as plaquetas que possuem forma discoide a refletem, e assim produzem o fenômeno chamado *swirling* (turbilhão, em tradução livre). A manutenção do *swirling* indica que as plaquetas não perderam sua forma discoide original, ou seja, não sofreram alterações morfológicas. Apesar de ser um teste subjetivo, de baixa sensibilidade e reprodutibilidade (Goodrich *et al.*, 2006), a avaliação do *swirling* ainda é um teste amplamente utilizado em bancos de sangue. Existem evidências de que a ausência de *swirling* é preditiva de incrementos plaquetário insatisfatório e maior risco de reação transfusional (Bertolini *et al.*, 2000). De acordo com os padrões utilizados em bancos de sangue humanos, um CP de qualidade considerada ótima apresenta *swirling* adequado, indicando que as plaquetas não perderam sua forma, não sofreram alterações morfológicas (Figura 8); e apresentam manutenção do pH durante o estoque e poucos sinais de ativação plaquetária (Anvisa, 2004; Johnson *et al.*, 2013). No Brasil, exige-se que o controle de qualidade seja realizado em 1% das bolsas de CP produzidas pelo banco de sangue ou em 10 unidades por mês, o que for maior (Anvisa, 2004; 2014a; b).

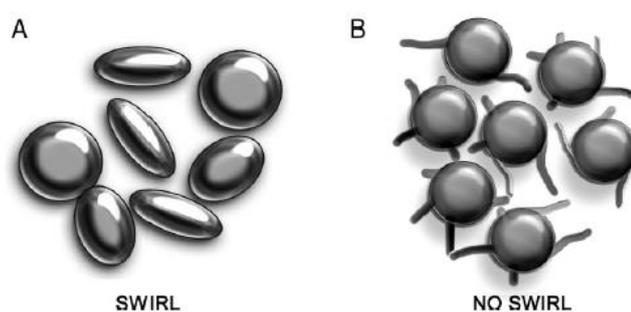


Figura 8. Mudança de forma associada à diminuição do *swirling* (Maurer-Spurej e Chipperfield, 2007).

Bolsas para armazenamento de plaquetas

A separação das plaquetas dos demais componentes tornou-se uma realidade a partir da década de 1950, quando foram descritas técnicas que permitiram a separação de plaquetas dos outros componentes sanguíneos e conseqüentemente a transfusão de CP. O objetivo era (a ainda é) aumentar o número de plaquetas do receptor sem, no entanto, aumentar a carga de fluido (Minor e Burnett, 1952). Mais tarde, na década de 1970, com o desenvolvimento das bolsas plásticas permeáveis a utilização de CP em humanos tornou-se rotineira (Van Der Meer e De Korte, 2011).

Inicialmente as plaquetas eram armazenadas em bolsas de policloreto de vinila (PVC) e di (2-etilhexil) ftalato (DEHP-PVC), material amplamente utilizado na fabricação de bolsas de sangue. Estas bolsas, chamadas ‘bolsas de primeira geração’, não permitiam a troca gasosa do CP com o meio externo, sendo o tempo de armazenamento dos CPs de no máximo 3 dias devido o acúmulo de lactato e conseqüente queda do pH. Passou-se então a utilizar bolsas produzidas com polietileno, cerca de duas vezes mais permeável comparado àquelas de primeira geração e assim foi possível manter melhores níveis de pH e a qualidade dos CPs. Entretanto, as bolsas de polietileno são extremamente frágeis e por isso foram desenvolvidas as bolsas chamadas de ‘segunda geração’, feitas com di-n-deciltalato (DnDP- PVC) e tri(2-etilhexil) trimelitato (TOTM-PVC) (Snyder *et al.*, 1983; Simon, Nelson e Murphy, 1987; Van Der Meer e Korte, 2011). A qualidade das bolsas de segunda geração foi comprovada não apenas através de parâmetros de qualidade – como manutenção do pH – mas também clinicamente, quando transfusões de CPs de 5 dias foram capazes de aumentar o número de plaquetas de seis pacientes e cessar o sangramento de dois pacientes trombocitopênicos (Taylor, Tandy e Fraser, 1983). As bolsas DEHP-PVC e TOTM-PVC são as atualmente liberadas para uso nos bancos de sangue brasileiros (Anvisa, 2014b).

Mais recentemente, Nair *et al.* (2011), desenvolveram uma bolsa de ácido 1,2-ciclohexanedicarboxílico, diisononil ester (Hexamoll DINCH) e mantiveram CPs por mais de 5 dias. Bolsas de butiril tri-n-hexil citrato (BTHC) e poliolefina - ‘terceira geração’ - foram avaliadas e permitiram o estoque de CPs por até 7 dias. Além do material utilizado, é importante atentar que a espessura e o tamanho da bolsa também podem influenciar a troca

gasosa e conseqüentemente o pH do concentrado (Yuasa *et al.*, 2004; Nair, Vidya e Ashalatha, 2011).

Agitação

Durante todo o período de armazenamento o CP deve ser mantido sob agitação constante, sob pena de sofrer rápida queda do pH (pois o consumo de glicose e o metabolismo do lactato estão elevados), menor resposta a agregantes e maior ativação plaquetária (Van Der Meer, Liefiting e Pietersz, 2007; Van Der Meer e De Korte, 2011). Holme *et al.* (1978) foram os primeiros cientistas a observar a importância da agitação na qualidade do CP. Posteriormente, outros estudos avaliaram períodos sem agitação e concluíram que os CPs podem ser colocados em condições estáticas por até 24 horas em qualquer momento do armazenamento sem acarretar prejuízos consideráveis em testes *in vitro* (Hunter, Nixon e Murphy, 2001; Van Der Meer, Liefiting e Pietersz, 2007; Hossien, Farhad e Gharib, 2014). Desta forma, torna mais simples o envio de unidades de plaquetas para locais com menor infraestrutura, fato comum na medicina veterinária, onde muitas vezes os pacientes não recebem a transfusão em ambiente hospitalar, mas sim em consultórios ou clínicas mais simples. Infelizmente não há estudo similar com plaquetas caninas, e como em outros aspectos, os dados obtidos em trabalhos com plaquetas humanas são extrapolados para a medicina veterinária. Dumont *et al.* (2007) afirmam que a interrupção da agitação por períodos maiores que 24 horas leva a um impacto superior sobre o pH. CPs armazenados em soluções aditivas apresentam resultados contraditórios. Estudo de 2007 recomenda períodos inferiores há 16 horas para garantir a qualidade do hemocomponente (Van Der Meer, Liefiting e Pietersz, 2007), entretanto, estudo mais recente afirma que as plaquetas resistem por até 30 horas sem agitação quando armazenadas com soluções aditivas (Wagner *et al.*, 2008). A discrepância pode ter ocorrido de acordo com o tipo de solução empregada. O modo de agitação também parece ter influência sobre a viabilidade plaquetária, sendo os agitadores horizontais superiores em relação aos rotatórios na manutenção das características desejáveis de um CP (Holme, Vaidja e Murphy, 1978).

Temperatura

De acordo com orientação dos órgãos competentes (Anvisa, AABB), o CP deve ser armazenado a 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), o que infelizmente aumenta o risco de crescimento bacteriano (Palavecino, Yomtovian e Jacobs, 2010). De acordo com Kuehnert *et al.* (2001), a contaminação bacteriana em CPs é cerca de 50 vezes maior em relação ao observado em concentrado de eritrócitos, sendo exatamente a temperatura de armazenamento maior fator de risco. No entanto, diferentemente do que ocorre com os eritrócitos, o armazenamento de plaquetas sob 4°C causa uma supressão no metabolismo das plaquetas, mudanças conformacionais (perda rápida da forma discoide), liberação de grânulos alfa e, ao menos teoricamente, perda de viabilidade pós-transfusional (Babic *et al.*, 2007; Rumjantseva e Hoffmeister, 2010). Por outro lado, a refrigeração está associada a menor taxa de glicólise e consequentemente um pH mais estável, e melhores respostas após estímulo com agonistas quando comparadas a plaquetas armazenadas a temperatura ambiente. Teoricamente, *in vivo*, plaquetas mantidas sob 4°C apresentariam menor sobrevivência na circulação, mas melhor função em relação às mantidas sob temperatura ambiente (Kattlove, Alexander e White, 1972; Becker *et al.*, 1973; Hoffmeister *et al.*, 2003; Rumjantseva e Hoffmeister, 2010).

Com base em alguns estudos, foi sugerido o uso de plaquetas armazenadas a 4°C para tratar pacientes trombocitopênicos com sangramento ativo e plaquetas armazenadas a 22°C seriam melhores em casos profiláticos (Kattlove, Alexander e White, 1972; Valeri, 1976). Segundo Rumjantseva e Hoffmeister (2010), atualmente os CPs são mantidos sob temperatura ambiente exclusivamente porque as plaquetas refrigeradas não circulam por um período de tempo aceitável no receptor, e não por falta de funcionalidade. Os autores afirmam que os mecanismos que determinam a remoção das plaquetas da circulação - incluindo as plaquetas refrigeradas - são independentes da função plaquetária e permanecem pouco compreendidos.

O curto tempo de circulação das plaquetas resfriadas deve-se a um agrupamento quase irreversível das subunidades alfa da GPIb na superfície da plaquetária. Este agrupamento é reconhecido por macrófagos principalmente no fígado, levando a uma rápida depuração das plaquetas circulantes (Hoffmeister *et al.*, 2003; Babic *et al.*, 2007). No entanto, seria possível prolongar o tempo de circulação das plaquetas resfriadas inibindo este processo de fagocitose através de processos enzimáticos de galactosilação dos resíduos terminais de beta-GlcNAc em

GPIb alfa. Este processo permitiria diminuir os casos de contaminação bacteriana e mortes por sepse, sem afetar a qualidade do produto, entretanto, a galactosilação não é efetiva em casos de armazenamento refrigerado prolongado (Rumjantseva *et al.*, 2009). Babic *et al.* (2007) compararam CPs refrigerados e CPs mantidos a temperatura ambiente e concluíram que as primeiras apresentaram melhores resultados e a galactosilação impede o reconhecimento das plaquetas refrigeradas por macrófagos *in vitro*. No entanto, pesquisas *in vivo* não refletiram o que foi observado em ensaios *in vitro* (Wandall *et al.*, 2008).

Por outro lado, armazenar plaquetas sob temperatura fisiológica (37°C) não é uma opção, pois a atividade metabólica das plaquetas dobra para cada °C aumentado em relação à temperatura ambiente, fazendo com que aumente a exigência de oxigênio para manter a glicólise aeróbica de maneira eficiente. Experimentos *in vitro* atestam o envelhecimento precoce das células, que – comparadas às aquelas armazenadas sob 22°C – apresentam aumento da taxa de utilização de ATP e consumo de oxigênio, redução acelerada no pH, aumentos nos níveis de lactato desidrogenase, sugerindo que a morte celular pode ser promovida pelo armazenamento a 37°C (Bertino *et al.*, 2003; Yuasa *et al.*, 2004). De acordo com Bertino *et al.* (2003), a 37°C ocorre ativação precoce do processo de apoptose plaquetária, entretanto, os autores não comprovaram que este é o responsável pela queda da viabilidade plaquetária pois a inibição da apoptose não teve reflexos positivos sobre a viabilidade plaquetária.

Ausência de contaminação bacteriana

Um dos fatores críticos durante o armazenamento de CPs é a contaminação bacteriana e sua consequência potencialmente fatal. A maioria dos casos de contaminação está relacionada com microrganismos gram-positivos, especialmente aqueles do gênero *Staphylococcus* (Burns e Werch, 2004). Em bancos de sangue humanos, estima-se que a prevalência de contaminação bacteriana varie de 1 em 2000 a 1 em 3000 unidades (Blajchman, Goldman e Baeza, 2004). Registros brasileiros apontam índices de 0,4 a 1,7% (Cunha *et al.*, 2008; Martini *et al.*, 2010). Não há um registro oficial do índice de bolsas de CP contaminadas em bancos de sangue veterinários, mas podemos supor que estes índices são maiores em CPs caninos comparados a CPs humanos. A contaminação das bolsas de CP pode ter consequências fatais e pode ser mais facilmente evitada se entendermos as fontes de contaminação. A primeira é a pele do doador no local da coleta, pois bactérias que residem na

pele podem entrar na bolsa; ou ainda o sangue do doador pode conter níveis baixos de bactérias que não são necessariamente patogênicas, mas ao se multiplicarem e posteriormente terem acesso à circulação do receptor podem ser fatais; e, por fim, a contaminação pode ocorrer durante o processamento das bolsas se não forem observadas regras de higiene em relação à pessoa encarregada, às bancadas e à sala onde ocorre o processamento. É importante salientar que o sangue obtido através de coletas por sistemas abertos não deve ser utilizado para processamento de plaquetas exatamente pelo fato de que o risco de contaminação é demasiado maior (Abrams-Ogg e Schneider, 2010).

A fim de diminuir o risco de contaminação das unidades plaquetárias alguns procedimentos devem ser adotados, como a limpeza rigorosa da área a ser puncionada, especialmente no caso de cães, que devem ter os pelos retirados antes do procedimento de limpeza; desvio dos primeiros 20 a 30 mL de sangue no início da coleta; bem como cultura de algumas unidades armazenadas ao final do período e/ou antes da transfusão do componente (Abrams-Ogg e Schneider, 2010). Ainda, é importante o fornecimento de bolsas estéreis por parte dos fabricantes. Existem três métodos esterilização: esterilização a vapor, γ -irradiação e utilização de óxido de etileno. Importante observar que o método de esterilização das bolsas durante a fabricação pode, mais tarde, afetar as características das plaquetas durante o estoque. A esterilização com vapor, por exemplo, pode ser responsável por níveis mais altos de ativação plaquetária e produção de lactato comparada com método do óxido de etileno (Van Der Meer e Pietersz, 2007).

3.5. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS

Unidades de CP podem ser obtidas através de aférese – método automático que permite a retirada apenas de plaquetas, de forma que o restante dos componentes sanguíneos retorna ao doador – como unidades randômicas pelo método do *buff-coat* ou através do método do plasma rico em plaquetas (PRP) (Callan, 2009; Abrams-Ogg e Scheneider, 2010; Devine & Serrano, 2010). Em medicina veterinária, o método mais utilizado para o processamento de CP é o PRP (Figura 9), onde uma unidade de sangue total é submetida a centrifugação leve e o sobrenadante (plasma rico em plaquetas) é transferido para uma bolsa satélite que em

seguida sofre outra centrifugação, desta vez mais pesada. Após a segunda centrifugação obtêm-se um *pellet* de plaquetas no fundo da bolsa satélite (Figura 10) e a maior parte do sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) é retirado, obtendo-se assim o concentrado de plaquetas. Este apresenta volume reduzido de plasma e a retirada do sobrenadante permite o armazenamento de mais um hemocomponente, o plasma fresco, que pode ser útil para pacientes que necessitam de determinados fatores de coagulação, por exemplo. Desta forma é possível maximizar a oferta de produtos sanguíneos para as diferentes indicações (Abrams-Ogg e Scheneider, 2010; Davidow, 2013). Alternativamente, maior quantidade de plasma pode ser retirada e as plaquetas podem ser suspensas em meios sintéticos, as chamadas soluções aditivas (PAS, do inglês *platelet additive solution*) (Leitner *et al.*, 2015).

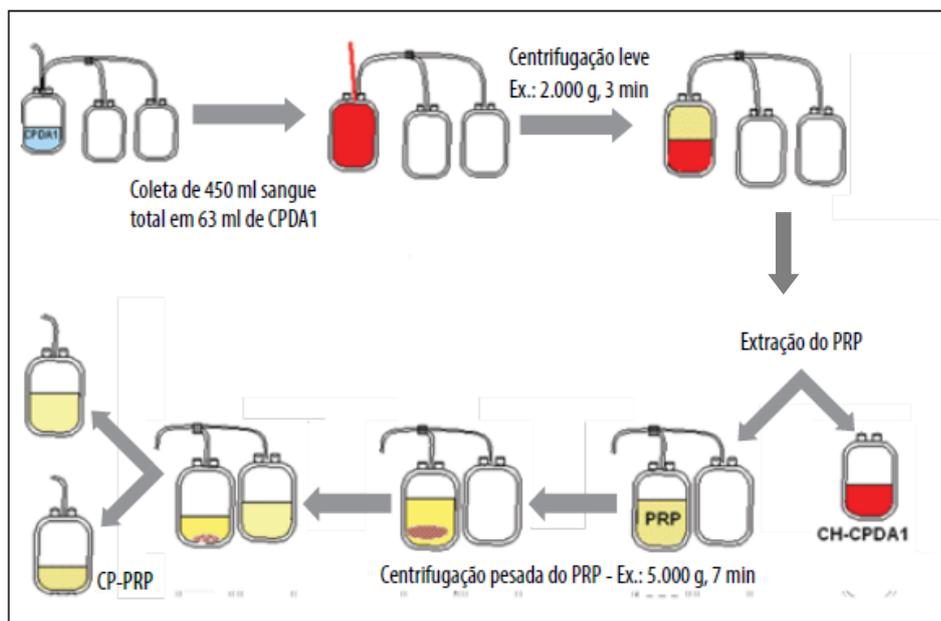


Figura 9. Obtenção de CP através do método do PRP (Anvisa, 2014).



Figura 10. Pellet de plaquetas no fundo da bolsa após segunda centrifugação.

A segunda etapa de centrifugação está associada à ativação e agregação reversível das plaquetas (Gulliksson, 2003), e por isso o CP é deixado a temperatura ambiente por cerca de uma hora antes de ser armazenado em temperatura controlada sob agitação constante por cerca de cinco dias (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Tynngård, 2009; Abrams-Ogg e Schneider, 2010). O tempo de prateleira de uma bolsa de CP é limitado devido às PSL, associadas a mudanças bioquímicas e morfológicas que comprometem a funcionalidade das plaquetas e também devido ao grande risco de contaminação bacteriana (Devine e Serrano, 2010; Skripchenko *et al.*, 2010).

3.6. METABOLISMO PLAQUETÁRIO DURANTE O ARMAZENAMENTO

Metabolismo e lesões plaquetárias de armazenamento

Embora as plaquetas não sejam verdadeiras células, são fragmentos celulares bastante complexos que apresentam um metabolismo ativo, nos quais glicólise anaeróbica ocorre no citosol e a oxidação do piruvato (β -oxidação) na mitocôndria, sendo esta última mais eficiente na geração de ATP. Enquanto a glicólise é responsável por cerca de 15% do ATP produzido, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) é responsável por cerca de 85%. Sendo assim, a quantidade de ATP produzida é proporcional ao número de mitocôndrias funcionais

presentes. Durante a glicólise a glicose é convertida a lactato e H^+ , que é tamponado pelo bicarbonato e convertido a CO_2 . Quando a capacidade tamponante do bicarbonato é excedida observa-se rápida queda do pH devido não apenas o acúmulo de lactato, mas também de CO_2 (Gulliksson, 2003; Tynngård, 2009; Gyongyossy-Issa, 2011; Gulliksson *et al.*, 2012). O efeito do CO_2 como acidificante foi minimizado com o uso de bolsas permeáveis para o armazenamento de CP, conforme discutido acima. Esta situação, em que a plaqueta realiza glicólise anaeróbica (resultando na produção de lactato) em paralelo com o TCA é o chamado ‘Efeito Warburg’, também utilizado para diagnosticar e monitorar células cancerígenas (Figura 11). As plaquetas também apresentam ‘Efeito Pasteur’, que se refere à capacidade de aumentar a velocidade da glicólise na ausência de oxigênio, a fim de compensar a menor produção de energia por esta via. Por outro lado, a produção de lactato pode ser suprimida de acordo com a disponibilidade de outros combustíveis para geração de energia, pois a plaqueta é capaz de metabolizar uma variedade de substratos, como propionato, corpos cetônicos, citrato e acetato, sendo este último provavelmente a fonte de energia preferida pelas plaquetas, e por isso bastante utilizado nas soluções aditivas (Gulliksson, 2003; Karnicki *et al.*, 2003; Tynngård, 2009; Gyongyossy-Issa, 2011). O efeito mais importante da utilização do acetato provavelmente seja a remoção de íons hidrogênio durante sua oxidação, o que ajudaria na manutenção de um pH mais equilibrado e adequado ao meio (Gulliksson, 2003; Saunders *et al.*, 2013). Este fato foi confirmado por Saunders e colaboradores (2013), que observaram que, apesar da adição de acetato em CPs humanos ter sido associada com aumento da ativação plaquetária e menores níveis de ATP, o consumo da glicose (e suas consequências) foi menor. Segundo os autores, a redução aparentemente paradoxal do ATP pode estar relacionada com o metabolismo do acetato em acetyl-CoA em uma reação que requer o consumo de uma molécula de ATP (Saunders *et al.*, 2013).

Durante o armazenamento, o CP deve ser mantido sob agitação constante e temperatura ambiente (20 a 24°C), o que permite que as plaquetas mantenham o metabolismo mais ativo que os eritrócitos, armazenados sob refrigeração (Kaufman, 2005; 2006; Ohto, H. e Nollet, K. E., 2011). A sobrevivência da plaqueta depende da manutenção de um delicado balanço bioquímico de diferentes substâncias, como glicose, íons hidrogênio e ATP (Amorini *et al.*, 2007). A ativação plaquetária demanda muita energia das células, representando um desafio metabólico, pois está associado ao aumento da taxa metabólica e consequentemente a maior

consumo de glicose, produção de lactato e por fim, diminuição do pH, eventos relacionados à diminuição da viabilidade plaquetária. Desta forma, para que se possa otimizar o estoque de plaquetas deve-se buscar a redução da ativação durante a coleta e processamento das bolsas, a redução da taxa metabólica e do consumo de glicose e, por fim, assegurar-se de que há glicose disponível no meio durante todo o período de estoque, pois a depleção da glicose no meio está claramente associada com mudanças no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), diminuição crítica dos níveis de ATP e redução do número de plaquetas no CP (Saunders *et al.*, 2013).

Para manutenção do balanço energético as plaquetas possuem mitocôndria, organela envolvida na produção de ATP e também na regulação de funções celulares como apoptose. Durante o estoque, as plaquetas humanas perdem $\Delta\Psi_m$, e com a diminuição da função da mitocôndria conseqüentemente ocorre diminuição da função e viabilidade plaquetárias (Hayashi *et al.*, 2011). Ainda de acordo com Hayashi *et al.* (2011), a preservação da função mitocondrial da plaqueta está diretamente relacionada com a qualidade do CP. A despolarização mitocondrial é provavelmente um sinal precoce de apoptose plaquetária, sendo assim um marcador bastante sensível no controle de qualidade de um banco de sangue (Hayashi *et al.*, 2011; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012).

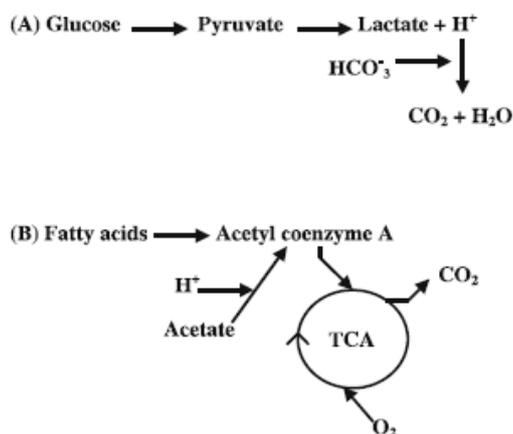


Figura 11. Metabolismo plaquetário. (A) glicólise; (B) ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Tynngård, 2009).

Durante o armazenamento, as plaquetas sofrem mudanças morfológicas, pois perdem sua capacidade de manter o equilíbrio osmótico e desta forma “incham” (Brown *et al.*, 2000). Este processo pode ser verificado através da variação do volume médio plaquetário (MPV, do inglês *mean platelet volume*), índice calculado por contadores automáticos calibrados para a espécie em questão. Em concentrados de plaquetas humanas, um aumento no MPV indica um aumento do volume das plaquetas e mudança de sua forma originalmente discoide para esférica. Zhang *et al.* (2008) observaram aumentos do MPV em CP padrão entre os dias 1 e 2 de armazenamento, porém este aumento não persistiu; pelo contrário, o MPV retornou ao nível inicial. Existem controvérsias, pois outros autores (Solheim *et al.*, 2004) afirmam que o MPV na verdade diminui devido à fragmentação plaquetária que ocorre com o armazenamento, enquanto Wang *et al.* (1999) observaram que apesar de diminuir, o MPV não apresentou mudanças significativas durante cinco dias de avaliação.

Outro índice morfoestrutural atualmente disponível em contadores hematológicos veterinários é o PDW (do inglês *platelet distribution width*), que indica a amplitude de variação do tamanho das plaquetas, ou seja, anisocitose plaquetária (Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Elevados valores de PDW e MPV estão associados com maior risco de eventos adversos cardiovasculares em pacientes com infarto do miocárdio (Rehcinski *et al.*, 2013), e com maior risco de morte em pacientes críticos comparados com pacientes com índices normais (Zhang *et al.*, 2014). Valores elevados de PDW em plaquetas estocadas podem significar que houve morte e fragmentação plaquetária durante o estoque. Analisados em conjunto, MPV e PDW podem proporcionar uma descrição mais completa da morfologia plaquetária (Singh, Chaudhary e Ray, 2003).

Plaquetas estocadas em plasma têm neste o suprimento de glicose como fonte energética, e bicarbonato e fosfato como tampão, no entanto, com o passar do tempo o acúmulo de lactato excede a capacidade tampão da solução com conseqüente queda do pH (Gulliksson, 2003; Goodrich *et al.*, 2006; Dekkers *et al.*, 2007). Ainda, o plasma contém fatores capazes de retardar a morte programada das plaquetas, pois plaquetas privadas de plasma apresentam não apenas acelerada perda de estrutura e função, mas também condensação citoplasmática, exposição de fosfatidilserina (PS) e P-selectina e reconhecimento por receptores de células fagocitárias precocemente (Brown *et al.*, 2000; Perrotta, Perrotta e Snyder, 2003).

De acordo com Dekkers *et al.* (2007), que analisaram o efeito do pH sobre plaquetas humanas estocadas, a expressão de CD62P (ou seja, a ativação plaquetária) foi mínima quando os CPs apresentaram pH entre 6,4 e 7,2, mesmo após 6 dias de armazenamento. A exposição de fosfatidilserina não sofreu influência significativa de acordo com o pH, exceto após 6 dias de armazenamento e na presença de pH muito ácido. Os autores ainda concluíram que alterações no pH não exercem efeitos imediatos na qualidade das plaquetas, sendo que a acidez do meio é mais um resultado das lesões de armazenamento do que propriamente uma causa. Entretanto, segundo Goodrich *et al.* (2006), o pH e os níveis de lactato foram identificados como principais responsáveis pela viabilidade plaquetária pós-transfusão em pacientes saudáveis, ficando claro que ainda existem muitas dúvidas e mesmo equívocos em relação ao tema. Dumont *et al.* (2006), afirmam que, apesar de o pH ser um importante indicador de qualidade do CP, este não tem correlação com a viabilidade plaquetária *in vivo* quando é igual ou maior que 6,32, mesmo em CPs armazenados por 5 a 9 dias.

O nível de O₂ também interfere na qualidade do CP, pois a hipóxia leva a um aumento na taxa de glicólise e produção de lactato, com conseqüente queda no pH. É uma relação direta, onde a disponibilidade de glicose é acompanhada pela diminuição do consumo de oxigênio pelas vias aeróbicas (Goodrich *et al.*, 2006; Dekkers *et al.*, 2007). Assim, evidências de consumo de O₂ indicam preservação do metabolismo aeróbico e sugerem boa viabilidade das plaquetas. Sendo a fosforilação oxidativa dependente de oxigênio, bolsas de armazenamento que permitam uma boa permeabilidade são importantes para uma difusão eficiente de oxigênio e gás carbônico e conseqüentemente melhor qualidade do CP, pois também vão diminuir a produção de lactato pela glicólise (Zhang, Carter, Culibrk, *et al.*, 2008).

Tostes *et al.* (2008) avaliaram CPs humanos armazenados em condições padrão (ou seja, plasma) e observaram queda gradativa na concentração das plaquetas, aumento da pO₂ e queda da pCO₂, diminuição do pH e da concentração de sódio e potássio, e diminuição da agregação plaquetária durante o estoque das bolsas. Apesar da diminuição gradativa do pH a partir de 98 horas de armazenamento, esta não acompanhou a queda dos valores da agregação, de modo que os autores concluíram que alterações do pH não foram responsáveis pela queda da função plaquetária *in vitro*. Os autores sugerem que o controle de qualidade de CPs deve incluir o período desde a coleta até o final da estocagem. Em outro estudo, houve diferença

significativamente maior nas concentrações de glicose, lactato e pH aos sete dias de armazenamento comparado ao quinto, apesar de ainda assim as concentração de glicose, lactato e pH encontrarem-se em níveis aceitáveis aos sete dias (Tynngard *et al.*, 2008). De acordo com Amorini *et al.* (2007), quando glicose é adicionada ao CP no dia zero, ocorrem mudanças significativas no perfil metabólico das plaquetas, indicando que esta pode ser uma boa solução aditiva a ser utilizada em concentrados de plaquetas, melhorando sua qualidade.

Apoptose e morte plaquetária

Os mecanismos de morte celular são classificados de acordo com características morfológicas e bioquímicas em apoptose, autofagia, necrose e senescência. A necrose cursa com aumento de volume e ruptura celular com liberação do conteúdo citoplasmático causando reação inflamatória local; enquanto a apoptose é um evento coordenado, dependente de energia, e que possui um controle genético (Mohamad *et al.*, 2005; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012). O controle genético da apoptose se dá através de genes supressores e ativadores da apoptose. Em seres humanos, de maneira geral, o gene supressor da apoptose Bcl-2 está associado a Apaf-1, impedindo sua ativação. Quando a apoptose começa, o gene que expressa a proteína Bax é ativado. Bax se associa com Bcl-2 liberando Apaf-1 para a formação do apoptossomo (Li *et al.*, 2000; Li e Kuter, 2001; Gulbins, Dreschers e Bock, 2003; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012).

O mecanismo de apoptose celular, ou morte programada das células foi por muito tempo um processo atribuído somente às células nucleadas, o que, sabe-se hoje não ser verdadeiro. A apoptose celular é o principal mecanismo envolvido na regulação da meia-vida das células e serve para a eliminação controlada de células não funcionais, defeituosas ou indesejadas e, apesar de não estar completamente elucidada (o estudo da apoptose plaquetária tem menos de duas décadas) está bem descrita em plaquetas humanas (Li *et al.*, 2000; Gulbins, Dreschers e Bock, 2003; Perrotta, Perrotta e Snyder, 2003; Leytin *et al.*, 2008; Gyulkhandanyan *et al.*, 2013). A própria produção de plaquetas é dependente deste processo, pois o megacariócito possui via intrínseca funcional e através da ação de Bcl-xL libera plaquetas para a circulação (Li e Kuter, 2001; Hoffmeister, 2012). Embora a trombopoietina seja responsável pela maturação e proliferação dos megacariócitos, esta é responsável por promover a liberação das plaquetas para a circulação, sendo este último evento relacionado com o processo de (Li e Kuter, 2001). Ratos que não expressam Bcl-xL apresentam plaquetas com meia-vida de

apenas 24 horas, quando o normal para a espécie é de 5 dias, enquanto aqueles deficientes de Bak apresentam plaquetas com o dobro da meia-vida normal (Hoffmeister, 2012). As proteínas da família Bcl-2 regulam a apoptose, promovendo ou inibindo a permeabilização e a ruptura da membrana mitocondrial externa. A família Bcl-2 é dividida em três grupos de acordo com seus domínios de homologia, sua fixação mitocondrial e ação anti ou pró-apoptótica (Mohamad *et al.*, 2005; Hoffmeister, 2012); sendo que o balanço entre estes dois sistemas – anti e pró-apoptose – regula o processo de morte programada (Hoffmeister, 2012).

Com a morte e lise das plaquetas *in vitro* ocorre uma descarga de compostos citosólicos no plasma que inclui a enzima LDH; utilizada como um marcador de morte e fragmentação celular, que em concentrados de plaquetas humanas apresenta correlação significativa entre o aumento da liberação de LDH e diminuição da viabilidade plaquetária (Amorini *et al.*, 2007; Tynngård, 2009). A liberação de LDH é leve durante a apoptose e acentuada mais tarde, quando ocorre necrose (Amorini *et al.*, 2007). Devido à dificuldade de avaliar necrose em plaquetas, a liberação da enzima LDH é considerada um dos poucos marcadores para este fim. O pequeno tamanho das plaquetas dificulta a avaliação microscópica após uso de corantes como Trypan Blue, e a falta de núcleo impede o uso de marcadores como o iodeto de propídio, comumente utilizado para tal fim em células nucleadas (Brown *et al.*, 2000).

A exposição de fosfatidilserina (PS) é outro marcador comumente utilizado como marcador de apoptose, inclusive em células nucleadas, mas no caso das plaquetas, este é também um importante mecanismo hemostático, de forma que a exposição de fosfatidilserina pode ser resultado de atividade pró-coagulante (Leytin *et al.*, 2008; Cookson *et al.*, 2010). Existem duas vias distintas que regulam a exposição da PS e a atividade pró-coagulante das plaquetas *in vitro*, sendo uma delas independente da ativação da via das caspases, mas dependente de cálcio e agonistas e cursa com a ativação; e outra mediada por Bak/Bax e caspases independentemente da ativação plaquetária. Ou seja, embora plaquetas em atividade pró-coagulante exibam características de células apoptóticas, são diferentes processo (Schoenwaelder *et al.*, 2009). Ativação e a apoptose plaquetárias não apenas são fenômenos diferentes, mas também são induzidos por diferentes mecanismos. As lesões de armazenamento ocorrem primariamente pelo processo de ativação plaquetária, entretanto, em

casos de armazenamento prolongado os dois eventos (ativação e apoptose) atuam juntos na deterioração das plaquetas (Leytin *et al.*, 2008).

Em resposta a aumentos de Ca^{2+} intracelular, lesão celular ou agentes indutores de apoptose a fosfatidilserina é rapidamente exteriorizada na membrana plasmática. Este processo de externalização da fosfatidilserina é um acontecimento relativamente precoce na apoptose e ocorre antes que a integridade da membrana plasmática seja comprometida. A fosfatidilserina serve como um gatilho para o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos, sendo então utilizada com o propósito de monitorar este fenômeno durante o armazenamento de plaquetas (Martin *et al.*, 1995; Gerke e Moss, 2002; Albanyan *et al.*, 2009).

Os mecanismos que desencadeiam o envelhecimento das plaquetas e o reconhecimento deste processo não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que a exposição de fosfatidilserina, a ação das mitocôndrias e a formação de microvesículas estão envolvidas como marcadores de morte celular (Leytin *et al.*, 2008; Skripchenko *et al.*, 2010; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012). Receptores de fosfatidilserina são encontrados em macrófagos e células teciduais pulmonares, hepáticas, renais e esplênicas. O deslocamento da fosfatidilserina para a superfície plaquetária é reconhecido por macrófagos que captam este sinal e removem a célula que sinalizou sua apoptose ao ambiente (Solheim *et al.*, 2004; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012).

A função mitocondrial é demasiado importante na manutenção da qualidade das plaquetas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Mitocôndrias plaquetárias também participam da geração de sinais pré-apoptose, como liberação de moléculas que atuam como cofatores ativadores da caspase e a diminuição do $\Delta\Psi_m$, que leva ao aumento da permeabilidade mitocondrial e consequente redução da síntese de ATP e também converge na ativação das caspases (Gulbins, Dreschers e Bock, 2003; Cookson *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011).

Skripchenko *et al.* (2010) comprovaram que a interrupção da agitação do CP está relacionada com redução do $\Delta\Psi_m$ e com a exposição de marcadores de apoptose; enquanto Perrotta *et al.* (2003), observaram que plaquetas humanas armazenadas sob condição padrão de banco de sangue mantiveram o $\Delta\Psi_m$ a despeito dos efeitos adversos ocorridos durante o armazenamento, como diminuição do pH, aumento da exposição da fosfatidilserina e da P-selectina. Segundo os autores, o $\Delta\Psi_m$ não tem um papel crítico nas lesões de armazenamento

e a permeabilização da membrana mitocondrial é apenas um dos diversos mecanismos de ativação da caspase. Hayashi *et al.* (2011) observaram que a adição de L-acetilcarnitina (que promove a oxidação de ácidos graxos e reduz a formação de radicais livres) reduziu as mudanças de pH - pois diminuiu o consumo de glicose e a produção de lactato - e também a despolarização mitocondrial durante o armazenamento, o que estaria relacionado com um produto de qualidade superior.

As caspases são uma família de 14 proteínas enzimáticas envolvidas no processo de apoptose celular e que, de acordo com o seu papel na cascata de ativação, são classificadas como iniciadoras ou executoras. A caspase 8, por exemplo, classificada como iniciadora, quando ativada é liberada para o citoplasma, onde cliva e ativa caspases executoras; como por exemplo, a caspase-3. A ativação sequencial da caspase-3 desempenha um papel central no processo de apoptose. São produzidas como pró-enzimas inativas (zimogênios pró-caspase), que após proteólise em resíduo aspártico produzem duas subunidades, que dimerizam formando a enzima em sua forma ativa. Como um zimogênio, a caspase inativa não apresenta qualquer atividade, sendo necessária uma sinalização apoptótica para que a ativação ocorra. Esta característica é extremamente importante e bem conservada, pois ao contrário, a atividade da caspase iria causar apoptose celular indiscriminadamente (Li *et al.*, 2000; Li e Kuter, 2001; Boatright e Salvesen, 2003; Gyulkhanyan *et al.*, 2012; 2013).

São reconhecidas duas vias de ativação de apoptose: via extrínseca e via intrínseca. A primeira ocorre no citoplasma (Figura 12), está mais relacionada com o sistema imune, e é ativada após a ligação de receptores de morte da superfamília dos receptores fator de necrose tumoral (TNF α) e APO-1. Após a ligação, há a formação de micro-agregados na superfície da célula que permitem o recrutamento da molécula adaptadora FADD, que recruta a caspase 8 ou 10 através de interações homofílicas com domínios efetores de morte (DEDs) e esta, por sua vez ativa a caspase 3 ou 7 (Boatright e Salvesen, 2003; Kinnally e Antonsson, 2007). Esta via ainda precisa ser elucidada em plaquetas, visto que receptores de morte (DR, do inglês *death receptors*) classicamente envolvidos nesta via, como Fas, DR4 e DR5 não foram detectados em plaquetas (Plenchette *et al.*, 2001).

A via intrínseca - mediada pela mitocôndria - envolve principalmente a caspase 9 e começa com a permeabilização da membrana mitocondrial, que acarreta em: 1) entrada de água na

matriz mitocondrial levando a sua ruptura e liberação de proteínas pró-apoptóticas; 2) diminuição da síntese de ATP e liberação de EROS, que além de contribuir na ativação das caspases 9 e conseqüentemente caspase 3, leva a oxidação de lipídeos e proteínas, aumentando a agressão à membrana mitocondrial; 3) estímulos indutores de apoptose (Bax, Bak) induzem formação de canais, por onde há liberação de citocromo c para o citosol, onde formará um complexo com a Apaf- 1 e pró-caspase 9 - o apoptossomo - responsável pela ativação da caspase-9, que ativa a caspase-3 (Figura 13), responsável direta pela indução do processo de apoptose (Plenchette *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2001). Além da liberação de citocromo c, o megaporo permite a saída de Smac/DIABLO, que remove as proteínas inibidoras de apoptose (IAP). O processo culmina na formação de corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos, sem causar resposta inflamatória (Kinnally e Antonsson, 2007). A expressão de Bak, Bax e Smac/DIABLO já foi descrita em plaquetas humanas armazenadas por 11 dias (Brown *et al.*, 2000; Plenchette *et al.*, 2001).

A liberação de citocromo c é central na via intrínseca, e ocorre através de duas vias: MAC (do inglês *mitochondrial apoptosis-induced channel*) na membrana externa e/ou PTP (do inglês *permeability transition pore*) na membrana interna. Evidências indicam que o MAC, regulado por proteínas da família Bcl-2 é o principal mediador; e a ativação do PTP pode ser apenas uma consequência do processo de apoptose. Entretanto, é esta ativação que garante a execução completa do processo (Kinnally e Antonsson, 2007).

Existem diversas maneiras de avaliar apoptose *in vitro*, como testes de avaliação de $\Delta\Psi_m$, liberação de citocromo c, expressão das proteínas da família Bcl-2, além da determinação de caspases ativas, exposição de PS, avaliação morfológica por microscopia eletrônica (Gyulkhandanyan *et al.*, 2012). Existem controvérsias quanto à determinação da caspase como indicador de apoptose em plaquetas armazenadas (pois seria um evento tardio) e inclusive evidências de que inibidores de caspase não são úteis para evitar as PSL (Seghatchian e Krailadsiri, 1997; Brown *et al.*, 2000; Plenchette *et al.*, 2001). Um programa de morte programada independente de caspase em plaquetas privadas de plasma foi proposto por Brown *et al.* (2000), onde a morte foi resultado do reconhecimento por fagócitos específicos através de receptores de membrana.

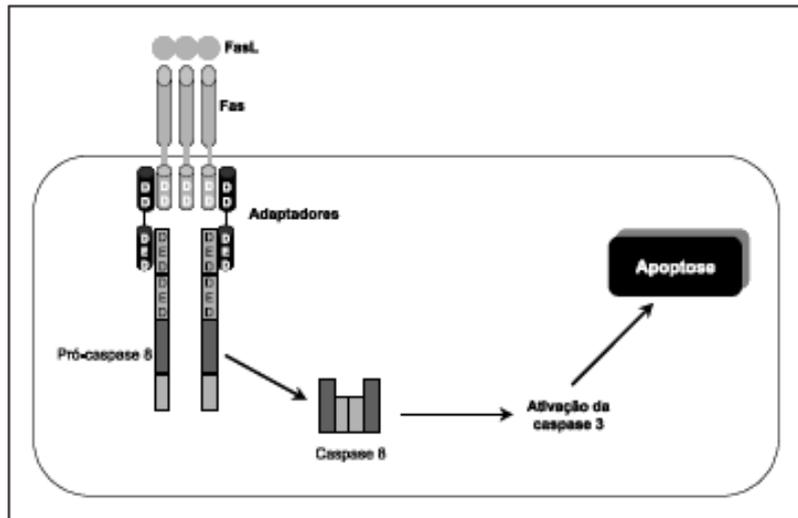


Figura 12. Via extrínseca de ativação da apoptose. DD, domínio de morte; DED, efetor do domínio de morte. (reproduzido de Grivicich, Regner, Rocha, 2007).

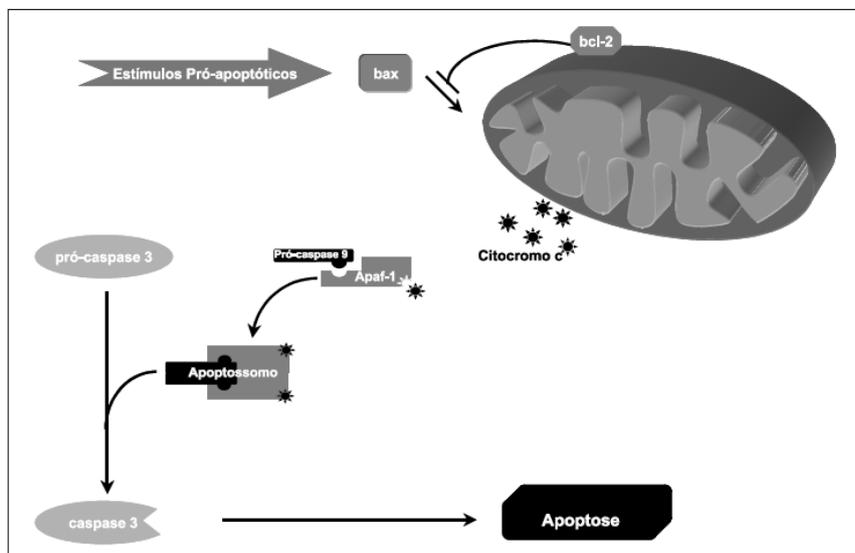


Figura 13. Via intrínseca da apoptose (reproduzido de Grivicich, Regner, Rocha, 2007).

3.7. CITOMETRIA DE FLUXO NA ANÁLISE DE PLAQUETAS

A citometria de fluxo (CF) vem sendo utilizada na avaliação de plaquetas humanas há vários anos e tornou-se um método amplamente aceito e utilizado, pois minimiza a ativação plaquetária *in vitro* e normalmente não necessita de centrifugação ou lavagem das amostras, podendo ser utilizada rapidamente (Brown e Wittwer, 2000; Saboor, Moinuddin e Ilyas, 2013). Através da CF é possível quantificar a expressão de receptores de superfície plaquetária, identificar ativação plaquetária e apoptose *in vivo* e *in vitro*. Também é possível determinar eventos apoptóticos em diferentes compartimentos celulares, como mitocôndria, citosol e/ou membrana plasmática (Panzer e Gilma, 2011; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012).

Segundo Saboor *et al.* (2013), a CF pode ser utilizada na identificação de trombocitopatias, no monitoramento de terapias antiplaquetárias e no controle de qualidade em bancos de sangue, ou seja, dentre as inúmeras utilidades, é possível acessar a qualidade de um CP com técnicas de CF. Para a avaliação plaquetária por CF foram desenvolvidos diversos anticorpos monoclonais contra marcadores específicos, sendo possível a detecção de quantidades ínfimas de plaquetas, ou de plaquetas ativadas, ou de determinada GP em uma pequena amostra (Shattil, Cunningham e Hoxie, 1987; Picker, 2011; Wilkerson, 2012).

O citômetro de fluxo reúne tecnologias de vanguarda com tecnologias avançadas, como mecânica dos fluidos, lasers, óptica, eletrônica e informática, que o tornam um equipamento único, tanto técnica como funcionalmente (Figura 14). Basicamente, o funcionamento do citômetro de fluxo mede a propriedade de absorção de dispersão da luz em cada célula. Para isso, geralmente se faz necessária adição de um fluoróforo através de um anticorpo monoclonal que reconhece a estrutura de interesse na célula em questão. A seguir, as células são suspensas em fluido isotônico, e passam sequencialmente através de uma câmara de fluxo equipada com um feixe de laser focalizado que ativa o fluoróforo. Este reage emitindo luz a um comprimento de onda específico, que é registrado pelos sensores dispostos perpendicularmente ao feixe do laser. As células interceptam e causam uma dispersão da luz, identificada sob diferentes ângulos, o que permite qualificar a célula em relação ao seu tamanho e complexidade. Ainda, a intensidade da luz emitida é diretamente proporcional ao número de anticorpos ligados aos receptores de plaquetas, quando estes são usados. Geralmente dois parâmetros de dispersão de luz são medidos, a dispersão de luz frontal

(*Forward Scatter*, FS) e lateral (*Side Scatter*, SS). Cada um dos detectores fornece uma informação, convertida em sinais elétricos e em códigos digitais que são decifrados por programas específicos para tal. Sabendo das informações fornecidas por cada um dos detectores de sinais de luz e tendo em conta o objetivo da análise, são produzidos histogramas com dados de um ou vários parâmetros (Brown e Wittwer, 2000; Panzer e Jilma, 2011; Picker, 2011; Wilkerson, 2012; Pati e Jain, 2013).

A utilização da técnica - bem descrita e utilizada em amostras humanas - para a medicina veterinária enfrenta desafios como pouca reação cruzada de alguns marcadores (Kingston et al., 2002a; 2002b). Wilkerson & Shuman (2001), avaliaram as alterações ocorridas em amostras de plaquetas caninas estocadas em EDTA (sangue total) e concluíram que as plaquetas sofrem alterações similares àquelas observadas em plaquetas humanas sob as mesmas condições. Apesar da formação de micropartículas e diminuição da expressão de CD61, as plaquetas conservaram a capacidade de ativação após estímulo. Após o estoque das amostras caninas por até 72 horas sob 4°C os autores não observaram mudanças em relação à expressão de P-selectina ou exposição de PS. Kingston et al. (2002a) utilizaram anticorpos anti-fibrinogênio humanos e anexina V na detecção de plaquetas ativadas e secreção plaquetária em PRP equino com bons resultados, enquanto que, com o uso de anti-trombospondina humana não houve ligação às plaquetas.

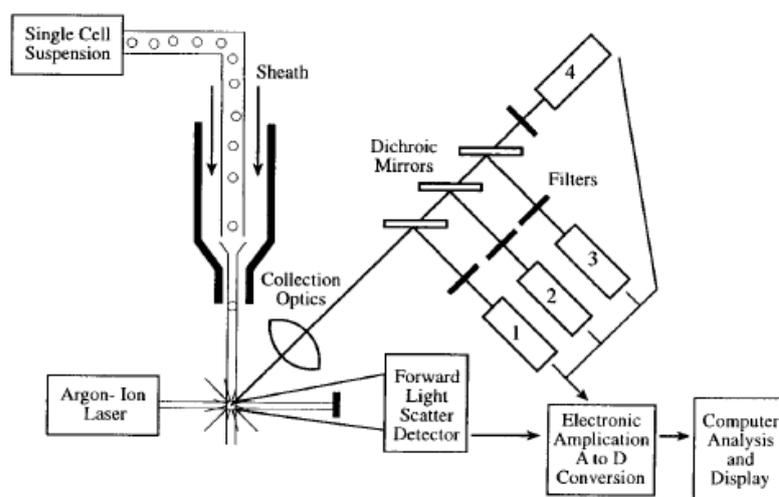


Figura 14. Citômetro de fluxo (Brown e Wittwer, 2000).

Dentre as glicoproteínas de membrana comumente utilizadas na avaliação de CP por citometria de fluxo estão a CD61(GPIIIa) e CD62P. CD61 é um marcador seletivo de plaquetas e precursores de plaquetas. Trata-se de uma proteína de cadeia simples de 110 kDa, da subunidade β dos complexos CD41/CD61 e CD51/CD61. O complexo CD41/CD61 aparece no início da maturação megacariocítica, o que o torna um bom marcador de plaquetas (Nachman e Leung, 1982; Boudreaux e Catalfamo, 2010; Russell, 2010; Saboor *et al.*, 2013; Saboor, Moinuddin e Ilyas, 2013). A redução das glicoproteínas durante o armazenamento, especialmente GPIb – subunidade do complexo GPIb-IX-V – responsável pela interação da plaqueta com o fvW, ocorre principalmente devido a proteólise (Schubert e Devine, 2010).

P-selectina (CD62P) é uma GP presente nos grânulos alfa de plaquetas em repouso e pode ser detectada na superfície de plaquetas ativadas após liberação dos grânulos, e desta forma é usada frequentemente como um marcador de ativação plaquetária em humanos (Falati *et al.*, 2003; Leytin *et al.*, 2008; Tynngård, 2009; Zhuang *et al.*, 2014; Ghezelbash *et al.*, 2015). Van der Meer *et al.* (2010), por exemplo, avaliaram a ativação plaquetária através da expressão de CD62P em CPs mantidos em plasma e em soluções aditivas, observando que a ativação foi menor nas plaquetas armazenadas em plasma comparada àquelas em soluções aditivas como InterSol, T-Sol e SSP+; enquanto a exposição de fosfatidilserina (mensurada pela ligação à anexina V) foi similar em todos os CPs. *In vivo*, a P-selectina une neutrófilos e monócitos às plaquetas e células endoteliais, além de recrutar micropartículas pró-coagulantes que auxiliam na formação do coágulo (Gutensohn *et al.*, 2002; Falati *et al.*, 2003; Yu, Noh e Park, 2015).

Outras maneiras de avaliar ativação plaquetária por CF incluem a mensuração de grânulos densos, micropartículas derivadas de plaquetas e quantificação de plaquetas ligadas ao fibrinogênio (Wang *et al.*, 1999; Falati *et al.*, 2003). Ainda, é possível a quantificação da liberação de lisossomos pela marcação de CD63, uma proteína lisossomal liberada após a ativação plaquetária (Saboor *et al.*, 2013). PAC-1 é um anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao complexo GPIIb/IIIa após a mudança conformacional que sofre com a ativação (Shattil *et al.*, 1985; Shattil, Cunningham e Hoxie, 1987; Sandgren e Saeed, 2011). Este anticorpo monoclonal reconhece epítomos do receptor GPIIb/IIIa apenas quando o receptor muda sua conformação após a ativação plaquetária para ligação ao fibrinogênio,

sendo atualmente utilizado para avaliar ativação em diferentes condições patológicas como leucemia linfoblástica aguda (Huang *et al.*, 2015), hipertensão arterial pulmonar (Maeda *et al.*, 2010) e em PSL (Sandgren e Saeed, 2011), mas devido à inconsistência dos resultados neste último aspecto, muitos autores ainda utilizam expressão de CD62P como método padrão na avaliação de CPs (Ahmed, Leheta e Younes, 2010; Zhuang *et al.*, 2014; Ghezelbash *et al.*, 2015; Tynngard *et al.*, 2015).

Fosfatidilserina (PS) é um fosfolípídeo de carga negativa que sofre deslocamento para a superfície da membrana da plaqueta em estágios iniciais de apoptose. Sendo assim, sua detecção na superfície plaquetária por citometria de fluxo, através da mensuração de Anexina V – proteína com alta afinidade e especificidade por amino-fosfolípídeos – é utilizada como indicador de células apoptóticas (Li *et al.*, 2000; Gerke e Moss, 2002; Gyulkhanyan *et al.*, 2013; Mutlu *et al.*, 2013; Saboor *et al.*, 2013). Os membros da família das anexinas caracterizam-se pela capacidade de ligação a fosfolípídeos de membrana carregados negativamente como a fosfatidilserina, de forma reversível e dependente de cálcio (Ca^{2+}) (Figura 15). As anexinas estão envolvidas em vários processos fisiológicos, como exocitose regulada por Ca^{2+} , endocitose, transdução do sinal mitogênico e também na coagulação (Gerke e Moss, 2002; Brumatti, Sheridan e Martin, 2008). A ligação com a Anexina V, através de citometria de fluxo, ainda é considerada padrão-ouro no monitoramento da exposição de fosfatidilserina, mas já foram descritos outros métodos de avaliação (Albanyan *et al.*, 2009).

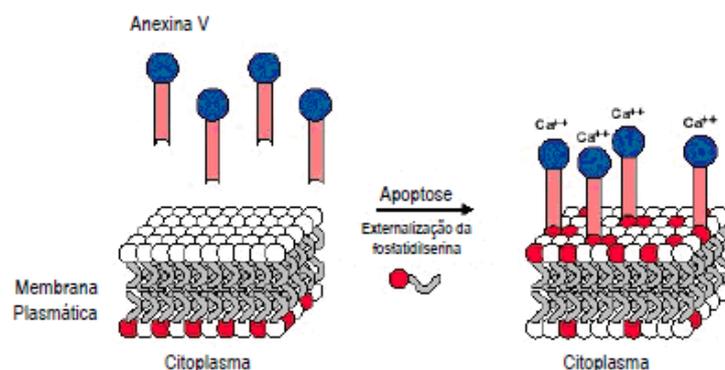


Figura 15. Representação esquemática da ligação da Anexina V à fosfatidilserina em células apoptóticas (BD, 2007). Disponível em: http://www.bdbiosciences.com/features/products/display_product.php?keyID=48.

Pesquisas com concentrado de plaquetas humanas tradicionalmente utilizam a citometria de fluxo para avaliar o cátion lipofílico 5,5',6,6' tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianina (JC-1), utilizado para monitorar a despolarização da membrana mitocondrial. Este ensaio mede a atividade das mitocôndrias de maneira direta e a morte celular de maneira indireta, uma vez que a despolarização mitocondrial está associada à perda de função desta organela e consequente morte celular (Cossarizza *et al.*, 1993; Verhoeven *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2011; Thushara *et al.*, 2013). Ao contrário da utilização do JC-1, cuja técnica está bem descrita e validada em plaquetas humanas, outra forma de avaliação mitocondrial por citometria de fluxo - nunca testada em plaquetas caninas - são as sondas MitoTracker Green e MitoTracker Red, que revelam mitocôndrias em *swelling* e mitocôndrias funcionais, respectivamente (Agnello, Morici e Rinaldi, 2008; Puleston, 2015).

4. OBJETIVOS E METAS

Geral

- Padronizar técnicas bioquímicas de avaliação do concentrado de plaquetas canino e avaliar a funcionalidade e integridade das plaquetas caninas durante 5 dias de armazenamento.

Específicos

- Padronizar a técnica de obtenção do concentrado de plaquetas canino para que possa ser utilizada em bancos de sangue veterinários com condições similares;
- Descrever e padronizar a técnica de avaliação de massa mitocondrial em concentrado de plaquetas canino;
- Descrever, padronizar e comparar duas técnicas de avaliação de potencial de membrana mitocondrial em concentrado de plaquetas canino;
- Descrever e padronizar técnica de avaliação de apoptose em concentrado de plaquetas canino;
- Descrever e padronizar técnica de avaliação de funcionalidade plaquetária (agregometria) em concentrado de plaquetas canino;
- Avaliar índices morfoestruturais (MPV, PDW) das plaquetas caninas armazenadas durante 5 dias;
- Descrever a atividade metabólica das plaquetas caninas estocadas durante o armazenamento.

Indicadores da meta

- Curto prazo: aumentar o entendimento da bioquímica celular das plaquetas caninas estocadas em forma de concentrado de plaquetas em plasma autólogo.
- Longo prazo: gerar conhecimento que possa ser aplicado em pesquisas futuras envolvendo CP canino e assim melhorar a qualidade do CP oferecido aos pacientes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos animais

A participação dos animais neste estudo ocorreu mediante permissão do tutor. Este foi informado sobre os riscos e benefícios do procedimento, de acordo com os conceitos de bioética aplicados à pesquisa e ao bem-estar animal (Ellery, 1985) e assinou um termo de consentimento antes da inclusão do doador na pesquisa. Além disso, o tutor respondeu um questionário cujas respostas foram analisadas pelos pesquisadores responsáveis (Anexos 01 e 02).

Crítérios de inclusão

Foram incluídos 22 cães clinicamente saudáveis, de temperamento dócil (que aceitam tranquilamente a manipulação para coleta e doação de sangue), com mínimo 28 kg, machos ou fêmeas, entre 1 e 8 anos. Foram observados o histórico de vacinação (Cinomose, Adenovírus Tipo 2, Coronavírus, Parainfluenza, Parvovirose e Leptospirose Canina) e desverminação e realizados exames clínico e laboratorial. Todos os animais selecionados apresentavam hematócrito acima de 40% (Wardrop *et al.*, 2005; Abrams-Ogg e Schneider, 2010).

Crítérios de exclusão

Foram excluídos do estudo animais que apresentaram qualquer alteração no exame clínico; que receberam anti-inflamatório, antimicrobianoterapia ou que tivessem sido expostos a toxinas ou vacinados em um período inferior a quatro semanas; aqueles cujos exames laboratoriais pré-doação não estavam dentro dos parâmetros normais para a espécie; com hematócrito inferior a 40%; ou positivos em qualquer teste de detecção de agentes infecciosos (descritos abaixo) (Abrams-Ogg e Scheneider, 2010; Davidow, 2013).

Análises laboratoriais

No dia da avaliação foram coletados aproximadamente 7 mL de sangue venoso utilizando sistema a vácuo (BD Vacutainer) em tubos com EDTAK₂ e tubos sem anticoagulante ou com

heparina. A determinação dos parâmetros hematológicos foi realizada através da contagem total de eritrócitos, plaquetas, leucócitos e dosagem de hemoglobina com aparelho automático de uso veterinário calibrado para espécie canina (PocH-100iV Diff, Sysmex). Hematócrito foi determinado pelo método de microhematócrito a 9.520 g por cinco minutos (microcentrífuga SPIN-1000-110, Microspin). A contagem diferencial de leucócitos e análise do esfregaço sanguíneo corado (corante Wright-Giemsa, Sigma-Aldrich) foram realizadas por profissional qualificado. As amostras de sangue para as análises bioquímicas foram centrifugadas após a retração do coágulo ou imediatamente após a coleta no caso do uso de tubo heparinizado. Foram realizadas determinações da concentração de albumina, creatinina e atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) com analisador automático pelo método de química seca (Vitros 250 Chemistry System, Johnson & Johnson). Os cães também foram testados para a presença de antígeno de *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Anaplasma ssp.*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia ssp.* com reagente comercial (Teste Snap 4Dx, Idexx Laboratories) e anticorpos contra *Leishmania ssp* (Vetcheck, Tecs Lab) (Wardrop *et al.*, 2005; Davidow, 2013).

Delineamento do estudo

Dos 22 animais aprovados nas etapas de avaliação clínica e laboratorial foram coletadas bolsas de sangue total (ST) de 450 mL. As bolsas foram processadas conforme descrito abaixo até a obtenção de bolsas de concentrados de plaquetas (CP) canino com cerca de 60 mL (55–70 mL) de volume. O processamento das bolsas ocorreu no máximo quatro horas após a coleta (dia zero). Nos dias 1, 3 e 5 foram realizados testes de controle de qualidade como contagem de leucócitos (apenas dia 1), contagem de plaquetas, MPV, PDW, hematócrito, contagem de eritrócitos, determinação da concentração de hemoglobina e avaliação do *swirling* plaquetário; função (agregometria); metabolismo plaquetário (pO₂, pCO₂, pH, concentração de bicarbonato, glicose, lactato, ATP) e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi utilizada como marcador de viabilidade celular (Amorini *et al.*, 2007). Também foram avaliados marcadores de ativação (CD62P), lesão mitocondrial (Mitotracker e JC-1), apoptose celular (anexina V, caspase). No quinto dia as bolsas foram enviadas para análise microbiológica.

O presente estudo teve como objetivo elucidar aspectos relacionados à viabilidade, morfologia, ativação, metabolismo e apoptose plaquetária em CPs caninos armazenados por 5 dias. Detalhes sobre a preparação dos CPs e metodologias estão descritas nas seções a seguir. Para facilidade de referência, os ensaios realizados nos dias 1, 3 e 5 estão listados abaixo:

Características avaliadas em cada unidade de CP canino

- ◆ Volume
- ◆ Contagem plaquetária
- ◆ Contagem de leucócitos residuais (apenas dia 1)
- ◆ Hematócrito e contagem de eritrócitos
- ◆ Manutenção da esterilidade no 5º dia

Avaliação do metabolismo plaquetário

- ◆ pH (22°C)
- ◆ pO₂
- ◆ pCO₂
- ◆ Bicarbonato
- ◆ ATP
- ◆ Glicose
- ◆ Lactato

Morfologia plaquetária

- ◆ MPV
- ◆ PDW
- ◆ *Swirling*

Função plaquetária

- ◆ Agregometria

Ativação plaquetária

- ◆ Expressão de CD62P

Marcadores de apoptose e necrose celular

- ◆ Anexina V (exposição de PS)
- ◆ Caspase
- ◆ LDH

Lesão mitocondrial

- ◆ Mitotracker (Green e Red)
- ◆ JC-1

Coleta das bolsas de sangue total canino

A coleta da bolsa ocorreu por punção da veia jugular, através do método gravitacional, com homogeneização automática e controle do fluxo e do volume da doação (Homogeneizador de bolsas Biomixer 323, Ljungberg & Kögel) durante todo o procedimento, que durou entre 5 e 15 minutos (Abrams-Ogg e Scheneider, 2010). A coleta foi realizada através de um sistema fechado, em bolsas triplas (CPD/SAGM, JP Indústria Farmacêutica), cuja bolsa primária contém em seu interior CPD (citrato, fosfato, dextrose); uma das bolsas satélite contém a solução aditiva SAGM - utilizada para manutenção do concentrado de eritrócitos - e ainda uma terceira bolsa vazia (TOTM), utilizada para o armazenamento do concentrado de plaquetas. Após a coleta as bolsas ficaram em repouso a 22°C por cerca de uma hora, quando foi iniciado o processamento.

Padronização da centrifugação das bolsas

Foram avaliadas 96 bolsas de sangue, e testados diferentes tempos de centrifugação: 4 e 6 minutos na primeira centrifugação; 6 e 8 minutos na segunda centrifugação; e diferentes velocidades na primeira e segunda centrifugação a fim de definir a melhor programação, que então foi utilizada no decorrer do experimento. Após o processamento das bolsas, foi coletada

uma alíquota de cada hemocomponente (concentrado de eritrócitos, plasma pobre em plaquetas e concentrado de plaquetas) para a contagem de plaquetas e eritrócitos em contador hematológico validado para uso veterinário (PocH-100iV Diff, Sysmex).

Processamento e armazenamento do CP

O processamento das bolsas foi realizado em no máximo 4 horas após a coleta. Os CPs foram obtidos através da metodologia do plasma rico em plaquetas (PRP), onde cada bolsa de sangue total foi submetida a centrifugação leve (1600 g) por 6 minutos a 22°C (Centrífuga Sorvall Legend RT, Thermo Scientific), o que permitiu a separação do plasma rico em plaquetas (PRP) dos eritrócitos. O PRP foi retirado da bolsa de ST centrifugada através de um extrator (Extrator de plasma manual, ACS201, Terumo Medical do Brasil) e em seguida submetido a uma segunda centrifugação (3.300 g) por 8 minutos a 22°C (Centrífuga Sorvall Legend RT, Sorvall/Thermo). Após a segunda centrifugação formou-se um *pellet* de plaquetas no fundo da bolsa e o plasma sobrenadante foi retirado de forma que restaram na bolsa aproximadamente 60 mL de plasma, constituindo o CP. As bolsas de CP canino foram mantidas em repouso por 1 hora e então armazenadas sob temperatura controlada (20–24°C) (câmara ambientadora de plaquetas CDCI 03, Indrel) em agitação constante em incubadora com 60 a 70 ciclos por minuto (agitador de plaquetas linear AP48L, Presvac).

5.1. AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO

Coleta da suspensão de plaquetas

A fim de evitar contaminação externa, a amostragem para as análises foi obtida através de cânula para coleta (*Sampling Site Coupler*, Fenwal) (Figura 16), que permite a introdução de uma agulha 16G para retirada das alíquotas (Curvers *et al.*, 2004) nos dias 1, 3 e 5. Os testes foram realizados imediatamente após a retirada de alíquotas de 5 a 7 mL.



Figura 16. Bolsas de CP canino com cânulas para coleta através da introdução de agulha (círculo vermelho).

5.1.1. PARÂMETROS DESCRITIVOS

Volume do CP, contagem de plaquetas e índices morfoestruturais

O volume das bolsas foi calculado de acordo com o peso e a densidade do fluido (Van Der Meer *et al.*, 2010); a contagem de plaquetas da unidade foi calculada através concentração plaquetária (contador hematológico veterinário PocH-100iV Diff, Sysmex) e do volume da bolsa; enquanto os índices morfoestruturais foram obtidos através de contador hematológico veterinário (PocH-100iV Diff, Sysmex).

Avaliação do swirling plaquetário

A avaliação do *swirling* plaquetário dos CPs foi realizada imediatamente antes da coleta das alíquotas. A técnica consiste em uma avaliação visual do CP, contra a luz, onde é observada a movimentação (turbilhão) das plaquetas e utilizada uma escala de classificação de 0 a 3 (onde 0 indica ausência de *swirling* e 3 a qualidade máxima) (Bertolini *et al.*, 2000; Mathai *et al.*, 2006; Picker, 2011).

Número de leucócitos por unidade de CP

Contagem de leucócitos residuais foi realizada em câmara de Nageotte (LO-Laboroptik GmbH), no dia 1 de avaliação. Após diluição do CP com líquido de Türcck e preenchimento da câmara foram contados 40 retângulos e feitos os cálculos de conversão. Também foi realizada

determinação do número de leucócitos com contador de células automático Poch Vet (Poch-100iV Diff, Sysmex) para efeito de comparação.

Número de eritrócitos por unidade de CP

A contagem de eritrócitos foi realizada com contador automático Poch Vet (Poch-100iV Diff, Sysmex) conforme instruções do fabricante.

Confirmação da manutenção da esterilidade do CP ao fim do estoque

No 5º dia de armazenamento uma alíquota de 1 mL de cada CP foi utilizada para cultura microbiológica no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária da UFRGS. A amostra foi dividida igualmente para realização de cultura aeróbia e anaeróbia em caldo BHI e incubada a 37 °C durante 10 dias. As unidades foram mantidas durante todo o período de incubação, a fim de permitir a confirmação de qualquer resultado positivo.

5.1.2. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PLAQUETÁRIO

pH

Foram utilizados 3 métodos de determinação do pH dos CPs caninos: pHmetro, gasômetro portátil e fitas de específicas para determinação de pH.

pHmetro

Após calibração do pHmetro (HI 99171, Hanna Instruments) em pH 4,01 e 7,01, o pH dos concentrados de plaquetas foi obtido sob temperatura controlada (22°C), conforme instruções do fabricante. Alíquotas de 1,5 mL de CP foram transferidas para tubos de ensaio de 10 mL, onde foi realizada a determinação do pH. O aparelho é composto por um eletrodo conectado a um potenciômetro, que converte o valor de potencial do eletrodo em unidades de pH (Figura 17).



Figura 17. Potenciômetro utilizado para mensuração de pH em CP canino.

Analizador de gases

A determinação do pH foi realizada com um analisador de gases portátil (iStat, Abbott Point of Care) de acordo com as instruções do fabricante. Para este estudo foi utilizado o cartucho CG8, mantido em temperatura ambiente por 30 minutos até a utilização. Após, uma alíquota dos CPs foi colocada no cartucho e este foi introduzido no analisador de gases para determinação do pH (Figura 18). O analisador de gases opera sob temperatura controlada de 37°C, sendo necessária a conversão do valor de pH para 22°C (Johnson *et al.*, 2013). Sendo assim, os valores analisados foram convertidos conforme Johnson et al. (2013), onde: $\text{pH } 22^{\circ}\text{C} = \text{pH } 37^{\circ}\text{C} - [0,015 \times (22-37)]$.



Figura 18. Analisador de gases i-Stat utilizado para determinação de diversos parâmetros em CP canino.

Fita colorimétrica

Para este método, mergulhou-se a fita colorimétrica (Macherey-Nagel) no tubo contendo a amostra de CP canino, retirando-a logo em seguida. Após 1 minuto foi feita a leitura do pH com o auxílio de uma faixa colorimétrica fornecida pelo fabricante (Figura 19).



Figura 19. Fita colorimétrica para mensuração de pH.

Bicarbonato

A dosagem de bicarbonato foi realizada através de analisador de gases portátil (iStat, Abbott Point of Care) de acordo com instruções do fabricante.

Glicose e lactato

A concentração de glicose foi realizada analisador de gases portátil (iStat, Abbott Point of Care) de acordo com instruções do fabricante; enquanto a determinação de lactato foi realizada através de química seca com o aparelho Vitros 250 Chemistry System (Jonhson & Jonhson).

Determinação dos níveis de ATP

O método de determinação dos níveis de adenosina-5'-trifosfato (ATP) utilizado foi baseado na oxidação da luciferina (D-LH2), dependente de ATP. Foi utilizado o kit ATP Lite (Luminescence ATP Detection Assay System, PerkinElmer) e as leituras foram obtidas em leitor de microplaca multi-modo (Spectramax M5, Molecular Devices). A reação é catalisada pela enzima luciferase de *Photinus pyralis* na presença do substrato D-luciferina. A luminescência obtida é proporcional à concentração celular de ATP da amostra. A seguir a padronização do método.

Extração do ATP:

- Diluir cerca de 1000 plaquetas/ μL em 900 μL de TCA (8%);
- Agitar em vórtex;
- Incubar em gelo por 5 minutos;
- Centrifugar 5 minutos 2.700 g 4°C;
- Retirar 800 μL do sobrenadante;
- Neutralizar o sobrenadante com 80 μL de carbonato de potássio 3M;
- Agitar com vórtex;
- Incubar em por 10 minutos;
- Congelar a -80°C até análise.

Ensaio de determinação do ATP:

- Pipetar 100 µL de sobrenante de lisado de plaquetas em TCA 8% em um tubo de ensaio;
- Acrescentar a 50 µL de solução de lise e agitar por cinco minutos a 700 rpm (essa solução é responsável por estabilizar o pH e inativar as ATPases presentes na amostra);
- Adicionar 50 µL de solução de substrato contendo a enzima luciferase e agitar cinco minutos em agitador a 700 rpm;
- Proteger da luz a placa por dez minutos;
- Medir a luminescência.

5.1.3. AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A agregação plaquetária por turbidimetria avalia a resposta das plaquetas a agentes agregantes. As plaquetas têm a propriedade de juntarem-se umas às outras quando ativadas por um agente agregante, formando agregados que ocasionam variação na densidade óptica do plasma (meio em que se encontram), esta variação de densidade é detectada fotoeletricamente, e é proporcional ao grau de agregação sofrida (Jackson, 2007; Panzer e Jilma, 2011) (Figura 20).

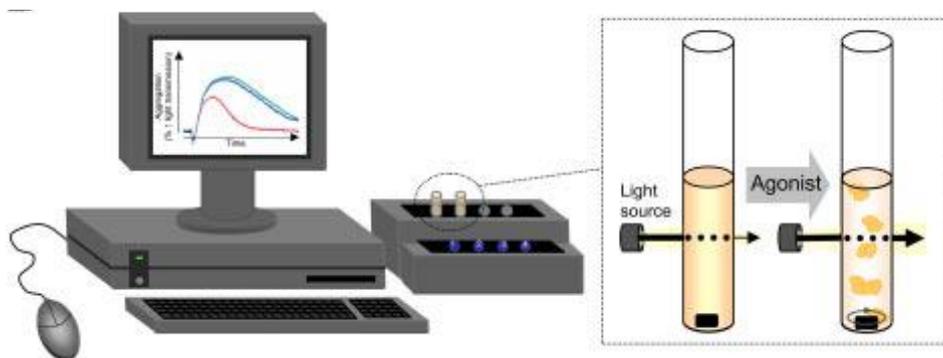


Figura 20. Princípio básico do agregômetro (Jackson, 2007).

As amostras submetidas ao ensaio de agregação plaquetária foram padronizadas em uma concentração de 250×10^3 plaquetas/µL e, para isso, o CP foi diluído com PPP (plasma pobre em plaquetas) autólogo. As leituras foram realizadas com o equipamento agregômetro de

plaquetas MYR-4 (Qualitem) e *software* AgregMY4 (Figura 21). Como controle negativo foi utilizado PPP autólogo.



Figura 21. Agregômetro utilizado para avaliar CP canino.

O equipamento é calibrado com a transmissão de luz do PPP autólogo, que representa 100% de agregação do CP. O PPP é pipetado em uma cubeta, que é colocada em um recipiente de incubação (37°C), localizado entre uma fonte de luz e uma célula fotoelétrica, que irá medir a densidade de turvação óptica. A cubeta com PPP é substituída por outra contendo CP na concentração padronizada, após a estabilização do leitor óptico, o agente agregante é pipetado no CP e o teste é iniciado. A finalidade do teste é estimular a agregação de maneira similar ao que ocorre *in vivo*, para isso foram selecionados diferentes agonistas plaquetários (descritos a seguir). A luz passa através do tubo e é capturada pelo sensor; conforme o processo de agregação ocorre, a luz é transmitida mais facilmente e esta taxa de transmissão gera uma curva de acordo com o tempo, gerando um gráfico de tempo x porcentagem de agregação (Figura 22).

1 - Preparo da amostra de CP:

- Diluir a amostra com plasma autólogo a uma concentração de aproximadamente $250 \text{ plaquetas} \times 10^3/\mu\text{L}$;
- Preparar aproximadamente 3 mL;

- Colocar as alíquotas de PFC em banho úmido por 3 minutos;
- Homogeneizar com auxílio de vórtex;
- Utilizar imediatamente após o descongelamento.

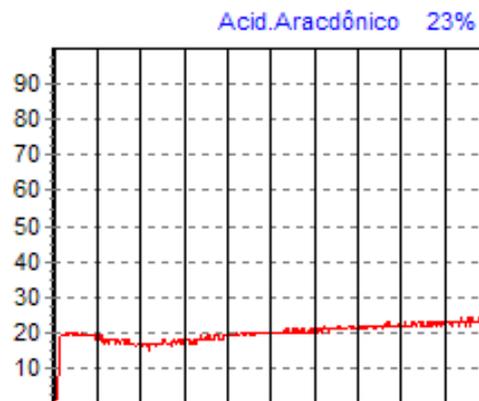


Figura 22. Gráfico de agregação plaquetária.

2 - Determinação da agregação plaquetária

- Zerar o canal de leitura do agregômetro com plasma autólogo;
- Programar o canal;
- Identificar a amostra;
- Selecionar o agonista;
- Programar para 10 minutos de leitura;
- Transferir 500 μL da suspensão de plaquetas para a cuveta e colocá-la no agregômetro;
- Adicionar o agonista desejado (um agonista por teste):
 - Colágeno (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 5 μL
 - Ácido Araquidônico (0,5 mM): 5 μL
 - ADP (10 μM): 5 μL
- Esperar o aparelho estabilizar (segundos) e clicar no botão de iniciar;
- Aguardar o tempo de cada teste;
- Salvar os resultados.

5.1.4. AVALIAÇÃO DE ATIVAÇÃO, APOPTOSE E LESÃO MITOCONDRIAL PLAQUETÁRIA ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Foram realizados estudos preliminares com o objetivo de obter a melhor concentração de plaquetas e o tempo de incubação das plaquetas para as análises com os reagentes/anticorpos, bem como diluições seriais para definir a concentração ideal de anticorpos para incubação (dados não apresentados). Todas as leituras foram realizadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), através do software BD CellQuest Pro, com aquisição de 30.000 eventos. Posteriormente os resultados foram analisados com software comercial FCS Express 5 (De Novo Software).

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas 500.000 ou 5.000.000 de plaquetas, em tubos de poliestireno específicos para citometria (Becton Dickinson) e processadas conforme cada protocolo (descritos abaixo). Inicialmente foi realizado um *gate* (limites de regiões de populações celulares) delimitando a população de plaquetas de acordo com as características de tamanho e granulosidade (Figura 23), excluindo debris, eritrócitos e leucócitos residuais e assim aprimorando a aquisição de configurações. Plaquetas normais foram distinguidas de eritrócitos e micropartículas de acordo com o tamanho, enquanto a diferenciação de leucócitos foi realizada pela granulosidade (Wilkerson e Shuman, 2001; Tynngård, 2009; Wilkerson, 2012).

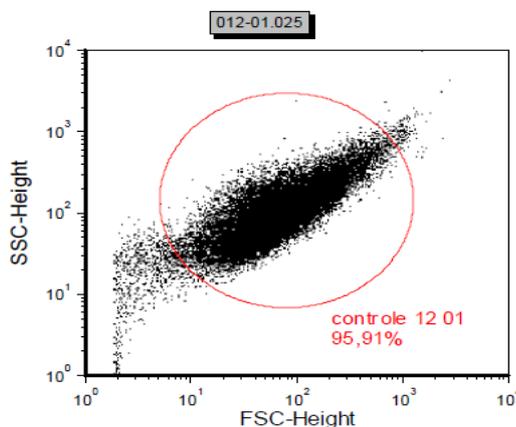


Figura 23. *Gate* inicial da população de plaquetas.

Ativação plaquetária

Inicialmente a população de plaquetas foi identificada com o uso do anticorpo monoclonal específico anti-CD61 FITC (clone VI-PL2 - BD Biosciences). Para a avaliação da ativação plaquetária foi utilizado o anticorpo monoclonal CD62P ligado com ficoeritrina (PE) (clone AC1.2 -BD Biosciences). Os resultados foram expressos em porcentagem de eventos positivos de acordo com o *gate* inicial os quadrantes em que se encontravam as marcações.

Método

- Pipetar 1 µL de CD61 FITC e 3 µL de CD62P PE;
- Adicionar 1 µL de CP diluído (500.000 plaquetas);
- Adicionar PBS para um volume final de 100 µL;
- Incubar 15 min no escuro a temperatura ambiente;
- Adicionar 250 µL de solução PBS;
- Realizar leitura no citômetro imediatamente.

Marcadores de apoptose e necrose celular

Anexina V

Anexina V pertence a uma classe de proteínas com propriedades anticoagulantes e tem se mostrado uma excelente ferramenta para a detecção de células apoptóticas. Esse ensaio baseia-se na afinidade da Anexina V pela PS. A PS é um fosfolípídeo que normalmente localiza-se na face interna da membrana sendo exposta no estágio inicial do processo de apoptose enquanto a membrana celular ainda está intacta. Esta tem se mostrado uma boa ferramenta para a detecção de células apoptóticas (Gerke e Moss, 2002). O ensaio aqui apresentado utilizou Anexina V ligada a isotiocianato de fluoresceína (ApoFlowEx FITC Kit, Exbio) fornecido como um *kit* que inclui também uma solução tampão concentrado incorporando Ca²⁺. Como controle negativo foi utilizada a solução tampão fornecida com o kit (Wills, Wardrop e Meyers, 2006). Foi avaliado o percentual de células marcadas (eventos positivos em FL1).

Método:

- 1 µL do CP diluído (500.000 plaquetas);
- 2,5 µL de Anexina V;
- 45 µL água destilada;
- 5 µL de tampão;
- Incubar 15 min no escuro a temperatura ambiente;
- Adicionar 1 mL de PBS (lavagem);
- Centrifugar a 1.150 g por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante por inversão;
- Ressuspender em 250 µL de PBS;
- Realizar leitura no citômetro imediatamente.

Caspase

Durante a apoptose ocorre ativação de uma família de proteases conhecidas como caspases, cujo processo de ativação é o evento chave deste mecanismo de morte programada. A ligação do fluorocromo fluoresceína (FITC) a um peptídeo específico e ao composto fluorometilcetona (FMK), forma um complexo não tóxico capaz de penetrar em células vivas e inibir irreversivelmente vários tipos de caspases ativas. Ressalta-se o fato de que a ligação só ocorre quando a caspase em questão está em sua forma ativa no interior da célula. O marcador utilizado neste experimento (CaspACE FITC-VAD-FMK, Promega) é um inibidor de caspase ativa e está ligado a uma molécula fluorescente (fluoresceína - FITC), ou seja, se liga irreversivelmente à caspase ativada dentro das plaquetas e assim serve como um marcador de apoptose *in situ* (Smolewski *et al.*, 2002). Quando ocorre a ligação há emissão de fluorescência, e esta foi avaliada de acordo com a porcentagem de plaquetas com emissão de fluorescência. No presente estudo foi realizada uma curva crescente de dose (0,5; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 30 µM.) para determinar a concentração mais adequada do inibidor de caspase CaspACE FITC-VAD-FMK para o concentrado de plaquetas canino. Os resultados obtidos demonstraram uma eficiente marcação desta sonda fluorescente na dose de 10 µM.

Para confirmar que as plaquetas caninas responderiam à marcação com caspase TM FITC VAD-FMK foi utilizado controle positivo com estaurosporina. Foi realizado um piloto onde o

processo de apoptose foi experimentalmente induzido com estaurosporina. Foram adicionados ao CP diferentes concentrações de estaurosporina (Sigma-Aldrich, S4400) (1 μ M, 2 μ M, 3 μ M), um inibidor de proteínas quinase que induz apoptose através do bloqueio de sítios de ligação do ATP. As amostras foram submetidas ao protocolo descrito abaixo, e as leituras realizadas após 12 e 24 horas de incubação (Meira Martins *et al.*, 2015).

Preparo da solução de estoque:

- Diluir e aliquotar a solução estoque de 5 mM

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$5 \text{ mM} \times V1 = 20\mu\text{L} \times 1 \text{ mM}$$

$$5 \text{ mM} \times V1 = 20 \quad \gg \quad V1 = 4\mu\text{L}$$

Então: adicionar 4 μ L de solução estoque (5 mM) a 16 μ L DMSO = 20 μ L (1 mM)

- 4 μ L de solução estoque + 16 μ L DMSO = 20 μ L de solução estoque final
- Aliquotar e congelar.

Método:

- Identificar um tubo ‘caspase’;
- Pipetar 1 μ L de CP com 500.000 plaquetas;
- Adicionar 98 μ L de PBS;
- Adicionar 1 μ L da solução de estoque de Caspase a 1 mM;
- Incubar por 20 minutos a 37°C (proteger da luz);
- Adicionar 1 mL de PBS (lavagem);
- Centrifugar a 1.150 g por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante por inversão;
- Ressuspender em 250 μ L de PBS;
- Realizar a leitura no citômetro.

Lesão mitocondrial (potencial de membrana e swelling) - Mitotracker

As sondas fluorescentes MitoTracker Green FM (MTG) e MitoTracker Red CMXRos (MTR) (Invitrogen) são amplamente utilizadas para marcar as mitocôndrias de células vivas por

citometria de fluxo ou por visualização em microscopia de fluorescência ou confocal. O MTG emite fluorescência verde e tem afinidade pelos lipídeos de membranas das mitocôndrias. O MTR emite fluorescência vermelha e tem afinidade por mitocôndrias que possuem potencial de membrana ativo. Portanto, avaliar a fluorescência destas duas sondas é uma maneira possível de se acessar a massa mitocondrial – relacionada com o *swelling* (inchaço) das organelas – e a atividade mitocondrial. Quando existem mais plaquetas que emitem fluorescência em MTR, o resultado pressuposto é de atividade mitocondrial satisfatória. Ao contrário, conforme aumenta o número de plaquetas que emitem fluorescência em MTG o resultado pressuposto é a perda de função e o *swelling* mitocondrial, situação que caracteriza dano da organela e geralmente acarreta em morte celular (Agnello, Morici e Rinaldi, 2008).

Preparo da solução estoque (preparação no escuro):

- Retirar o *vial* do freezer e deixar aquecer a temperatura ambiente;
- Diluir o *vial* para a concentração de 1 mM, utilizando DMSO:
 - PM Red: 531,5236 → adicionar 94 μL de DMSO;
 - PM Green: 671,8797 → adicionar 75 μL de DMSO;
- Separar em alíquotas de 10 μL (solução estoque);
- Congelar alíquotas.

Método

1. Identificar 2 tubos: Green e Red

- Adicionar 99 μL de PBS em cada tubo;
- Adicionar 1 μL de cada reagente (MTG e MTR) no tubo correspondente;
- Irá resultar em uma solução de trabalho de 10 μM de Mitotracker Green e Red.

2. Marcação controle do MTG

- Pipetar 98 μL de PBS em cada tubo;
- Adicionar 500.000 plaquetas (1 μL);
- Adicionar 1 μL de MTG (solução de trabalho de 10 μM) no tubo “green”, o que corresponde a um volume final de 100 μL .

3. Marcação controle do MTR

- Pipetar 98 μL de PBS em cada tubo;
- Adicionar 500.000 plaquetas (1 μL);
- Adicionar 1 μL de MTR (solução de trabalho de 10 μM) no tubo “red”, o que corresponde a um volume final de 100 μL .

4. Marcação dupla MTR/MTG

- Pipetar 97 μL de PBS em cada tubo;
- Adicionar 500.000 plaquetas;
- Adicionar 1 μL de MTG e 1 μL de MTR (solução de trabalho de 10 μM) no tubo correspondente, volume final de 100 μL ;
- Incubar por 45 minutos no banho a 37°C;
- Adicionar 1 mL de PBS (lavagem);
- Centrifugar a 1.150 g por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante por inversão e repetir o processo de lavagem;
- Ressuspender em 250 μL de PBS;
- Fazer a leitura no citômetro.

Potencial de membrana mitocondrial (JC-1)

O marcador MitoScreen JC-1 (BD Bioscience) é uma molécula monomérica permeável a membrana celular que emite fluorescência verde (JC-1 monômeros) quando não está acumulado na mitocôndria. Por ter afinidade pelas mitocôndrias ativas, se acumula formando agregados nestas organelas (JC-1 agregados), mudando a emissão de fluorescência para vermelho. Desta forma, os graus de despolarização da membrana mitocondrial são quantificados pela mudança de emissão de fluorescência do JC-1 (Cossarizza *et al.*, 1993). As plaquetas foram identificadas de acordo com características de tamanho e granulosidade em um primeiro *gate* utilizado nas análises posteriores como controle da população. A fluorescência verde foi detectada no canal FL1, enquanto o canal FL2 foi utilizado para identificar a fluorescência vermelha dos JC-1 agregados, que indicam $\Delta\Psi\text{m}$ adequado. Os resultados foram expressos em porcentagem de plaquetas com $\Delta\Psi\text{m}$ adequado.

Preparo da solução estoque:

- Concentração de 1-5 mg/mL (1,5-7,7 mM ou 1000-5000 µg/mL), diluído em DMSO;
- Foram separadas alíquotas armazenadas a – 30°C;
- Foi utilizada 1 alíquota para cada dia de experimento.

Método:

- Diluir a solução de trabalho em concentração 1:1000 com PBS;
- Adicionar o volume de CP puro para obtenção de 5.000.000 de plaquetas diretamente no tubo com a solução de trabalho;
- Incubação a 37°C por 15 minutos no escuro;
- Adicionar 2 mL de PBS;
- Centrifugar 1.150g por 5 minutos;
- Descartar o sobrenadante por inversão;
- Ressuspender as plaquetas com 250 µL PBS;
- Analisar em citômetro de fluxo imediatamente.

5.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e para avaliar o intervalo de confiança foi utilizado Teste de Duncan como posthoc. As análises foram executadas em um software comercial (GraphPadPrism 6.0, GraphPad Software), com nível de significância de 0,05. Correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar os parâmetros analisados, foram consideradas correlações significativas aquelas com $p < 0,05$ e correlações significativas fortes aquelas com $p < 0,001$.

5.3. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo número 26102).

Justificativa do uso dos animais

Caninos foram selecionados para esta pesquisa devido à demanda cada vez maior de concentrado de plaquetas para esta espécie, ao mesmo tempo em que poucos estudos avaliaram a qualidade do mesmo, bem como o metabolismo das plaquetas caninas mantidas sob condição padrão de banco de sangue.

Descrição dos procedimentos realizados e grau de severidade

Os cães selecionados para participar do estudo foram submetidos a exame clínico, anamnese e avaliação laboratorial. O exame clínico não expõe o animal a dor; apenas a coleta de sangue para exames e a coleta da bolsa de sangue acarretam um grau mínimo de desconforto, classificado com grau leve de severidade. Os animais realizaram uma única doação (sem sedação ou anestesia), durante todo o período do experimento. As coletas de sangue foram realizadas por profissionais com experiência. Cuidados dispensados pela equipe com todos os participantes em todas as coletas foram: antissepsia antes dos procedimentos de coleta (amostras para triagem e coleta da bolsa), pressão no local da punção venosa após a doação durante dois a cinco minutos, curativo com pomada cicatrizante e bandagem adesiva, observação do animal após a doação por 15 a 30 minutos. Logo após a doação os doadores foram alimentados e o tutor recebeu por escrito recomendações pós-doação de sangue (Anexo 02). O volume de sangue doado em cada etapa está de acordo com a literatura, de 450 mL, ou seja, no máximo 17 mL/kg, considerando que todos os doadores possuem mais de 28 kg (Abrams-Ogg e Schneider, 2010).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. PADRONIZAÇÃO DA CENTRIFUGAÇÃO

As diferentes programações de tempo e velocidade utilizadas na padronização da centrifugação, bem como as contagens de plaquetas nos diferentes hemocomponentes, estão apresentadas na Tabela 1.

Foi observado que centrifugações leves, como 1.500 g ou 1.550 g resultaram em elevado número de eritrócitos no CP e hematócrito >1%, enquanto centrifugações pesadas, como 2.000 g ou 2.700 g resultaram em elevado número de plaquetas na bolsa de concentrado de eritrócitos. Também foi observada grande variabilidade de contagens em bolsas submetidas ao mesmo protocolo. Apesar de contagens similares obtidas com centrifugações de 1.600, 1.610 e 1.700 g, optou-se pela utilização da centrifugação menos pesada possível. Sendo assim, definiu-se que a programação a ser utilizada no experimento seria 1.600g por 6 minutos na primeira centrifugação e 3.300g por 8 minutos na segunda centrifugação.

Para obter as 118 bolsas utilizadas (96 na padronização da centrifugação e 22 do grupo de bolsas avaliadas), foram avaliados 153 cães, dos quais 27 foram excluídos por não apresentarem-se aptos nos exames laboratoriais. Além disso, 8 bolsas não foram utilizadas por outras questões como: dificuldade de contenção do doador e volume da bolsa inferior a 450 mL ou bolsas que não estavam dentro das referências de controle de qualidade estabelecidas pela Anvisa e/ou AABB no primeiro dia de avaliação.

Tabela 1. Padronização das centrifugações das bolsas de sangue total e PRP canino.

N	1ª CENTR.				2ª CENTR.				CONTAGEM DE PLAQUETAS (MÉDIA)		
	VEL (g)	TEMPO (minutos)	AC.	FR.	VEL (g)	TEMPO (minutos)	AC.	FR.	CE x 10 ³ (/µL)	PPP x 10 ³ (/µL)	CP x 10 ³ (/µL)
4	1500	6	5	0	3000	8	5	0	-	-	-
4	1500	6	5	0	3300	8	5	0	-	-	-
4	1550	6	5	0	3000	8	5	0	77	85	1280
4	1600	4	5	0	3000	6	5	0	54	78	1243
4	1600	4	5	0	3000	8	5	0	38	21	1167
4	1600	6	5	0	3300	6	5	0	43	21	1111
8	1600	4	5	1	3000	6	5	1	75	97	1900
4	1600	4	5	1	3000	8	5	0	72	100	1977
4	1600	6	5	1	3300	6	5	0	57	39	898
8	1600	6	5	1	3300	8	5	1	52	11	990
4	1610	4	5	0	3300	6	5	0	38	18	1111
4	1610	6	5	0	3000	6	5	0	42	12	1019
4	1700	6	5	0	3000	8	5	0	48	15	1000
4	1700	6	5	0	3300	6	5	0	50	18	926
4	1800	4	5	0	3300	8	4	0	182	15	842
4	1800	6	5	0	3000	6	4	0	196	17	893
4	2000	4	5	0	3000	6	4	0	252	13	911
4	2000	6	5	0	3300	6	4	0	247	4	833
4	2200	4	5	0	3000	6	4	0	234	8	890
4	2400	4	5	0	3000	6	4	0	270	0	866
8	2700	4	5	0	3300	6	4	0	292	0	731

Veloc, velocidade; AC, aceleração; FR, freio; CE, concentrado de eritrócitos; PPP, plasma pobre em plaquetas; CP, concentrado de plaquetas; -, CP visualmente contaminado com eritrócitos, contagens não realizadas.

6.2. PARÂMETROS DESCRITIVOS

As médias e desvio padrão (DP) dos principais parâmetros analisados durante o armazenamento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Metabolismo plaquetário (média \pm desvio padrão) *in vitro* de plaquetas caninas armazenadas por 5 dias.

Parâmetros	Dia 1	Dia 3	Dia 5
PQT (x 10 ¹⁰ /unidade)	7,4882 \pm 2,39	7,6877 \pm 2,39	7,4191 \pm 2,79
MPV (fL)	11,5136 \pm 1,22 ^a	12,4818 \pm 4,53 ^a	13,1682 \pm 6,58 ^b
PDW (fL)	12,9609 \pm 7,90 ^a	13,9500 \pm 5,46 ^a	15,0936 \pm 1,98 ^b
pH (22°C)	6,9682 \pm 0,38 ^{a*}	6,4511 \pm 0,55 ^b	5,9445 \pm 0,66 ^{c*}
pO ₂ (mm Hg ⁻¹)	107,6 \pm 32,19 ^a	115,9091 \pm 30,99 ^a	140,1364 \pm 21,84 ^b
pCO ₂ (mm Hg ⁻¹)	43,7 \pm 43,7 ^{a*}	25,4864 \pm 25,48 ^{b*}	9,5045 \pm 9,50 ^{c*}
Bicarbonato (mmol L ⁻¹)	11,88 \pm 1,66 ^{a*}	3,53 \pm 2,77 ^{b*}	0,595 \pm 1,16 ^{c*}
Glicose (mg/dL)	456,772 \pm 41,38 ^{a*}	338,045 \pm 79,63 ^{b*}	247,272 \pm 100,46 ^{c*}
Lactato (mg/dL)	6,2818 \pm 2,59 ^{a*}	16,3455 \pm 7,17 ^b	25,4227 \pm 11,20 ^{c*}
ATP (μ mol 10 ¹¹ plaq ⁻¹)	1,7268 \pm 0,64 ^{a*}	1,2431 \pm 0,33 ^b	0,9658 \pm 0,32 ^{c*}
CD61 (%)	91,4677 \pm 4,75	93,3850 \pm 4,32	91,8436 \pm 5,69
CD62P (%)	2,7245 \pm 1,50	2,6145 \pm 3,58	2,6386 \pm 2,22
LDH (U/L)	237,9091 \pm 159,07	404,6818 \pm 98,49	630,0 \pm 162,07
Anexina V (%)	2,3618 \pm 2,49	1,5721 \pm 1,12	3,549 \pm 4,21
Caspase (%)	10,1745 \pm 11,45	6,6564 \pm 5,89	12,0295 \pm 13,86
$\Delta\Psi$ m MT Red (%)	82,0486 \pm 10,30 ^{a*}	76,7168 \pm 15,23 ^a	51,1068 \pm 32,45 ^{b*}
MT Green (%)	9,4691 \pm 6,07 ^a	14,4136 \pm 9,31 ^a	34,2309 \pm 32,25 ^b
$\Delta\Psi$ m JC-1 (%)	91,8209 \pm 3,90 ^a	84,2395 \pm 20,48 ^a	55,3773 \pm 37,29 ^b

PQT, número de plaquetas x 10¹⁰/unidade; $\Delta\Psi$ m, potencial de membrana mitocondrial; MT, Mitotracker; ATP, trifosfato de adenina; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam valores significativamente diferentes (p < 0,05).

*Representa valores significativamente diferentes na mesma linha (p < 0,001).

◆ *Volume e Contagem plaquetária*

O volume médio das bolsas foi de $66,5 \pm 3,14$ mL, conforme as recomendações da Anvisa (Anvisa, 2004), que orienta volumes entre 50 e 70 mL. Observou-se um aumento da contagem de plaquetas no dia 3 em relação ao dia 1, com subsequente queda do dia 3 para o dia 5 (Gráfico 1). Entretanto, esta diferença entre os dias de avaliação não foi significativa ($p=0,936$), ou seja, o número de plaquetas manteve-se constante durante os 5 dias de avaliação. Em contraste, alguns estudos relatam queda na concentração das plaquetas durante o armazenamento (Albanyan *et al.*, 2009; Costa, 2011; Johnson *et al.*, 2013).

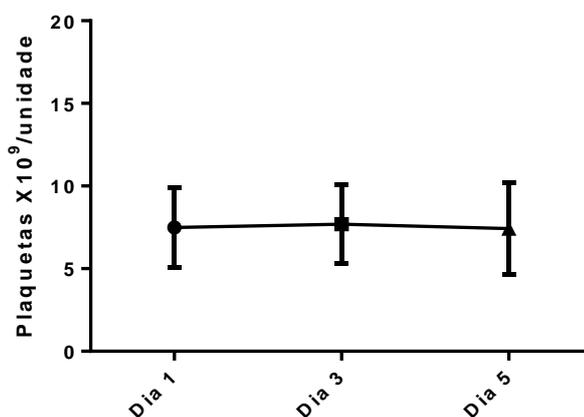


Gráfico 1. Concentração de plaquetas nas unidades de CP canino armazenado por 5 dias.

As características do CP canino são semelhantes ao que foi descrito para CPs humanos, e todas as unidades apresentaram contagem de plaquetas superior o valor mínimo sugerido pela Anvisa e AABB de $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas/unidade. Em um estudo sobre CP canino, os autores utilizaram centrifugações de 1.000 g por 5 minutos e 2.000 g por 10 minutos repectivamente e não obtiveram contagens plaquetárias satisfatórias (Hoareau *et al.*, 2014), provavelmente devido as baixas velocidades utilizadas. Ressalta-se a importância da padronização das centrifugações a fim de atingir a concentração de plaquetas desejada.

A concentração média de plaquetas nas unidades de CP canino foi $7,4882 \pm 2,39 \times 10^{10}$ /unidade no dia 1. Ao dividir os CPs em dois grupos, um com contagem de plaquetas inferior à média ($\leq 7,49 \times 10^{10}$ /unidade, n= 14) e outro com contagem superior ($> 7,49 \times 10^{10}$ /unidade, n= 8) e compará-los observou-se que os CPs com contagem inferior apresentaram parâmetros de qualidade superior ao final do período (Tabela 3). Foi constatado que os valores médios de pH, glicose e ATP diminuem drasticamente no grupo com maior número de plaquetas, enquanto a concentração de lactato acumula de maneira mais severa neste grupo. Também foi evidente a diminuição do $\Delta\Psi_m$ nos CPs com maior número de plaquetas. As bolsas com menor número de plaquetas apresentaram sinais de qualidade até o último dia de armazenamento, com pH $> 6,2$ em todas as unidades, além de maiores níveis de ATP, de glicose e menor quantidade de lactato.

A análise dos índices morfoestruturais PDW e MPV permitiu inferir que as plaquetas mantidas em CPs com menor número apresentam menores índices de *swelling* plaquetário e menor fragmentação. Estudos que avaliaram CPs caninos obtiveram resultados satisfatórios em relação à manutenção do pH $> 6,2$ e outros parâmetros de qualidade no quinto dia; entretanto, as contagens médias de plaquetas por bolsa foram inferiores às observadas neste estudo. Costa *et al.* (2011) obtiveram contagens médias de $5,8 \times 10^{10}$ /plaquetas por unidade de CP canino e pH 6,7 no quinto dia; enquanto Sink (2002) obteve contagens médias de $4,5 \times 10^{10}$ /plaquetas por unidade, sendo que 40% das bolsas analisadas não apresentavam contagem superiores a $5,5 \times 10^{10}$ /plaquetas por unidade, conforme recomendado por agências reguladoras como Anvisa e AABB. A quantidade média de plaquetas por unidade justifica os parâmetros fora do recomendado no último dia de avaliação observados neste estudo.

Plaquetas caninas apresentam meia vida na circulação mais curta comparada à meia vida de plaquetas humanas, o que pode justificar um metabolismo mais acelerado das primeiras (Russell, 2010). Desta forma, o número de plaquetas por bolsa comumente obtido em CPs humanos pode não ser o ideal para bolsas de CPs caninos. Considerando que as plaquetas caninas podem apresentar um metabolismo mais acelerado - ou seja, apresentam consumo de glicose mais rápido e conseqüente maior acúmulo de lactato e queda do pH, além da diminuição do $\Delta\Psi_m$ - pode ser necessário um menor número de plaquetas por mL nas bolsas de CP canino, a fim de suprir as necessidades metabólicas. Com um grande número de plaquetas por mL, o oxigênio é consumido mais rapidamente e a via metabólica utilizada

pelas plaquetas passa a ser a anaeróbica, com produção de lactato e diminuição do pH do meio (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Gulliksson *et al.*, 2012; Davidow, 2013). Moroff *et al.* (1982) afirmam que nos CPs existe uma pequena e específica população de plaquetas que possui uma capacidade extraordinária de produção de lactato e que esta população é responsável pela principal queda de pH durante o estoque. Esta afirmação não foi confirmada por outros autores, mas pode explicar a maior queda que ocorre em alguns CPs independentemente de altas contagens de plaquetas na unidade. Uma limitação desta comparação entre os grupos foi o fato de os dois grupos não apresentarem o mesmo 'n'. Entretanto, as observações são válidas e alertam sobre a necessidade não apenas de padronização, mas também de valores de referência para a avaliação do controle de qualidade de CPs caninos em bancos de sangue veterinários, onde atualmente se usam os parâmetros de agências reguladoras de caráter humano.

Tabela 3. Parâmetros de qualidade em CPs caninos com menor ou maior número de plaquetas por unidade após 5 dias de armazenamento.

	CPs com contagem de plaquetas ($\leq 7,49 \times 10^{10}$ /unidade)	CPs com contagem de plaquetas ($> 7,49 \times 10^{10}$ /unidade)	<i>p</i>
PDW (fL)	14,99 \pm 2,51	18,40 \pm 1,70	0,017
MPV (fL)	12,86 \pm 1,67	15,05 \pm 1,22	0,043
Glicose (mg/dL)	306,85 \pm 18,59	143,00 \pm 61,54	<0,0001
Lactato (mg/dL)	18,80 \pm 6,10	37,00 \pm 8,19	<0,0001
ATP ($\mu\text{mol } 10^{11}\text{plaq}^{-1}$)	1,06 \pm 0,31	0,79 \pm 0,39	<0,0001
pH (22°C)	6,29 \pm 0,56	5,32 \pm 0,49	<0,0001
pO ₂ (mm Hg ⁻¹)	126,59 \pm 16,59	152,87 \pm 25,07	<0,0001
pCO ₂ (mm Hg ⁻¹)	13,29 \pm 5,98	9,12 \pm 7,64	0,043
$\Delta\Psi\text{m JC-1}$ (%)	66,53 \pm 26,18	15,27 \pm 14,69	0,003
LDH (U/L)	442,71 \pm 115,14	957,75 \pm 1093,61	0,022

ATP, trifosfato de adenina; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário; $\Delta\Psi\text{m}$, potencial de membrana mitocondrial. Valores apresentados como média \pm DP.

◆ *Contagem de leucócitos residuais*

Todos os CPs apresentaram leucorredução adequada (leucócitos residuais $< 2,0 \times 10^8$ / unidade), com contagem média de leucócitos (dia 1) de $0,064 \times 10^8$ / unidade, confirmando a qualidade das centrifugações. A contagem manual não deve ser substituída pelo uso do contador de células automático (PocH-100iV Diff, Sysmex), pois este não se mostrou adequado para a contagem de leucócitos residuais já que não detecta níveis baixos de leucócitos, como é esperado no caso de CPs.

◆ *Hematócrito e contagem de eritrócitos*

A média dos hematócritos dos CPs no dia 1 foi de $0,44\% \pm 0,67\%$ com $0,13 \times 10^6$ eritrócitos/ μL ($\pm 0,09$). Nenhum CP ficou visualmente contaminado, ou seja, com aspecto deliberadamente avermelhado, comprovando a eficiência das centrifugações padronizadas. Hoareau *et al.* (2014) obtiveram alta taxa de contaminação com leucócitos na tentativa de avaliar técnicas de obtenção de CPs caninos. Ao utilizar a técnica do PRP os autores observaram contagem média de 200 leucócitos/ μL e de eritrócitos de $0,1 \times 10^6$ / μL , sendo esta última similar ao obtido no presente estudo. Ao comparar duas técnicas de obtenção de CP canino, os autores supracitados observaram diferença significativa na taxa de contaminação (por leucócitos e eritrócitos) das bolsas; sendo que o método do PRP – mesmo utilizado por nós – apresentou qualidade superior comparado ao método do “buffy-coat”.

◆ *Manutenção da esterilidade no 5º dia*

Nenhuma das unidades de CP canino apresentou contaminação bacteriana.

6.3. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PLAQUETÁRIO

◆ *pH (22°C)*

As lesões de armazenamento fazem parte de um processo complexo, influenciado por muitos fatores. Um desses é a diminuição do pH durante o estoque. Tendo em vista que a deterioração do concentrado de plaquetas está relacionada com a acidificação do meio, é importante que seja feita uma avaliação precisa do pH, através de métodos confiáveis (Dekkers *et al.*, 2007). Confirmamos que existe diferença entre os 3 métodos de avaliação de

pH comparados (para resultados e discussão completa consultar ‘Short communication 1’). Diferença significativa foi encontrada entre os métodos da tira de pH e o pHmetro ($p = 0,0194$), e entre a tira de pH e o analisador de gases ($p < 0,0001$), sendo assim recomendada a avaliação do CP com o uso de pHmetro.

Foi observado decréscimo do pH em todas as unidades de CP canino (Gráfico 2). Observou-se diferença significativa nos valores de pH entre os dias 1 e 3 ($p = 0,0074$), 1 e 5 ($p < 0,001$) e entre os dias 3 e 5 ($p = 0,0089$).

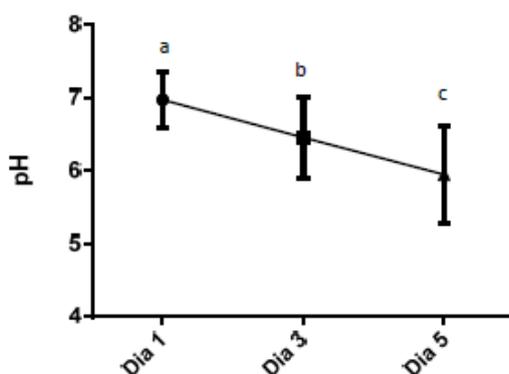


Gráfico 2. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro do pH 22°C (método do pHmetro) dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).

◆ *Pressão parcial de oxigênio e Pressão parcial de dióxido de carbono (37°C)*

A pressão parcial de oxigênio aumentou (Gráfico 3) durante o período de armazenamento com diferença significativa entre os dias 1 e 5 ($p = 0,0011$) e entre os dias 3 e 5 ($p = 0,018$). Inversamente ao observado na análise da pO_2 , a pCO_2 diminuiu durante o estoque (Gráfico 4), com diferença significativa entre os dias 1 e 5 ($p < 0,001$) e entre os dias 1 e 3 ($p < 0,001$) e 3 e 5 ($p = 0,047$). Os resultados obtidos confirmam a possibilidade de troca gasosa - influxo de oxigênio e do efluxo de dióxido de carbono - que de fato ocorreu durante o armazenamento, graças às características das bolsas onde foram armazenados os CPs. A pO_2 é maior no ambiente (160 mmHg) em relação ao interior da bolsa, enquanto a pCO_2 ambiente (0,25

mmHg) é menor que na bolsa. Esta troca gasosa é necessária, pois o oxigênio consumido durante a respiração celular deve ser repostado para que a mesma continue ocorrendo durante o armazenamento e também porque o lactato, um subproduto da glicólise anaeróbica, é reduzido a dióxido de carbono através do bicarbonato. Quando a troca gasosa não ocorre, tanto os níveis de oxigênio quanto de dióxido de carbono diminuem no interior da bolsa. Sem o efluxo de dióxido de carbono, ocorre acúmulo de lactato, resultando em uma queda ainda mais acentuada do pH (Alhumaidan *et al.*, 2011; Gulliksson *et al.*, 2012). O aumento da pO_2 no período final do armazenamento indica falha no metabolismo aeróbico - que deveria atuar no consumo do oxigênio - em detrimento ao metabolismo glicolítico (Gulliksson *et al.*, 2012), fato confirmado pelo acúmulo de lactato e queda do pH.

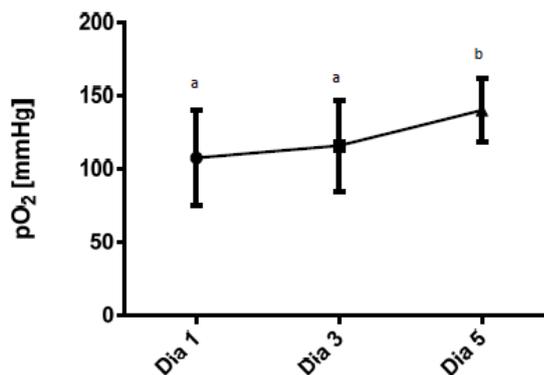


Gráfico 3. Gráfico de regressão linear da determinação *in vitro* da pressão parcial de oxigênio dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).

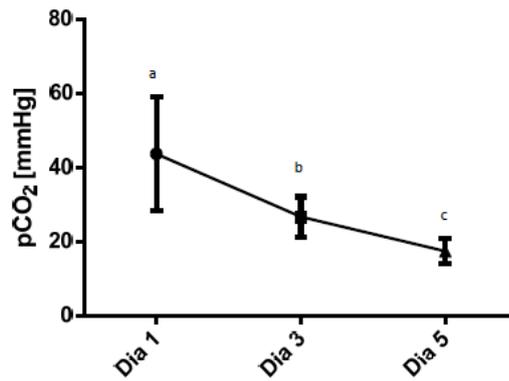


Gráfico 4. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da pressão parcial de dióxido de carbono dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).

◆ *Bicarbonato (37°C)*

Acompanhando a queda de pH e pCO₂, o bicarbonato teve decréscimo gradual (Gráfico 5) e significativo entre os dias 1 e 3 ($p < 0,001$), 1 e 5 ($p < 0,001$) e entre os dias 3 e 5 ($p = 0,040$). A diminuição da concentração de bicarbonato era esperada, visto que é mobilizado para o tamponamento de H⁺ acumulados (Tynngård, 2009).

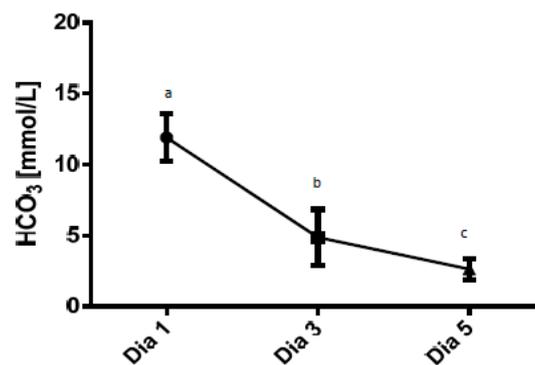


Gráfico 5. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da concentração de bicarbonato dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).

◆ *Dosagem de ATP*

O ATP é necessário para manutenção da integridade das plaquetas, mesmo em repouso, pois mantém o equilíbrio osmótico e a conformação da membrana (Boudreaux e Catalfamo, 2010). Conforme o esperado, a concentração de ATP diminuiu (Gráfico 6) durante o período de estoque ($p < 0,001$). No último dia de avaliação observamos correlação negativa significativa entre a concentração de ATP e a porcentagem de plaquetas em *swelling* mitocondrial ($p = 0,0144$), indicando que o inchaço mitocondrial está relacionado com a perda de capacidade de geração de energia das mitocôndrias durante o armazenamento por mais de 5 dias.

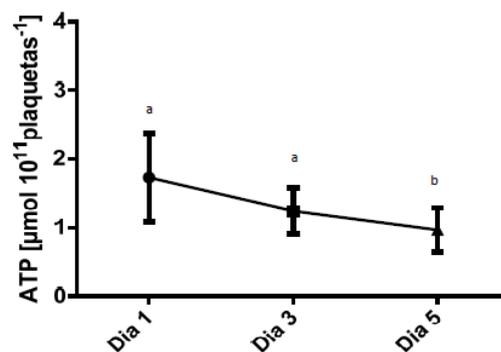


Gráfico 6. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da concentração de ATP dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).

◆ *Glicose e lactato*

Refletindo o consumo através de glicólise anaeróbica, a concentração de glicose diminuiu gradualmente ao longo do período de armazenamento. Houve diferença significativa entre os dias 3 e 5 comparados ao dia 1 e comparados entre si ($p < 0,001$). Inversamente à queda da concentração de glicose, houve o acúmulo de lactato (Gráfico 7), que apresentou diferença significativa entre os dias 1 e 3 ($p = 0,0002$), 1 e 5 ($p < 0,0001$) e entre os dias 3 e 5 ($p = 0,0008$).

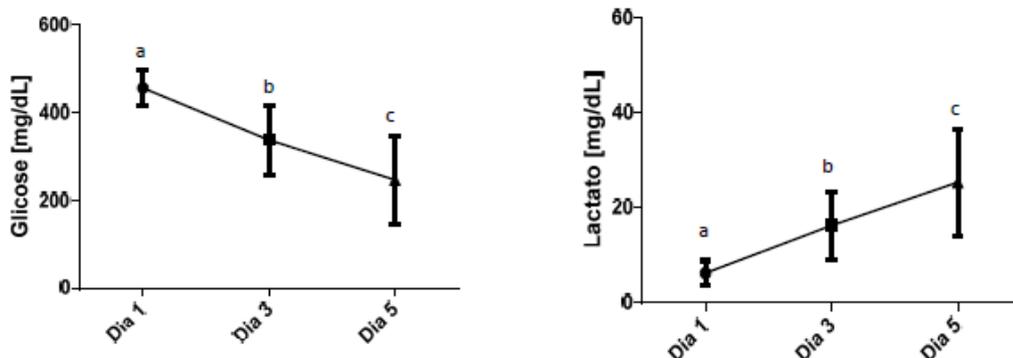


Gráfico 7. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da concentração de glicose e lactato dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).

Conforme discutido anteriormente, o metabolismo da glicose para manutenção do balanço energético continua de maneira ativa durante o armazenamento dos CPs sob temperatura ambiente. Quando ocorre em excesso e leva à exaustão da glicose, as plaquetas apresentam um fenótipo pró-apoptótico (Johnson *et al.*, 2015). A depleção da glicose também está fortemente associada com declínio do ATP, e conseqüentemente com a qualidade das plaquetas armazenadas (Saunders *et al.*, 2013). Estudo que avaliou concentrados de plaquetas caninas relatou variação na concentração de glicose de 456 mg/dL/dia no dia 0 para 388 mg/dL no quinto dia (Costa, 2011). Comparativamente, a média das concentrações de glicose apresentadas aqui foi menor, mas podemos afirmar que a concentração de glicose nos CPs caninos pôde ser mantida em concentrações aceitáveis durante o armazenamento por 5 dias, apesar do maior número de plaquetas por μL observado no presente estudo em relação ao supracitado.

No primeiro dia de armazenamento foi observada correlação negativa (-0,726) entre o pH e a concentração de lactato, que aumentou durante o armazenamento; também foi observada correlação negativa forte entre as concentrações de lactato e glicose nos dias 1 (-0,829), 3 (-0,898) e 5 (-0,927). Esta correlação, entre lactato e pH, está bem documentada em estudo *in vivo* que concluiu que estes dois parâmetros, além de estarem intimamente ligados, são os principais responsáveis pela meia vida limitada das plaquetas pós transfusão (Goodrich *et al.*, 2006).

6.4. MORFOLOGIA PLAQUETÁRIA

◆ *MPV e PDW*

Os índices morfoestruturais PDW e MPV (Gráfico 8) apresentaram diferenças entre os dias de avaliação. Enquanto o PDW aumentou apenas entre os dias 1 e 5 ($p= 0,019$), o MPV apresentou aumento entre os dias 1 e 5 ($p= 0,0014$) e 3 e 5 ($p= 0,0464$).

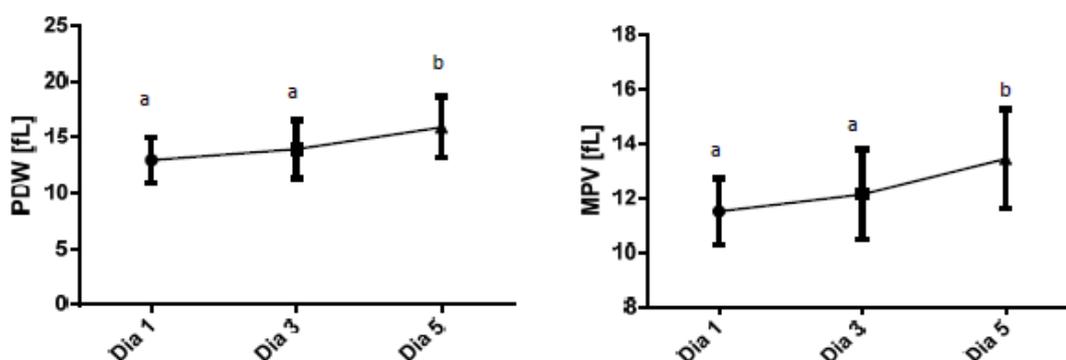


Gráfico 8. Gráfico de regressão linear da determinação in vitro da determinação do PDW e MPV dos concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$).

Enquanto o MPV indica o tamanho médio das plaquetas, o PDW indica a amplitude de variação de tamanho das mesmas, ou seja, anisocitose plaquetária. A avaliação conjunta oferece uma interpretação mais completa que a análise apenas do MPV, pois a presença de plaquetas grandes e pequenas pode resultar em um MPV normal e PDW aumentado, por exemplo.

O aumento dos índices plaquetários apresentou forte correlação negativa com a perda do *swirling* e correlação positiva com o aumento da concentração de lactato nos últimos dias de armazenamento. Conforme ocorre o consumo de glicose a concentração de lactato aumenta, o pH diminui e observa-se decréscimo do *swirling*, ou seja, a perda de forma discoide para esférica, que é refletida por um aumento do MPV, indicando a ocorrência de deterioração celular durante o estoque (Singh, Chaudhary e Ray, 2003). Comprovou-se também a

correlação entre queda do pH e mudanças dos índices morfoestruturais, através da forte correlação negativa entre pH e PDW ($p= 0,00016$) e pH e MPV ($p< 0,0001$) no último dia de avaliação. Enquanto o MPV aumentou indicando a ocorrência de *swelling* plaquetário e perda da forma discoide, o aumento do PDW indicou que houve morte e fragmentação plaquetária durante o estoque, corroborada pela correlação entre aumento do PDW e liberação de LDH. Singh et al. (2003) utilizaram os índices plaquetários como forma de controle de qualidade de CPs e, assim como neste estudo, confirmaram a forte relação entre MPV, PDW e pH.

◆ *Avaliação do swirling plaquetário*

O *swirling* diminuiu em todas as unidades de CP ao longo do tempo (Gráfico 9), apresentando resultado igual a 3+ no dia 1 em todas as bolsas; média de 2,86+ no dia 3 e de 2+ no dia 5. Esta diminuição apresentou significância estatística entre os dias 1 e 5 ($p< 0,001$) e 3 e 5 ($p= 0,0001$). O aspecto heterogêneo (3+) do CP indica maior viabilidade e está relacionado à manutenção da morfologia plaquetária (Bertolini *et al.*, 2000; Mathai *et al.*, 2006; Maurer-Spurej e Chipperfield, 2007). Conforme discutido anteriormente, foi possível verificar forte correlação entre os índices morfoestruturais e a diminuição do *swirling*.

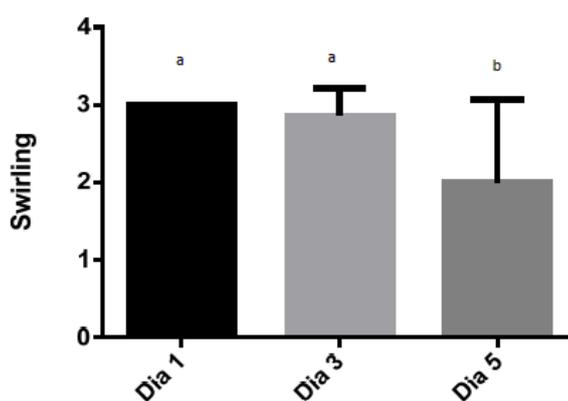


Gráfico 9. Gráfico de barras representando a avaliação do swirling durante o armazenamento de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p<0,05$).

6.5. FUNÇÃO PLAQUETÁRIA

◆ Agregometria

Não foi observada diferença significativa na agregação plaquetária durante os dias de avaliação com o uso de ADP e colágeno (Gráfico 10). A agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico aumentou (Gráfico 11), e apresentou diferença entre os dias 1 e 5 ($p=0,0082$). As médias das porcentagens observadas nos ensaios de agregação estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Agregação plaquetária durante armazenamento por 5 dias.

	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 5</i>
Ácido Araquidônico (%)	8,545 ± 5,32494 ^a	11,86 ± 5,947 ^a	13,64 ± 7,719 ^b
ADP (%)	8,182 ± 5,31517	12,09 ± 7,302	12,41 ± 7,008
Colágeno (%)	9,636 ± 3,78651	12,68 ± 6,043	13,27 ± 7,072

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).
Valores apresentados como média ± DP.

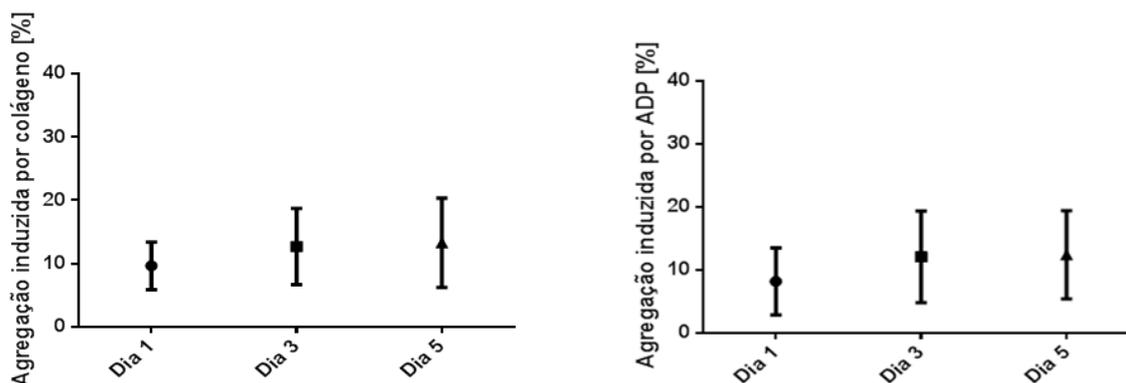


Gráfico 10. Agregação induzida por colágeno e ADP de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.

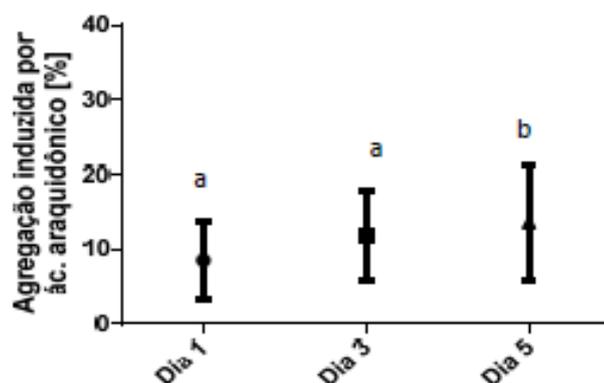


Gráfico 11. Agregação induzida por ácido araquidônico de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.

Juntamente com a contagem de plaquetas e determinação do pH, os ensaios de agregação são comumente utilizados na avaliação de CPs (Horeau *et al.*, 2014). A capacidade das plaquetas responderem aos agonistas é um teste de funcionalidade, e a falta de agregação sugere diminuição da viabilidade. Entretanto, Miyaji *et al.* (2004) demonstraram que plaquetas humanas podem recuperar a capacidade de agregação depois de transfundidas, sugerindo que testes de agregação plaquetária *in vitro* sofrem a desvantagem de não refletirem condições *in vivo*. Apesar disso, agregação plaquetária ainda é considerada padrão-ouro da análise de funcionalidade plaquetária (Hoareau *et al.*, 2014). Uma possível explicação para a falta de concordância de resultados *in vitro* e *in vivo* pode ser o fato de que no agregômetro a agregação ocorre sob condições não laminares e de baixo fluxo, não considerando a importância do fluxo sanguíneo na adesão plaquetária (Jackson, 2007).

A despeito da diminuição gradativa do pH observada nos CPs aqui analisados, esta não apresentou correlação com os valores observados na agregometria, ou seja, as alterações do pH provavelmente não estão associadas com a função plaquetária *in vitro*. Poucos estudos foram conduzidos com CPs caninos, e, apesar dos baixos percentuais de agregação observados, comumente a capacidade de agregação diminui ou não apresenta diferença significativa entre os dias analisados (Klein, Adamik e Mischke, 1999; Costa, 2011; Hoareau *et al.*, 2014). Em nosso experimento observamos o aumento da capacidade de agregação com o uso do agonista ácido araquidônico, nunca utilizado para avaliar funcionalidade de

plaquetas caninas. Ghezelbash *et al.* (2015) também observaram aumento na porcentagem de agregação entre os dias 3 e 5 ao utilizarem ácido araquidônico como agonista na avaliação de CPs (humanas). Hoareau *et al.* (2014) obtiveram baixos valores de agregação ao analisarem CPs caninos, independentemente do momento da análise. Os autores discutem a possibilidade da influência negativa da contaminação com leucócitos e da influência positiva sobre a agregação por parte dos eritrócitos. Não observamos correlação significativa entre a capacidade de agregação e o número de leucócitos ou eritrócitos nas bolsas, entretanto, apresentamos valores de leucócitos muito inferiores àqueles apresentados por Hoareau *et al.* (2014). Finalmente, a variabilidade nos resultados da agregometria pode ser atribuída à ocorrência de variabilidade interindividual.

6.6. GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA

◆ *Expressão de CD61*

A porcentagem de plaquetas marcadas pelo anticorpo monoclonal CD61 foi mantida durante o estoque, sempre superior a 90%. Segundo Wilkerson e Shuman (2001), este seria um indicativo de que não houve a formação de micropartículas (entretanto foi observado aumento no PDW durante o estoque), ou que não houve internalização da glicoproteína por endocitose, sendo este o motivo mais provável para a manutenção de plaquetas marcadas para CD61 (Wilkerson e Shuman, 2001).

◆ *Expressão de CD62P*

Durante o processamento das bolsas ocorre certo grau de ativação plaquetária, responsável por muitas alterações na estrutura e no metabolismo, como a pseudopodia e mudanças dos receptores de superfície. A expressão de CD62P na superfície plaquetária é considerada um indicador de degranulação e secreção por parte das plaquetas, ou seja, ativação plaquetária (Wagner *et al.*, 2002; Albanyan, Harrison e Murphy, 2009; Albanyan *et al.*, 2009). A porcentagem de plaquetas positivas para CD62P não apresentou mudanças ao longo do tempo (Gráfico 12). A literatura mostra resultados conflitantes, onde alguns autores relatam aumento na porcentagem de plaquetas expressando CD62P (Albanyan, Harrison e Murphy, 2009) e

outros não (Johnson *et al.*, 2013; Ghezelbash *et al.*, 2015). Em estudo que propôs elucidar a diferença entre ativação e apoptose foi observado grande aumento de CD62P até o segundo dia, com posterior estabilização até o quinto dia. Ao avaliar a ativação por período prolongado, foi observado grande aumento entre o sexto e o 12º dia (Leytin *et al.*, 2008). Isto sugere que neste estudo a ativação plaquetária não foi avaliada por tempo suficiente até ser detectada.

A ativação plaquetária está relacionada com mudanças morfológicas (Singh, Chaudhary e Ray, 2003; Boudreaux e Catalfamo, 2010), e foi observada uma moderada correlação ($p < 0,05$) entre ativação plaquetária e PDW (0,640) e MPV (0,577) no dia 3, entretanto, como não houve variação da expressão de P-selectina nas amostras avaliadas esta pode ser uma correlação espúria.

Baixos índices de ativação foram observados neste estudo ($2,72 \pm 1,50\%$ no dia 1), assim como relatado por Ridyard *et al.* (2010), que avaliaram o papel da ativação plaquetária em cães com anemia hemolítica imunomediada. Plaquetas caninas em sangue total e sem estímulo de ativação também apresentaram porcentagens baixas de expressão de CD62P ($0,34 \pm 0,1\%$) (Wills, Wardrop e Meyers, 2006), pois apesar da grande similaridade entre as moléculas humana e canina, a ligação do anticorpo em plaquetas caninas ativadas é cerca de 100 vezes menor (Yeo *et al.*, 1993).

A expressão de CD62P não foi descrita em CP canino, e trabalhos conduzidos com CP humano comumente utilizam a metodologia do ‘buffy-coat’ ou aférese para obtenção do CP. Metodologias como o sistema de aférese, ou mesmo o uso de soluções aditivas ou a leucorredução podem influenciar na ativação de plaquetas estocadas (Wagner *et al.*, 2002; Albanyan *et al.*, 2009; Ahmed, Leheta e Younes, 2010), justificando nossos achados. Ghezelbash *et al.* (2015), que também utilizaram a metodologia do PRP para obtenção de CP humanos não observaram diferença significativa na expressão de CD62P em plaquetas estocadas por 5 dias. Apesar de apresentar-se levemente superior no dia 1 de avaliação (Figura 24), este aumento não foi expressivo. Este leve aumento na expressão de P-selectina no dia 1 pode ter ocorrido devido ao processamento das bolsas, quando as plaquetas passaram por 2 processos de centrifugação, sendo a segunda bem forte. Corroborando nossos achados, trabalhos conduzidos por Wang *et al.* (1999) e posteriormente por Wagner *et al.* (2002) concluíram que, com exceção de uma ativação ‘basal’, que ocorre provavelmente devido ao

manuseio das bolsas durante o processamento para obtenção do CP, as plaquetas se mantêm estáveis, com poucos sinais de ativação, por 5 dias, principalmente se comparadas àquelas armazenadas com soluções aditivas (Wagner *et al.*, 2002).

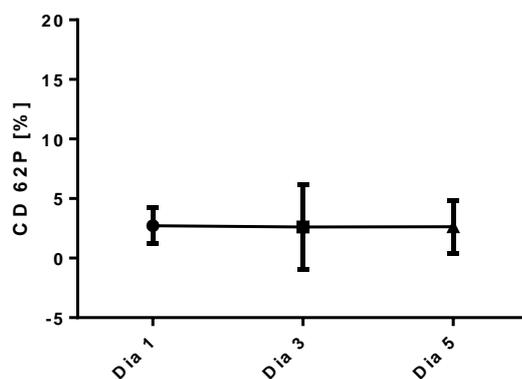


Gráfico 12. Expressão de CD62P na superfície plaquetária de concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.

Alguns estudos mostram uma correlação negativa entre o nível ativação plaquetária e a viabilidade plaquetária pós-transfusional, sugerindo que a expressão de CD62P seria responsável pela retirada das plaquetas da circulação (Rinder *et al.*, 1991; Gutensohn *et al.*, 2002; Leytin *et al.*, 2004; Perseghin *et al.*, 2004). Por outro lado, pesquisas posteriores não confirmam a teoria (Slichter *et al.*, 2006; Albanyan, Harrison e Murphy, 2009; Albanyan *et al.*, 2009). A inconsistência dos resultados de diferentes grupos de pesquisa pode ser devido às diferentes condições de processamento, como mencionado anteriormente, ou mesmo à falta de padronização da técnica, que pode variar em relação à preparação da amostra e calibração do citômetro (Holme *et al.*, 1997; Dumont *et al.*, 2002; Albanyan, Harrison e Murphy, 2009). Embora a questão prática e aplicável da ativação plaquetária nos CPs ainda não esteja clara, a expressão de CD62P na superfície plaquetária permanece sendo o marcador de ativação mais significativo e mais utilizado até o momento (Wills, Wardrop e Meyers, 2006; Curvers *et al.*, 2008).

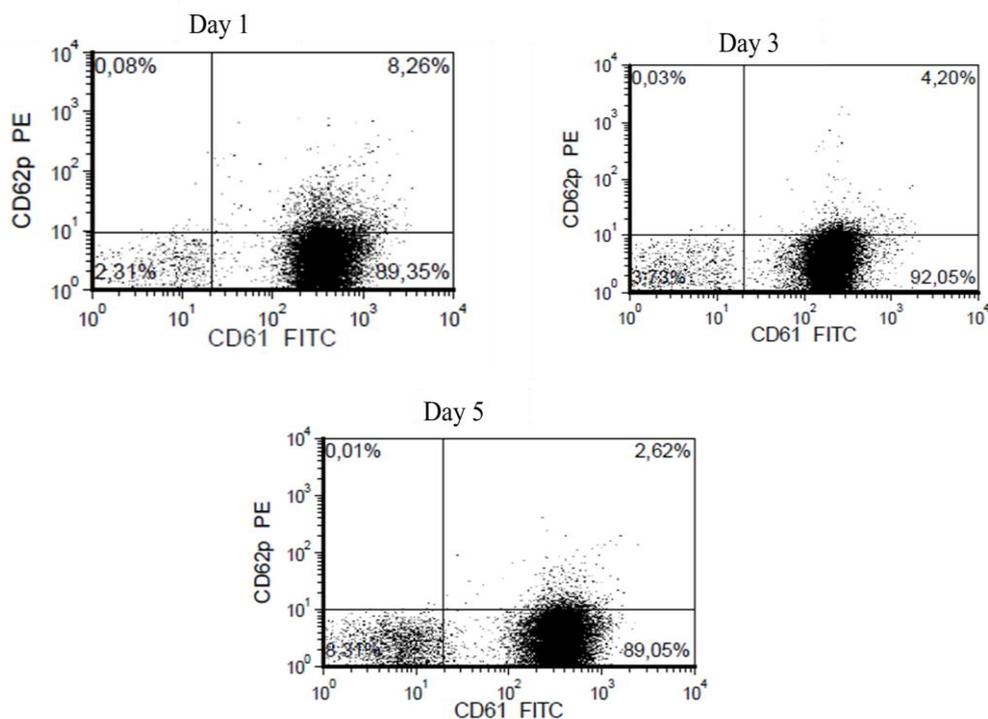


Figura 24. Gráficos mostrando a porcentagem de marcação para CD61 e CD62P ao longo do período de estoque.

No quadrante superior direito observa-se a porcentagem de marcação para CD62P e CD61 (marcação dupla indicando as plaquetas ativadas) e no quadrante inferior direito a porcentagem de CD61 (plaquetas não ativadas).

O quadrante inferior esquerdo indica debris celulares e micropartículas plaquetárias não marcadas.

6.7. MARCADORES DE APOPTOSE E NECROSE CELULAR

◆ *Anexina V*

Não houve mudança na porcentagem de células com exposição de fosfatidilserina ($p=0,83$) (Gráfico 13). Dasgupta *et al.* (2010) observaram associação entre exposição de fosfatidilserina e liberação de citocromo c apenas após 5 dias de armazenamento do CP. Os autores afirmam que a liberação de citocromo c com subsequente ativação das caspases mediada pela exposição de PS é distinta da ativação plaquetária mediada pela exposição de PS. Sugerem ainda, que a exposição de PS em plaquetas estocadas reflete a elaboração de vias apoptóticas mitocondriais, e não a capacidade pró-coagulante das

plaquetas. Os autores concluem que estratégias que impeçam a exposição da PS podem ser úteis na qualidade das plaquetas após transfusão (Dasgupta *et al.*, 2010).

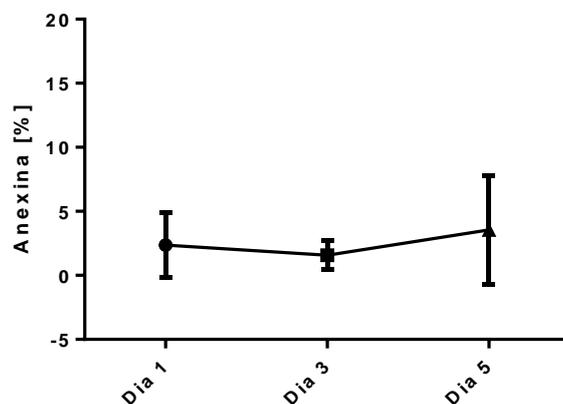


Gráfico 13. Exposição de PS de acordo com ligação a Anexina V em concentrados de plaquetas, estocados por 5 dias.

Leytin *et al.* (2008) descreveram aumento da ativação plaquetária – as plaquetas são mais resistentes à apoptose do que à ativação – durante o estoque. Os autores concluem que a ativação e a apoptose são fenômenos distintos, que ocorrem sequencialmente (e não paralelamente) e induzidos por mecanismos diferentes ou com diferente intensidade; e sugerem que a ativação plaquetária exerce papel mais importante nas lesões de armazenamento em relação a apoptose. De acordo com Mutlu *et al.* (2013), a membrana plaquetária apresenta-se de 4 formas distintas: exposição de PS apenas; exposição de CD62P apenas; exposição de PS e CD62P; sem exposição de PS ou CD62P; corroborando afirmações anteriores de que são processos distintos. Não observamos correlação entre exposição de CD62P e exposição de fosfatidilserina, e de acordo com Brown *et al.* (2000), a P-selectina tem um papel inexpressivo na fagocitose e retirada de plaquetas da circulação.

Wills *et al.* (2006) padronizaram técnicas de avaliação de marcadores de ativação em sangue total canino e apesar de obterem resultados expressivos em relação à exposição de PS após estímulo, os autores observaram grande variabilidade nos resultados, indicando que o uso clínico da Anexina V pode ser difícil.

◆ *Caspase*

Embora as plaquetas não possam apresentar a via clássica de apoptose, pois não possuem núcleo, sabe-se que as mesmas sofrem mudanças que sinalizam apoptose *in vivo* e também durante o armazenamento. Existem evidências que atestam a ocorrência do processo de apoptose em plaquetas, que apresentam características como a exposição de PS e ativação da caspase 3 (Li *et al.*, 2000; Verhoeven *et al.*, 2005). Sendo assim, o efeito do armazenamento sobre a apoptose plaquetária foi determinado através da avaliação da presença de caspase ativa no interior das plaquetas e exposição de PS na membrana (através da ligação com Anexina V).

Ao avaliar o efeito da estaurosporina sobre as plaquetas foi observado que o agente é capaz de induzir o processo de apoptose em plaquetas, as quais apresentam caspase na forma ativa neste processo (Gráfico 14). Ao contrário do relato de Cookson *et al.* (2010), não observamos aumento da porcentagem de plaquetas com caspase ativa (Gráfico 15) durante o período avaliado ($p= 0,261$). Estudo conduzido por Leytin *et al.* (2008) observou que é necessário armazenamento por períodos de 13 a 16 dias para a manifestação de apoptose através da caspase ativa (Leytin *et al.*, 2008). Corroborando estes achados, outro estudo, que avaliou a ativação de 6 pró-caspases em plaquetas estocadas, concluiu que durante o armazenamento as caspases são apenas ligeiramente ativadas e ainda, apenas após longo armazenamento. Durante 11 dias, os autores observaram as mudanças comumente descritas, como diminuição do pH e pCO_2 , aumento do lactato, pO_2 e liberação de LDH, mas apenas um limitado aumento da caspase, que levou os autores a conclusão de que a ativação da caspase é um evento tardio e não está relacionado com as PSL. Por outro lado, a expressão do receptor DcR2 aumentou progressivamente durante o armazenamento, sugerindo que este pode ser utilizado como um novo marcador de envelhecimento plaquetário (Plenchette *et al.*, 2001). Apesar de não termos observado aumento significativo de plaquetas marcadas para caspase ativa, houve correlação negativa ($p < 0,05$) entre

marcação para caspase e parâmetros de má qualidade do CP, como diminuição do *swirling*, do pH e da concentração de glicose. A diminuição do $\Delta\Psi_m$ e a presença de *swelling* mitocondrial caracterizam dano à organela e geralmente acarretam em morte celular (Agnello, Morici e Rinaldi, 2008), conforme sugere a correlação ($p < 0,05$) observada entre estes parâmetros e plaquetas com caspase ativa. Entretanto, estas podem ser correlações espúrias já que não foi observada diferença na quantidade de células marcadas com caspase ativa.

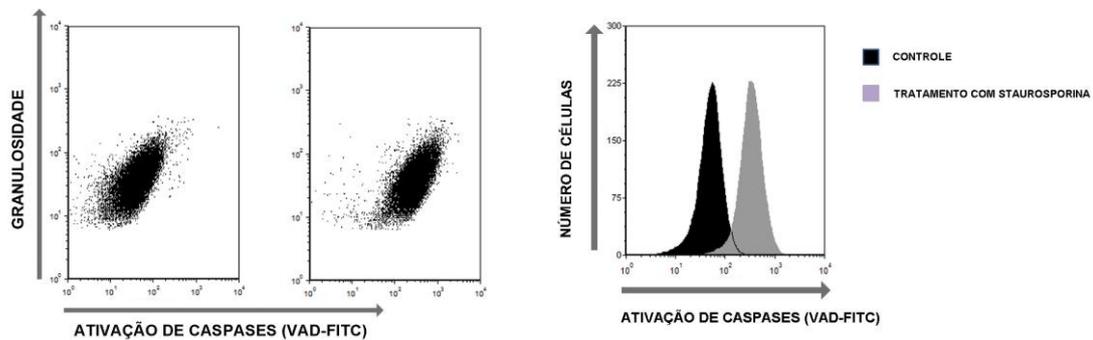


Gráfico 14. Apoptose plaquetária induzida por estaurosporina. Observa-se deslocamento das plaquetas com caspase ativa.

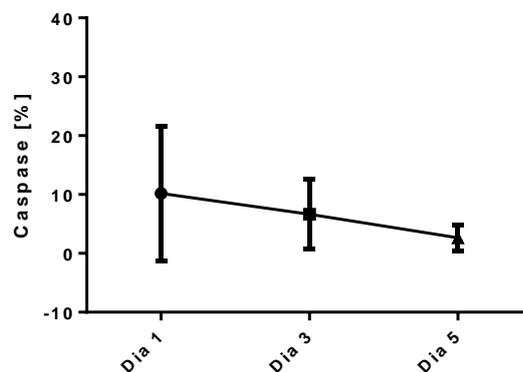


Gráfico 15. Plaquetas com marcação para caspase ativa durante 5 dias de armazenamento.

◆ *Lactato Desidrogenase*

A liberação da enzima citoplasmática LDH indica a presença de dano à membrana e é utilizada como indicativo de apoptose (quando levemente aumentada) e necrose/lise plaquetária (quando acentuadamente aumentada) (Casoli *et al.*, 2008). Conforme o esperado (Bertino *et al.*, 2003; Amorini *et al.*, 2007; Shrivastava *et al.*, 2011; Mirshafiee *et al.*, 2015), a concentração de LDH aumentou ao longo dos 5 dias de armazenamento, entretanto não foi observada relevância estatística neste aumento ($p= 0,051$), provavelmente porque a variação em cada dia de análise na mesma amostra apresentou grande variabilidade, comprometendo a análise. Com um maior número de amostras talvez fosse possível identificar uma diferença estatística na atividade da enzima durante o armazenamento. Alguns estudos relatam aumento significativo da atividade da enzima a partir do sexto dia de armazenamento, ou através métodos diferentes do utilizado neste estudo, o que pode explicar a falta de significância observada aqui (Amorini *et al.*, 2007; Gulliksson *et al.*, 2012; Hoareau *et al.*, 2014). Mirshafiee *et al.* (2015) relataram que irradiações UV causaram deterioração da atividade mitocondrial associada com a liberação de LDH. Neste estudo foi possível observar forte correlação negativa entre liberação de LDH e $\Delta\Psi_m$; e correlação positiva entre liberação de LDH, *swelling* mitocondrial e ativação da via das caspases durante o armazenamento.

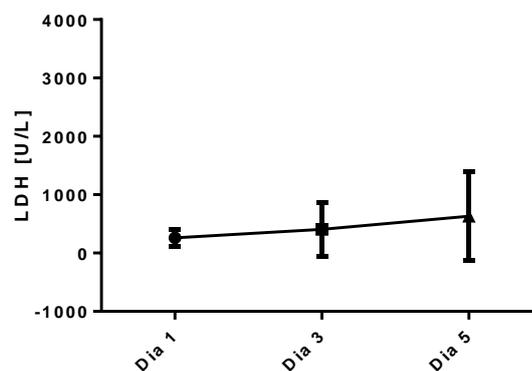


Gráfico 16. Liberação de LDH de concentrados de plaquetas armazenados por 5 dias.

6.8. LESÃO MITOCONDRIAL

♦ *Mitotracker*

O MitoTracker Red (MTR) é um marcador similar ao JC-1, cujo acúmulo na mitocôndria depende do $\Delta\Psi_m$. Sendo assim, observamos clara correlação entre os resultados de ambos marcadores; ou seja, houve queda significativa entre os dias 1 e 5 ($p < 0,0001$) e 3 e 5 ($p = 0,0006$). O marcador MitoTracker Red nunca foi descrito para avaliação de plaquetas caninas, mas mostrou-se um excelente marcador, com boa correlação ($p < 0,05$) com parâmetros de suma importância como *swirling* (0,822), lactato (-0,735), glicose (0,723) e pH (0,695). Este foi considerado tão fidedigno quanto o clássico JC-1, considerado padrão-ouro, cuja correlação foi de 0,797 ($p < 0,0001$).

Juntamente ao MTR, utilizamos a sonda MitoTracker Green (MTG), um indicador de *swelling* (inchaço, tradução livre) mitocondrial. Quando as plaquetas começam a entrar em apoptose é observado um aumento na marcação verde (massa mitocondrial), devido o *swelling* mitocondrial (Agnello, Morici e Rinaldi, 2008); de forma que observamos ao longo do tempo um deslocamento da população marcada em vermelho para o verde (Figura 25). Este aumento na marcação ocorreu principalmente entre os dias 3 e 5 ($p = 0,004$). MTG apresentou correlação significativa com indicadores de viabilidade plaquetária, como diminuição do *swirling*, aumento da liberação de LDH, diminuição da concentração de glicose, aumento de lactato, diminuição do pH, do ATP e aumento da caspase. Ou seja, como passar do tempo e diminuição da qualidade plaquetária há diminuição da glicose devido o consumo, aumento da geração de lactato e conseqüente queda do pH e *swirling*; despolarização da membrana mitocondrial ao mesmo tempo em que ocorre *swelling* (Gráfico 17), que cursa com diminuição da produção de ATP e culmina com o início do processo de apoptose, que neste estudo não foi confirmado pela mensuração de caspase ativa, provavelmente por este ser um evento tardio, portanto não houve tempo hábil para a observação.

Diferentemente do MitoTracker Red, o MitoTracker Green é independente do $\Delta\Psi_m$, de maneira que a utilização de ambos oferece uma análise mais completa de funcionalidade e

massa mitocondrial. Neste estudo, foi possível comprovar que esses reagentes são bons marcadores e podem ser utilizados na avaliação de concentrados de plaquetas.

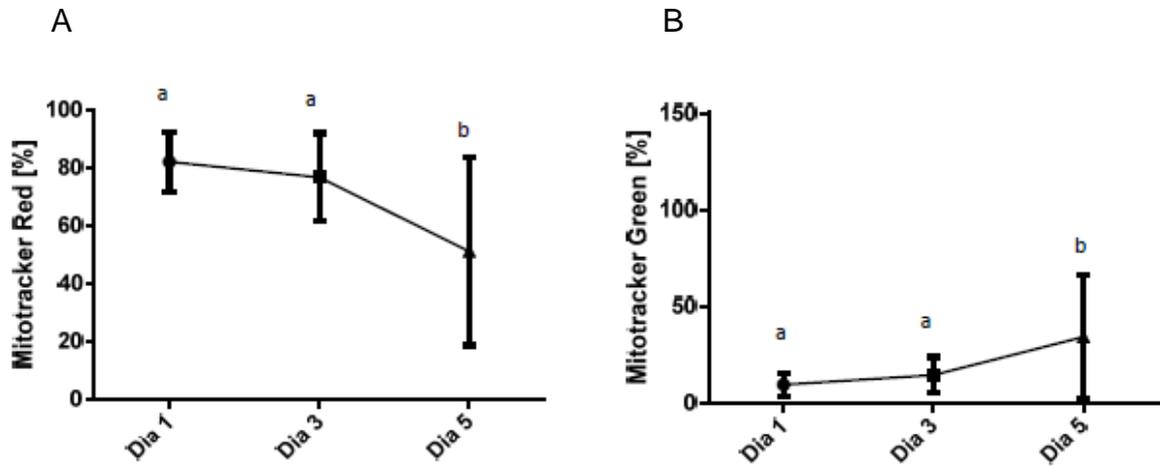


Gráfico 17. Técnica de sondas MitoTracker para avaliação da viabilidade mitocondrial em concentrados de plaquetas armazenados por 5 dias (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). Observar redução do $\Delta\Psi_m$ ao longo do tempo (A) e aumento do *swelling* mitocondrial (B).

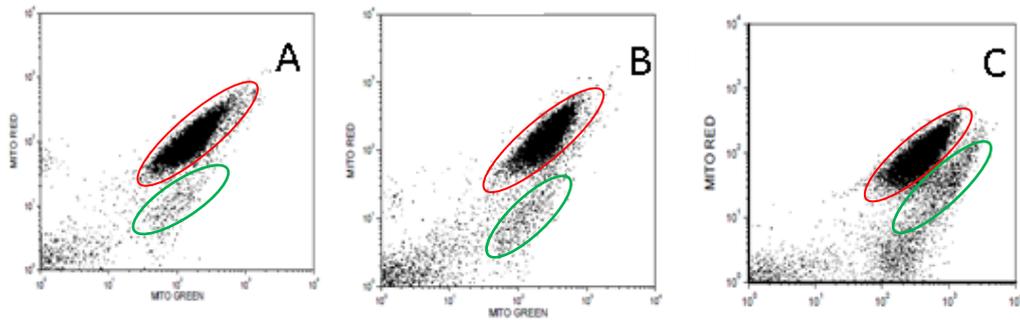


Figura 25. Diminuição do $\Delta\Psi_m$ e aumento do *swelling* durante o armazenamento de concentrado de plaquetas armazenado por 5 dias. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 5.

◆ *JC-1*

Para a padronização do método foi necessário testar diferentes concentrações do reagente a fim de encontrar uma concentração eficaz e não tóxica às plaquetas, para que pudessem ser

marcadas de maneira eficaz (dados não mostrados). A concentração escolhida está descrita na sessão ‘materiais e métodos’ e foi considerada a ideal para o experimento.

De acordo com a análise do $\Delta\Psi_m$ pelo JC-1, houve um aumento da despolarização das mitocôndrias (Figura 26) durante o armazenamento das plaquetas a 22°C por 5 dias ($p=0,0019$). Alguns autores sugerem que a perda do $\Delta\Psi_m$ é o marcador mais sensível de qualidade plaquetária durante o estoque, pois sinaliza o começo do processo de apoptose, antes mesmo da ativação da via das caspases ou da exposição da fosfatidilserina (Verhoeven *et al.*, 2005; Leaver *et al.*, 2006; Albanyan *et al.*, 2009), sendo que esta última ocorre independentemente da diminuição do $\Delta\Psi_m$ em plaquetas de humanos e cobaias (Rand, Leung e Packham, 2003; Jobe *et al.*, 2008). Do primeiro ao terceiro dia de armazenamento o $\Delta\Psi_m$ mostrou-se estável ($p=0,5072$); observamos queda no $\Delta\Psi_m$ entre os dias 1 e 5 ($p=0,0016$) e 3 e 5 ($p=0,0373$). De acordo com Perrotta *et al.* (2003), as plaquetas são capazes de manter o $\Delta\Psi_m$ a despeito dos efeitos adversos associados com as lesões de armazenamento. Verhoeven *et al.* (2005) afirmam que a diminuição do $\Delta\Psi_m$ ocorre nos últimos dias de armazenamento, ou em plaquetas armazenadas por períodos maiores de 5 dias. Além de diferenças interespecies, o método de obtenção do CP pode influenciar os resultados (Perrotta *et al.*, 2003; Verhoeven *et al.*, 2005).

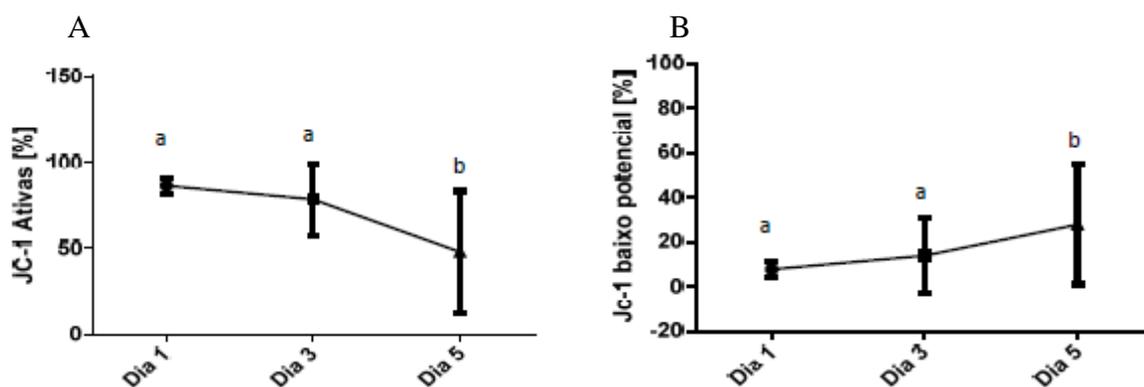


Gráfico 18. Avaliação do $\Delta\Psi_m$ em concentrados de plaquetas armazenados por 5 dias com JC-1 (letras minúsculas diferentes indicam $p < 0,05$). Observar redução da marcação de JC-1 agregados (FL2, JC-1 ativas) (A) e aumento da marcação para JC-1 monômeros (FL1, JC-1 baixo potencial) (B) ao longo do tempo.

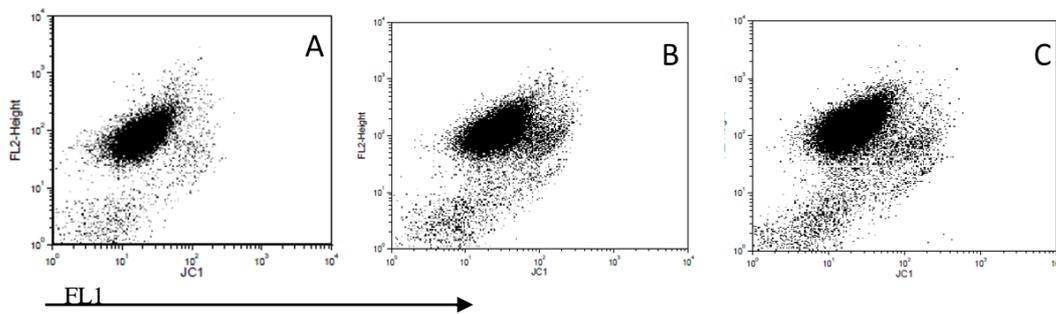


Figura 26. Diminuição do $\Delta\Psi_m$ durante o armazenamento caracterizada pelo deslocamento da população analisada para FL1. Observar o aumento de debris celulares na região a esquerda do 10^1 , indicando a presença de possíveis micropartículas plaquetárias. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 5.

A diminuição ou perda do $\Delta\Psi_m$ reduz a síntese de ATP e também promove a formação de poros na membrana e há liberação de citocromo c para o citoplasma, onde formará o apoptossomo junto à Apaf-1 e caspase-9, culminando na ativação da caspase 3 (Wolf *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2001; Hoffmeister, 2012). Em humanos, o papel do citocromo c no processo de apoptose plaquetária ficou mais claro após o relato de uma família com mutação no citocromo c que apresentou trombocitopenia como única anormalidade fenotípica, comprovando o papel crucial do citocromo C na apoptose plaquetária. O fenótipo familiar também sugere que o citocromo c não é essencial para a maioria dos processos apoptóticos que ocorrem nos seres humanos (Morison *et al.*, 2008). A diminuição do $\Delta\Psi_m$ é um dos mecanismos de ativação da via das caspases, no entanto, não foi observada correlação significativa entre as duas variáveis, provavelmente em decorrência da ordem cronológica em que acontecem os eventos, sendo a perda do $\Delta\Psi_m$ anterior à ativação das caspases (Verhoeven *et al.*, 2005; Dasgupta *et al.*, 2010), e nossos resultados expressam as alterações dos primeiros 5 dias de armazenamento. Assim como Perrotta *et al.* (2003), não foi observada correlação entre a diminuição do ATP e a perda do $\Delta\Psi_m$. Uma possível explicação seria que as plaquetas possuem baixo requerimento energético, e que níveis baixos de ATP não contribuem para a diminuição do $\Delta\Psi_m$.

Tabela 5, 6, 7. Correlações de Pearson nos 3 dias de avaliação.

DIA 01				
	Glicose	Lactato	LDH	pH
Lactato (mg/dL)	-0,829**	-	0,6428*	-0,726*
pH (22°C)	0,553*	-0,726*	-0,28315	-
Núm. Plaquetas (x 10 ¹⁰ /un)	-0,710**	0,840**	0,699*	-0,52755*

*Representa valores significativamente diferentes (p< 0,05).

**Representa valores significativamente diferentes (p< 0,001).

Dia 03										
	PQT	Glicose (mg/dL)	Lactato (mg/dL)	pH (22°C)	LDH (U/L)	Cd62p (%)	$\Delta\Psi_m$ JC-1 (%)	$\Delta\Psi_m$ MTR (%)	Sweeling MTG (%)	Caspase ativa (%)
Swirling	-0,610*	0,706*	-0,808**	0,732*	-0,744**	-0,679*	-0,645**	0,530*	-0,523*	-0,535*
Glicose (mg/dL)	-0,852*	-	-0,898**	0,937**	-0,755**	-0,726*	-0,726*	0,632*	-0,815**	-0,343
Lactato (mg/dL)	0,908**	-0,898**	-	-0,867**	0,855**	0,799**	-0,716*	-0,638*	0,762**	0,454*
pH (22°C)	-0,793**	0,937**	-0,867**	-	-0,688*	-0,643*	0,507*	0,476*	-0,730*	-0,272
PDW (fl)	0,606*	-0,787*	0,644*	-0,757*	0,469*	0,640*	-0,213	-0,133	0,610*	-0,10
MPV (fl)	0,474*	-0,683*	0,518*	-0,757*	0,294	0,577*	-0,070	-0,004	0,529	-0,087
PQT	-	-0,852**	0,908**	-0,793**	0,854*	0,750**	-0,694*	-0,699*	0,858**	0,33
LDH (U/L)	0,854**	-0,755**	0,855**	-0,688*	-	0,873**	-0,874**	-0,782**	0,765**	0,474*
CD62p (%)	0,750**	-0,726*	0,799**	-0,643*	0,873**	-	-0,679**	-0,787**	0,758**	0,470*
Caspase (%)	0,33	-0,343	0,454*	-0,272	0,474*	0,470*	-0,562*	-0,577*	0,449*	-

PQT, número de plaquetas x 10¹⁰/unidade; $\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial; ATP, trifosfato de adenina; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário.

*Representa valores significativamente diferentes (p< 0,05).

**Representa valores significativamente diferentes (p< 0,001).

Dia 05							
	Glicose	Lactato	pH	LDH	$\Delta\Psi_m$ JC-1 (%)	$\Delta\Psi_m$ MTR (%)	Swelling MTG (%)
Swirling	0,828**	-0,813**	0,803**	-0,44*	0,797**	0,822**	-0,856**
Glicose (mg/dL)	-	-0,927**	0,936**	-0,465*	0,911**	0,731**	-0,798**
Lactato (mg/dL)	-0,927**	-	-0,871**	0,332	-0,846**	-0,696**	0,756**
pH (22°C)	0,936**	-0,871**	-	-0,640*	0,894**	0,743**	-0,816**
PDW (fl)	-0,758*	0,726*	-0,823*	0,429	-0,669*	-0,522*	0,60*
MPV (fl)	-0,801*	0,733*	-0,883**	0,519*	-0,669*	-0,547*	0,610*
PQT	-0,668*	0,760**	-0,593*	0,149	-0,579*	-0,639*	0,555*
LDH (U/L)	-0,44*	0,332	-0,640*	-	-0,561*	-0,512*	0,640*
ATP (μmol 10^{11}plaq^{-1})	0,332	-0,334	0,227	-0,252	0,269	0,388	-0,513*
CD62P (%)	-0,426*	0,517*	-0,128*	0,405	-0,436*	-0,285	0,331
Caspase (%)	-0,479*	0,500*	-0,369	0,169	-0,549*	-0,274	0,424*

PQT, número de plaquetas $\times 10^{10}$ /unidade; ψ , potencial de membrana mitocondrial; ATP, trifosfato de adenina; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário.

*Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

**Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,001$).

7. ARTIGOS

A discussão dos resultados encontrados será apresentada através de um artigo científico e duas ‘*short communications*’.

ARTIGO 1 - METABOLISMO DE PLAQUETAS CANINAS ESTOCADAS COMO CONCENTRADO DE PLAQUETAS POR CINCO DIAS

Camila Serina Lasta, Nicole Hlavac, Magnus Larruscain Dalmolin, Sílvia Rezende Terra, Natália Aydos Marcondes, Luciana de Almeida Lacerda, Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, Félix H.D. González.

‘SHORT COMMUNICATION’ 1 - COMPARAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE pH EM CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO

Camila Serina Lasta, Carolina Hating, Nicole Capachi Hlavac, Magnus Larruscain Dalmolin, Luciana de Almeida Lacerda, Félix H.D. González.

‘SHORT COMMUNICATION’ 2 – ANÁLISE DA VIABILIDADE MITOCONDRIAL EM CONCENTRADOS DE PLAQUETAS: MODELO CANINO

Camila Serina Lasta, Nicole Hlavac, Natália Marcondes, Sílvia Rezende Terra, Magnus Larruscain Dalmolin, Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber; Félix H.D. González.

ARTIGO

METABOLISMO DE PLAQUETAS CANINAS ESTOCADAS COMO CONCENTRADO DE PLAQUETAS POR CINCO DIAS

(BMC Veterinary Research, Qualis B1, Fator de Impacto 2,815)

Camila Serina Lasta¹, Nicole Hlavac¹, Magnus Larruscain Dalmolin², Sílvia Rezende Terra³, Natália Aydos Marcondes⁴, Luciana de Almeida Lacerda², Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber⁵, Félix H.D. González¹.

¹Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

²Blut's Centro de Diagnóstico e Serviços Veterinários, Porto Alegre, Brasil.

³Laboratório de Patologia Clínica, Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

* Correspondence: camilaslata@gmail.com

ABSTRACT

Background: A hemoterapia veterinária tem evoluído muito nos últimos anos e são escassas as pesquisas com alvo no concentrado de plaquetas (CP) canino. Neste estudo, foram padronizadas técnicas de agregação plaquetária, bioquímica celular e citometria de fluxo durante o armazenamento de plaquetas caninas, reportando as mudanças ocorridas. Para tal, foram utilizadas 22 bolsas de CP canino, avaliadas nos dias 1, 3 e 5 após a coleta. Resultados: Houve diminuição significativa da concentração de glicose, pCO₂, ATP, pH e *swirling*; aumento da concentração de lactato e da pO₂; poucos sinais de ativação plaquetária; e diminuição do potencial de membrana mitocondrial no final do período estudado. Não foram observadas mudanças nos testes de ativação (P-selectina), exposição de fosfatidilserina e caspase ativa. Todas as bolsas apresentaram-se negativas quanto ao isolamento de micro-

organismos. Conclusões: De maneira geral, as plaquetas caninas sob condição padrão de armazenamento em banco de sangue apresentam comportamento similar àquele observado em plaquetas humanas. As técnicas nunca antes utilizadas na avaliação de plaquetas caninas armazenadas poderão ser utilizadas em outros estudos sobre o tema.

Keywords: dog, platelet-rich plasma, platelet storage lesions.

INTRODUÇÃO

Durante o armazenamento, as plaquetas sofrem alterações estruturais, bioquímicas e funcionais chamadas de lesões plaquetárias de armazenamento (PSL), um processo multifatorial que inclui consumo de energia, queda do pH, ativação e apoptose plaquetárias (Tynngård, 2009; Ohto, H. e Nollet, K. E., 2011). Estas alterações estão relacionadas com a diminuição da meia-vida e da funcionalidade plaquetária após a transfusão, de forma que entendê-las e minimizá-las é um objetivo na hemoterapia veterinária (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Davidow *et al.*, 2012; Davidow, 2013).

Não existe um teste único que possa avaliar com precisão a qualidade de um concentrado de plaquetas (CP), de modo que atualmente são utilizados diversos testes, isolados ou em conjunto, na tentativa de assegurar que o banco de sangue disponha de um produto de qualidade (Tynngård, 2009; Devine e Serrano, 2010). Existem poucos dados sobre a avaliação da função plaquetária e qualidade do CP canino sob condição de rotina de processamento e armazenamento, o que limita o desenvolvimento e avanço da hemoterapia veterinária (Klein, Adamik e Mischke, 1999; Perazzi *et al.*, 2013; Hoareau *et al.*, 2014).

Por serem armazenadas a temperatura ambiente (20-24°C), as plaquetas mantêm seu metabolismo ativamente e também estão mais sujeitas a proliferação bacteriana (Schubert &

Devine, 2010; Ohto e Nollet, 2011). Entender o mecanismo das PSL de plaquetas caninas poderá servir de base para pesquisas que visem desenvolver estratégias que aumentem a viabilidade celular e assim o tempo de estoque e qualidade do CP canino (Li *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2011; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012, 2013). O presente trabalho propõe avaliar o CP canino através de importantes marcadores de qualidade plaquetária como características morfoestruturais e de controle de qualidade (MPV e PDW, número de plaquetas e leucócitos e presença de *swirling*), metabolismo (pH, pO₂, pCO₂, glicose, lactato e ATP), funcionalidade (agregometria), ativação (CD62P), lesão mitocondrial (JC-1), apoptose e morte celular (caspase, exposição de fosfatidilserina, lactato desidrogenase). Com isso, espera-se observar similaridades entre o metabolismo plaquetário canino e humano durante o período de estoque, entender melhor o metabolismo plaquetário canino, e gerar conhecimento e que motive mais pesquisas nas áreas de hematologia e hemoterapia veterinária com o uso de testes até então utilizados apenas em CP humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Após permissão do tutor por escrito, foram selecionados cães acima de 28 kg de ambos os sexos e diferentes raças (Golden Retriever, Boxer, Pastor Alemão, SRD, Labrador). Todos os cães foram submetidos à avaliação clínica (ausculta cardiopulmonar, palpação abdominal, avaliação de mucosas, estado de hidratação e temperatura retal), laboratorial (hemograma, albumina, creatinina e alanina aminotransferase) e testados para a presença de antígeno de *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Anaplasma ssp.*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia ssp.* com reagente comercial (Snap 4Dx Test, Idexx Laboratories, Inc., WE, USA) e anticorpos contra *Leishmania ssp.* (Vetcheck, Tecsa Lab., BH, BRA). Após aprovação em todos os

critérios supracitados foram coletadas bolsas de sangue total (WB) de 450 mL de 22 doadores, que foram processadas até a obtenção do CP pelo método do plasma rico em plaquetas (PRP). Este estudo está de acordo com conceitos de bioética aplicados à pesquisa animal (Ellery, 1985; Winn Humane Use of Animals Guidelines, 2010) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS - Protocolo de aprovação nº 26102).

Preparação dos CPs através do método do PRP

A coleta das bolsas de sangue total foi realizada por punção da veia jugular, através do método gravitacional, com homogeneização automática e controle do fluxo e do volume da doação (Biomixer 323, Ljungberg & Köge I AB, SWE) (Abrams-Ogg & Scheneider, 2010). Foi utilizado sistema fechado, com bolsas triplas (CPD/SAGM, JP Indústria Farmacêutica, SP, BRA). Após a coleta, as bolsas ficaram em repouso a 22°C por uma hora, até o início do processamento. Os CPs foram obtidos através da metodologia PRP, onde cada bolsa de sangue total foi submetida à centrifugação leve (1600 g) por 6 minutos a 22°C (Centrífuga Sorvall Legend RT +, Thermo Scientific, MA, USA). O PRP foi retirado através de um extrator de plasma manual (ACS201, Terumo Medical do Brasil, SP, BRA) e em seguida submetido a uma segunda centrifugação (3300 g) por 8 minutos a 22°C. O volume das bolsas foi calculado de acordo com o peso e a densidade do fluido (1,026 g/mL) (Van Der Meer et al., 2010). Novamente com o auxílio do extrator de plasma, foi retirado o plasma sobrenadante até que restassem entre 50 e 70 mL de plasma com as plaquetas sedimentadas ao fundo da bolsa, constituindo o CP (Abrams-Ogg & Scheneider, 2010). Este foi mantido em bolsa específica de PVC plastificadas com tri-2-extil-trimelitato para armazenamento de plaquetas (TOTM, JP, SP, BRA), que permite a troca gasosa entre o CP e o ambiente (Zhang, Carter, Culibrk, *et al.*, 2008; Ohto, Hitoshi e Nollet, Kenneth E., 2011).

Armazenamento e amostragem das unidades de CP canino

Após a obtenção dos CPs, os mesmos foram mantidos em repouso por 1 hora e então armazenados sob temperatura controlada (20 – 24°C) (câmara ambientadora de plaquetas CDCI 03, Indrel, SP, BRA) e agitação constante (agitador de plaquetas linear AP48L, Presvac, BA, ARG). A retirada de alíquotas para as análises foi obtida através de cânula para coleta (Sampling Site Coupler, Fenwal, IL, USA) (Wang *et al.*, 1999; Curvers *et al.*, 2004) nos dias 1, 3 e 5.

Controle de qualidade – testes de metabolismo e função

Imediatamente antes da coleta da alíquota foi realizada avaliação do *swirling* plaquetário. A técnica consiste em uma avaliação visual do CP, contra a luz, onde é observada a movimentação das plaquetas e utilizada uma escala de 0 a 3 na classificação (Mathai *et al.*, 2006; Maurer-Spurej e Chipperfield, 2007). A contagem de plaquetas e os índices morfoestruturais (PDW e MPV) foram realizados em contador automático calibrado para a espécie canina (PocH-100iV Diff, Sysmex, IL, USA). Contagem de leucócitos residuais foi realizada em câmara de Nageotte (LO-Laboroptik GmbH, BH, DEU), no primeiro dia de avaliação (Curvers *et al.*, 2004; Gulliksson *et al.*, 2012).

As amostras submetidas ao ensaio de agregação por transmissão de luz (Agreg-Myr4, Qualitem, SP, BRA) foram diluídas para uma concentração de 250×10^3 plaquetas/ μL com PPP (plasma pobre em plaquetas) autólogo. Foram utilizados os agonistas ADP (5 μM), colágeno (5 $\mu\text{g/mL}$), e ácido araquidônico (1 μM), gerando uma curva monitorada por 10 minutos.

A determinação da concentração de lactato foi realizada pelo método de química seca (Vitros 250 Chemistry System, Johnson & Johnson, SP, BRA) com uma alíquota do sobrenadante do

CP, centrifugado por 15 minutos 1500 g (Centrífuga SpinLab SL M5, SP, BRA). As concentrações de glicose, pO₂, pCO₂ foram obtidas em gasômetro portátil (CG8, i-Stat, Abbott Point of Care, ON, CAN) de acordo com instruções do fabricante. Nos dias de avaliação foi realizada a extração do ATP (Johnson *et al.*, 2013) e as amostras foram congeladas a -80°C para análise posterior. Para a determinação do ATP foi utilizada técnica de quimiluminescência, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante (ATP Lite Luminescence ATP Detection Assay System, PerkinElmer, Waltham, USA) e a leitura das amostras foi realizada em leitor de microplaca multi-modo (Spectramax M5, Molecular Devices Inc., CA, USA). A determinação do pH foi realizada após calibração do pHmetro (HI 99171, Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA) em pH 4,01 e 7,01 sob temperatura controlada (22°C), conforme instruções do fabricante.

Mensuração da ativação plaquetária (P-selectina – CD62p)

As plaquetas foram marcadas com anticorpo monoclonal CD61 FITC (clone VI-PL2 - BD Biosciences, CA, USA). Para a avaliação da ativação plaquetária foi utilizado o MoAb CD62P PE (clone AC1.2 BD Biosciences, CA, USA). Cerca de 500.000 plaquetas foram adicionadas a 1µL de CD61 FITC e 3µL de CD62P PE e o volume foi completado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) até um volume final de 100 µL. Os tubos foram incubados por 15 minutos em câmara escura a temperatura ambiente. Foram adicionados mais 250 µL de PBS e realizada a aquisição no citômetro imediatamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de células marcadas para CD61 e CD62P. Todos os experimentos de citometria de fluxo foram realizados em citômetro FACSCalibur™ (BD Biosciences, CA, USA), onde foram adquiridos 30.000 eventos para cada análise utilizando o software CellQuest™ Pro (BD Biosciences, CA, USA). Posteriormente, os dados foram analisados

quanto à porcentagem de marcação com software comercial FCS Express 5 software (De Novo, Software, Ontario, CAN).

Ensaio de apoptose

Mensuração da exposição de fosfatidilserina (PS). Para avaliação de exposição de fosfatidilserina foi utilizado ApoFlowEx[®] FITC Kit (Exbio, PH, CZE). Cerca de 500.000 plaquetas foram adicionadas a 2,5µL Anexina V-FITC, 45 µL água destilada e 5 µL de tampão com cálcio. A solução foi incubada por 15 minutos em câmara escura a temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado 1 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 1150 g por 5 minutos (lavagem). O sobrenadante foi dispensado por inversão e as plaquetas ressuspendidas em 250 µL de PBS para aquisição imediata no citômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com ligação à Anexina V.

Lactato Desidrogenase. A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi determinada através de método de química seca (Vitros 250 Chemistry System, Johnson & Johnson, SP, BRA) com uma alíquota do sobrenadante do CP, centrifugado por 15 minutos 1500 g (Centrífuga SpinLab SL M5, SP, BRA).

Caspase ativa. Para avaliação de caspase ativa foram adicionados em um tubo de poliestireno 1µ de CP com 500.000 plaquetas, 98 µL de PBS e 1 µL da solução de estoque de Caspase na concentração de 5 mM (Caspase TM FITC VAD-FMK, Promega Corporation, MA, USA) – obtendo-se uma concentração final de caspase de 1 mM. Após incubação por 20 minutos a 37°C em câmara escura foi realizada lavagem (1 mL de PBS e centrifugação a 1150 g por 5 minutos), o sobrenadante foi desprezado por inversão, as plaquetas ressuspendidas em 250µL de PBS e foi realizada a aquisição no citômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com caspase ativa.

Mensuração do potencial de membrana mitocondrial- JC-1

Cerca de 5.000.000 plaquetas foram incubadas com o marcador MitoScreen JC-1 (BD Biosciences, CA, USA) – cuja solução de trabalho foi diluída em concentração 1:1000 com PBS. Após a incubação a 37°C por 15 minutos em câmara escura foram adicionados 2 mL de PBS; a solução foi centrifugada 1150 *g* por 5 minutos; o sobrenadante descartado por inversão; e as plaquetas ressuspensas com 250 µL de PBS para aquisição imediata no citômetro de fluxo.

Avaliação microbiológica

No 5º dia de armazenamento todos os 22 CPs foram submetidos à cultura microbiológica aeróbica e anaeróbica em caldo BHI, com incubação a 37 °C durante 10 dias para identificação de contaminação microbiológica.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, teste de Duncan como posthoc. As análises foram executadas no software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA). Foram considerados resultados significativos aqueles com $p < 0,05$. Correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar os parâmetros analisados; onde correlação significativa foi considerada quando $p < 0,05$ e correlação fortemente significativa quando $p < 0,001$.

RESULTADOS

Parâmetros descritivos

As médias e desvios padrões (DP) dos diferentes parâmetros analisados durante o armazenamento (avaliados nos dias 1, 3 e 5) estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. As

alterações do CP canino foram semelhantes às aquelas descritas em CPs humanos, como diminuição do pH, da concentração de glicose, do *swirling*, da pCO₂; e aumento da concentração de lactato e pO₂ (Amorini *et al.*, 2007; Ghezelbash *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2015) (Figura 1). Todos os CPs apresentaram leucorredução adequada (leucócitos residuais < 2,0 x 10⁸/unidade), com contagem média de leucócitos de 0,064 x 10⁸/unidade (dia 1). Nenhuma das unidades de CP canino apresentou contaminação microbiológica.

O *swirling* diminuiu em todas as unidades de CP ao longo do tempo. Os índices morfoestruturais PDW e MPV também apresentaram diferenças entre os dias de avaliação, com aumento significativo.

Metabolismo Plaquetário

Houve decréscimo do pH em todas as unidades de CP canino. Assim como o pH, a concentração de ATP também diminuiu durante o período de estoque, apresentando diferença significativa entre os dias avaliados. A pO₂ aumentou durante o período de armazenamento. Inversamente ao observado na análise da pO₂, a pCO₂ diminuiu durante o estoque, com diferença significativa entre os dias avaliados. Refletindo o consumo, a concentração de glicose diminuiu gradualmente ao longo do período de armazenamento. Inversamente à queda da concentração de glicose, houve o acúmulo de lactato, que apresentou diferença significativa entre os dias. Não foi observada diferença significativa na agregação plaquetária durante os dias de avaliação com o uso de ADP e colágeno. Houve aumento na agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico entre os dias 1 e 5 (p=0,0082).

A concentração média de plaquetas nas unidades de CP canino foi 7,4882 ± 2,39 x 10¹⁰/unidade no dia 1. Ao dividir os CPs em dois grupos, um com contagem de plaquetas inferior à média (≤7,49 x 10¹⁰/unidade, n=14) e outro com contagem superior (>7,49 x

10¹⁰/unidade, n=8) e compará-los observou-se que os CPs com contagem inferior apresentaram parâmetros de qualidade superior ao final do período (Tabela 3).

Expressão de glicoproteínas de membrana e ativação plaquetária

A porcentagem de plaquetas positivas para CD61 e CD62P não apresentou mudanças ao longo do tempo.

Ensaio de lesão mitocondrial e apoptose

De acordo com a análise do $\Delta\psi_m$ pelo JC-1, houve um aumento da despolarização das mitocôndrias durante o armazenamento das plaquetas a 22°C por 5 dias (p=0,0019). Do primeiro ao terceiro dia de armazenamento o $\Delta\psi_m$ mostrou-se estável; houve queda no $\Delta\psi_m$ entre os dias 1 e 5 (p=0,0016) e 3 e 5 (p=0,0373). Não houve mudança na porcentagem de células com exposição de PS e com marcação para caspase ativa durante o período avaliado. A atividade da enzima LDH apresentou uma tendência de aumento ao longo dos 5 dias de armazenamento, entretanto não foi observada relevância estatística neste aumento.

Correlações entre os parâmetros de qualidade, metabólicos e apoptose

Foi observada correlação negativa forte entre glicose e lactato durante todo o período. Também observamos correlação positiva entre glicose, pH, *swirling*; correlação negativa entre glicose, lactato e índices morfoestruturais; e correlação positiva entre pH e despolarização mitocondrial (Tabelas 4, 5).

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, avanços principalmente nas áreas de terapia intensiva e oncologia foram um impulso para a maior demanda de hemocomponentes em medicina veterinária. Entretanto, a disponibilidade destes - especialmente de CP - é escassa, devido principalmente a

dificuldade na sua obtenção e ao curto período de armazenamento. Enquanto a disponibilidade é escassa, a procura por CP aumenta à medida que as vantagens do fracionamento sanguíneo difundem-se no meio veterinário (Callan, Appleman e Sachais, 2009). Na contramão desta demanda, poucos são os estudos que avaliam a qualidade do CP canino (Klein, Adamik e Mischke, 1999; Hoareau *et al.*, 2014). Neste trabalho foram avaliadas técnicas de agregação plaquetária, bioquímica e citometria de fluxo durante o armazenamento de CPs caninos nos dias 1, 3 e 5 de armazenamento.

Por observar diferença nas variáveis associadas à contagem de plaquetas, optou-se por dividir os CPs em dois grupos (contagem inferior e superior à média) e observou-se que os valores médios de pH, glicose e ATP diminuem drasticamente ($p < 0,0001$), enquanto a concentração de lactato acumula de maneira mais severa ($p < 0,0001$) naqueles com contagem superior a média. Assim como também foi evidente a perda de $\Delta\psi_m$ nos CPs deste grupo ($p < 0,05$). Todas as bolsas com menor número de plaquetas apresentaram sinais de qualidade até o último dia de armazenamento, com $pH > 6,2$ em todas as unidades, além de maiores níveis de ATP, de glicose e menor quantidade de lactato. A análise dos índices morfoestruturais PDW e MPV permitiu inferir que as plaquetas mantidas em CPs com menor número apresentam menores índices de *swelling* plaquetário e menor fragmentação.

Plaquetas caninas apresentam meia vida na circulação mais curta comparada à meia vida de plaquetas humanas, o que pode justificar um metabolismo mais acelerado das primeiras (Russell, 2010). Desta forma, o número de plaquetas por bolsa comumente obtido em CPs humanos pode não ser o ideal para bolsas de CPs caninos. Considerando que as plaquetas caninas podem apresentar um metabolismo mais acelerado - ou seja, apresentam consumo de glicose mais rápido e conseqüente maior acúmulo de lactato e queda do pH, além da diminuição do $\Delta\psi_m$ - sugere-se que pode ser necessário um menor número de plaquetas por

mL nas bolsas de CP canino, a fim de suprir as necessidades metabólicas. Com um grande número de plaquetas por mL, o oxigênio é consumido mais rapidamente e a via metabólica utilizada pelas plaquetas passa a ser a anaeróbica, com produção de lactato e diminuição do pH do meio. O aumento do volume de plasma por bolsa não é recomendado, pois aumenta o volume a ser transfundido e também o risco de reações transfusionais (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Davidow, 2013). Até que outros estudos esclareçam esta condição, sugere-se que os CPs caninos com contagens superiores a $7,49 \times 10^{10}$ por unidade sejam utilizados em menos de 5 dias, pois exceder este limite acarreta efeitos negativos sobre a qualidade do produto.

Comprovou-se a relação entre queda do pH e as mudanças dos índices morfoestruturais, através da forte correlação negativa entre pH e PDW e pH e MPV no último dia de avaliação. Enquanto o MPV indica o tamanho médio das plaquetas, o PDW indica a anisocitose plaquetária. O MPV apresentou forte correlação com a perda do *swirling*, ou seja, perda da forma discoide para a esférica, refletida no aumento do MPV. O aumento dos índices morfoestruturais e diminuição do *swirling* também apresentou correlação forte com o aumento da concentração de lactato nos últimos dias de armazenamento, sugerindo uma relação causa-efeito entre acidez do meio e mudanças morfológicas e indica a ocorrência de deterioração celular durante o estoque (Singh, Chaudhary e Ray, 2003). A análise dos índices PDW e MPV apresenta vantagens como custo zero - já que os contadores hematológicos calibrados para uso em amostras caninas e indispensavelmente utilizados para a contagem de plaquetas calculam os índices na mesma ocasião da contagem plaquetária – requerendo pouca amostra e apresentando boa reprodutibilidade. Sendo assim, a análise dos índices PDW e MPV é uma alternativa prática e de baixo custo que pode complementar o controle de qualidade de CPs em bancos de sangue veterinários.

Durante o estoque observamos aumento da pO_2 e diminuição da pCO_2 . Estes resultados confirmam que de fato houve troca gasosa entre o conteúdo da bolsa e o ambiente. Esta troca gasosa é necessária, pois o oxigênio consumido durante a respiração celular deve ser repostado para que a mesma continue ocorrendo durante o armazenamento (Alhumaidan *et al.*, 2011; Hoareau *et al.*, 2014). O aumento da pO_2 no período final do armazenamento indica falha no metabolismo aeróbico - que deveria atuar no consumo do oxigênio - em detrimento ao metabolismo glicolítico (Gulliksson *et al.*, 2012), fato confirmado pelo acúmulo de lactato e queda do pH.

As fortes correlações observadas entre glicose, lactato, pH e *swirling* são explicadas através do entendimento do metabolismo anaeróbico do qual as plaquetas são capazes. Conforme ocorre a oxidação da glicose como fonte energética, a concentração de lactato aumenta excedendo a capacidade tamponante do meio e desta forma o pH diminui. Com a diminuição do pH as plaquetas perdem sua forma discoide e assim observa-se decréscimo do *swirling* (Gulliksson *et al.*, 2012).

A capacidade das plaquetas responderem aos agonistas é um teste de funcionalidade, e a falta de agregação sugere diminuição da viabilidade. Entretanto, Miyaji *et al.* (2004) demonstraram que plaquetas humanas podem recuperar a capacidade de agregação depois de transfundidas, sugerindo que testes de agregação plaquetária *in vitro* sofrem a desvantagem de não refletirem condições *in vivo*. Uma possível explicação para a falta de concordância de resultados *in vitro* e *in vivo* pode ser o fato de que no agregômetro a agregação ocorre sob condições não laminares e de baixo fluxo, não considerando a importância do fluxo sanguíneo na adesão e agregação plaquetárias sob condições naturais, ou seja, *in vivo* (Jackson, 2007). Apesar da diminuição gradativa do pH observada nos CPs aqui analisados, esta não apresentou correlação com os valores observados na agregometria, ou seja, as alterações do pH

provavelmente não foram responsáveis pela queda da função plaquetária *in vitro*. Poucos estudos foram conduzidos com CPs caninos, e, neste foi observado o aumento da capacidade de agregação com o uso do agonista ácido araquidônico, nunca utilizado para avaliar funcionalidade de plaquetas caninas. Hoareau *et al.* (2014) obtiveram baixos valores de agregação ao analisarem CPs caninos, independentemente do momento da análise. Os autores discutem a possibilidade da influência negativa da contaminação com leucócitos e da influência positiva sobre a agregação por parte dos eritrócitos. Não foi observada correlação entre a capacidade de agregação e o número de leucócitos ou eritrócitos nas bolsas, entretanto, foram obtidos valores de leucócitos muito inferiores àqueles apresentados por Hoareau *et al.* (2014). Uma possível explicação para o aumento da agregação com ácido araquidônico neste estudo é a resposta deste agonista de acordo com diferentes raças, conforme relatado por Clemmons (Clemmons e Meyers, 1984). Ainda, a composição lipídica das plaquetas caninas apresenta diferenças sutis mas significantes em relação às humanas, podendo explicar a variável resposta observada após estímulo com agonistas (Patterson e Cissik, 1991).

A porcentagem de plaquetas marcadas pelo anticorpo monoclonal CD61 foi mantida durante o estoque, sempre superior a 90%. Segundo Wilkerson e Shuman (2001), este seria um indicativo de que não houve internalização da glicoproteína por endocitose (Wilkerson e Shuman, 2001). A presença P-selectina na superfície plaquetária é considerada um indicador de ativação (Wagner *et al.*, 2002; Albanyan, Harrison e Murphy, 2009; Jain *et al.*, 2015). A porcentagem de plaquetas positivas para CD62P não apresentou mudanças ao longo do tempo, diferentemente de outros estudos, onde a porcentagem de plaquetas com marcação para CD62P aumentou durante o período analisado (Leytin *et al.*, 2008; Albanyan, Harrison e Murphy, 2009; Jain *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2015). A marcação com CD62P nunca foi avaliada em CP canino, e trabalhos conduzidos com CP humano comumente utilizam a

metodologia do ‘*buffy-coat*’ ou aférese para obtenção do CP. Metodologias como o sistema de aférese, ou mesmo o uso de soluções aditivas ou a leucorredução podem influenciar na ativação de plaquetas estocadas (Wagner *et al.*, 2002; Albany *et al.*, 2009; Ahmed, Leheta e Younes, 2010), justificando nossos achados. Ghezelbash *et al.* (2015), que também utilizaram a metodologia do PRP para obtenção de CP humanos não observaram diferença significativa na expressão de CD62P em plaquetas estocadas por 5 dias.

PS é um fosfolípido de carga negativa que sofre deslocamento para a superfície da membrana da plaqueta em estágios iniciais da apoptose. Este deslocamento é reconhecido por macrófagos que captam este sinal e removem a célula (Solheim *et al.*, 2004; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012), ou seja, externalização da PS serve como um gatilho para o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos, e por este motivo é amplamente utilizada com o propósito de monitorar este fenômeno durante o armazenamento de plaquetas (Martin *et al.*, 1995; Albany *et al.*, 2009). A detecção de PS na superfície plaquetária foi realizada através da mensuração de Anexina V – proteína com alta afinidade e especificidade por aminofosfolídeos (Li *et al.*, 2000; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; Saboor *et al.*, 2013). Neste estudo não observamos aumento na exposição de PS, provavelmente devido o tempo de avaliação de apenas 5 dias. Dasgupta *et al.* (2010) descrevem aumento da exposição de PS associado com a liberação de citocromo c e indução da via das caspases apenas após 5 dias de armazenamento de plaquetas humanas.

Com a morte e lise plaquetária ocorre liberação dos compostos citosólicos no plasma do CP. Um destes compostos é a enzima LDH, utilizada, por este motivo, como um marcador de morte celular (Casoli *et al.*, 2008). Apesar do aumento da liberação de LDH, não foi observada relevância estatística provavelmente porque a variação em cada dia de análise na mesma amostra apresentou grande variabilidade, comprometendo a análise. Com um maior

número de amostras talvez fosse possível identificar uma diferença estatística na atividade da enzima durante o armazenamento. Alguns estudos relatam aumento significativo da atividade da enzima a partir do sexto dia de armazenamento, ou em métodos diferentes do utilizado neste estudo, o que também pode explicar a falta de significância observada aqui (Amorini *et al.*, 2007; Gulliksson *et al.*, 2012; Hoareau *et al.*, 2014).

Alguns autores sugerem que a perda do $\Delta\Psi_m$ é o marcador mais sensível de qualidade plaquetária durante o estoque, pois sinaliza o processo de apoptose, antes mesmo da ativação da via das caspases ou da exposição de PS (Verhoeven *et al.*, 2005; Leaver *et al.*, 2006; Albanyan, Harrison e Murphy, 2009; Cookson *et al.*, 2010). Foi observada queda no $\Delta\Psi_m$ a partir do terceiro dia de armazenamento. A diminuição ou perda do $\Delta\Psi_m$ reduz a síntese de ATP e também promove a formação de poros na membrana e induz a formação do apoptossomo, que ativa a via das caspases (Shimizu *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2010). Interessantemente, assim como Perrotta *et al.* (2003), não foi observada correlação entre a diminuição do ATP e do $\Delta\Psi_m$ em cada dia de avaliação. Segundo os autores, o $\Delta\Psi_m$ e a exposição de PS não são afetados pela depleção de ATP. Uma possível explicação seria que as plaquetas possuem baixo requerimento energético, de forma que, mesmo com diminuição do $\Delta\Psi_m$ não há reflexo sensível na diminuição da produção de ATP plaquetário. Por outro lado, observamos correlação entre aumento do *swelling* mitocondrial e diminuição do ATP, indicando que a lesão à membrana interna da mitocôndria está mais relacionada com a queda na produção de ATP do que o $\Delta\Psi_m$ propriamente dito.

A diminuição do $\Delta\Psi_m$ é um dos mecanismos de ativação da via das caspases, no entanto, não foi observada correlação significativa entre as duas variáveis, provavelmente em decorrência da ordem cronológica em que acontecem os eventos, sendo a perda do $\Delta\Psi_m$ anterior à ativação da caspases (Verhoeven *et al.*, 2005; Dasgupta *et al.*, 2010), e os resultados

expressam as alterações dos primeiros 5 dias de armazenamento. Segundo Leytin et al. (2007; 2008), apenas altos níveis de estresse são capazes de induzir a apoptose plaquetária *in vitro*. Isto seria possível após longos períodos de armazenamento - superiores há 12 dias, por exemplo - (Cookson *et al.*, 2010); dado que pode explicar a ausência de aumento de plaquetas com caspase ativa no presente estudo.

CONCLUSÕES

Apesar da demanda, são poucas as pesquisas que objetivam entender o metabolismo de plaquetas caninas armazenadas. Este trabalho nos ajuda a entender as PSL de CPs caninos e também serve de suporte para pesquisas futuras que visem não apenas analisar a viabilidade das plaquetas pós-transfusão em cães, mas também aumentar o tempo de armazenamento das plaquetas caninas nos bancos de sangue veterinários.

Os resultados apresentados aqui permitem concluir que as técnicas utilizadas na avaliação de CPs humanos podem ser utilizadas em plaquetas caninas com algumas adaptações. De maneira geral, as plaquetas caninas sob condições de armazenamento apresentam comportamento similar àquele observado em plaquetas humanas, como diminuições no pH, glicose, *swirling* e aumento de lactato e liberação de LDH; além da diminuição do $\Delta\Psi_m$.

Apesar de não haver um limite superior da quantidade de plaquetas em um CP, com base nestes resultados, os autores concluem que os CPs caninos não devem conter número excessivo de plaquetas, pois a quantidade elevada de plaquetas tem um caráter deletério e está associada a lesões de armazenamento mais pronunciadas, com maior consumo de glicose e consequente maior produção de lactato, queda mais rápida do pH e diminuição do *swirling* – fatos relacionados com baixo incremento plaquetário pós transfusão. Sugere-se que bolsas de CP canino com contagens superiores a $7,49 \times 10^{10}$ plaquetas/unidade sejam transfundidas em

menos de 5 dias, ou que sejam testados materiais plásticos que permitam maior troca gasosa. Outra possibilidade que se abre é a avaliação de soluções aditivas que viabilizem o estoque de bolsas com alta contagem de plaquetas por unidade por até 5 dias.

De acordo com a avaliação dos índices morfoestruturais PDW e MPV, concluímos que os mesmos podem ser utilizados na rotina de bancos de sangue veterinários como indicadores de qualidade do CP canino.

Alguns parâmetros *in vitro* não apresentam boa reprodutibilidade quando *in vivo*, de modo que mais estudos necessitam ser conduzidos a fim de esclarecer o papel das lesões plaquetárias de armazenamento em plaquetas caninas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. S.; LEHETA, O.; YOUNES, S. In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates. **Blood Transfus**, v. 8, n. 1, p. 28-35, Jan 2010. ISSN 1723-2007 (Print)

ALBANYAN, A. M.; HARRISON, P.; MURPHY, M. F. Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis- and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. **Transfusion**, v. 49, n. 1, p. 108-117, Jan 2009. ISSN 0041-1132.

ALBANYAN, A. M. et al. Measurement of phosphatidylserine exposure during storage of platelet concentrates using the novel probe lactadherin: a comparison study with annexin V. **Transfusion**, v. 49, n. 1, p. 99-107, Jan 2009. ISSN 0041-1132.

ALHUMAIDAN, H. et al. Manufacture of pooled platelets in additive solution and storage in an ELX container after an overnight warm temperature hold of platelet-rich plasma. **Am J Clin Pathol**, v. 136, n. 4, p. 638-45, Oct 2011. ISSN 1943-7722. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917688> >.

AMORINI, A. M. et al. Evaluation of biochemical parameters in platelet concentrates stored in glucose solution. **Blood Transfus**, v. 5, n. 1, p. 24-32, Jan 2007. ISSN 1723-2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204748> >.

CALLAN, M. B.; APPLEMAN, E. H.; SACHAIS, B. S. Canine platelet transfusions. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, v. 19, n. 5, p. 401-15, Oct 2009. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821881> >.

CASOLI, T. et al. Platelet as a physiological model to investigate apoptotic mechanisms in Alzheimer beta-amyloid peptide production. **Mech Ageing Dev**, v. 129, n. 3, p. 154-62, Mar 2008. ISSN 0047-6374 (Print)

COOKSON, P. et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution. **Transfusion Medicine**, v. 20, n. 6, p. 392-402, 2010. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2010.01034.x> >.

CURVERS, J. et al. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. **Transfusion**, v. 44, n. 1, p. 49-58, 2004. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0041-1132.2004.00628.x> >.

DASGUPTA, S. K. et al. Platelet senescence and phosphatidylserine exposure. **Transfusion**, v. 50, n. 10, p. 2167-75, Oct 2010. ISSN 0041-1132.

DAVIDOW, B. Transfusion medicine in small animals. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 43, n. 4, p. 735-56, Jul 2013. ISSN 1878-1306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747258> >.

DAVIDOW, E. B. et al. Use of fresh platelet concentrate or lyophilized platelets in thrombocytopenic dogs with clinical signs of hemorrhage: a preliminary trial in 37 dogs. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, v. 22, n. 1, p. 116-25, Feb 2012. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016747> >.

DEVINE, D. V.; SERRANO, K. The Platelet Storage Lesion. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 2, p. 475-487, 6// 2010. ISSN 0272-2712. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272271210000089> >.

GHEZELBASH, B. et al. In vitro assessment of platelet lesions during 5-day storage in Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO) centers. **Arch Iran Med**, v. 18, n. 2, p. 114-6, Feb 2015. ISSN 1029-2977.

GULLIKSSON, H. et al. Storage of platelets: effects associated with high platelet content in platelet storage containers. **Blood Transfus**, v. 10, n. 2, p. 205-12, Apr 2012. ISSN 1723-2007 (Print)

HOAREAU, G. L. et al. Comparison of the platelet-rich plasma and buffy coat protocols for preparation of canine platelet concentrates. **Vet Clin Pathol**, v. 43, n. 4, p. 513-8, Dec 2014. ISSN 0275-6382.

JAIN, A. et al. Serial changes in morphology and biochemical markers in platelet preparations with storage. **Asian J Transfus Sci**, v. 9, n. 1, p. 41-7, Jan-Jun 2015. ISSN 0973-6247 (Print)

JOHNSON, L. et al. In vitro assessment of buffy-coat derived platelet components suspended in SSP+ treated with the INTERCEPT Blood system. **Transfusion Medicine**, v. 23, n. 2, p. 121-129, 2013. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/tme.12020> >.

_____. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. **Transfusion**, Oct 4 2015. ISSN 0041-1132.

KLEIN, A.; ADAMIK, A.; MISCHKE, R. [Changes in platelet concentrates from dogs due to storage. I. Platelet count in in vitro function]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 112, n. 6-7, p. 243-53, Jun-Jul 1999. ISSN 0005-9366 (Print)

LEAVER, H. A. et al. Calcium-sensitive mitochondrial membrane potential in human platelets and intrinsic signals of cell death. **Platelets**, v. 17, n. 6, p. 368-77, Sep 2006. ISSN 0953-7104 (Print)

LEYTIN, V. et al. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. In: (Ed.). **Br J Haematol**. England, v.142, 2008. p.494-7. ISBN 1365-2141 (Electronic)

MATHAI, J. et al. Suitability of measurement of swirling as a marker of platelet shape change in concentrates stored for transfusion. **Platelets**, v. 17, n. 6, p. 393-6, Sep 2006. ISSN 0953-7104 (Print)

MAURER-SPUREJ, E.; CHIPPERFIELD, K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. **Transfus Med Rev**, v. 21, n. 4, p. 295-306, Oct 2007. ISSN 0887-7963 (Print)

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, 6// 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050211000632> >.

_____. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. **Transfus Apher Sci**, v. 44, n. 3, p. 321-5, Jun 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507724> >.

RUSSELL, K. E. Platelet kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia. In: WEISS, D. J. e WARDROP, J. K. (Ed.). **Schalm's: Veterinary Hematology**. 6. Iowa, EUA: Willey - Blackwell Ltd, 2010. cap. 77, p.576 - 585. (Platelets).

SHIMIZU, M. et al. [Whole blood flow cytometry for detection of activated platelets. I. Platelet identification, blood collection and storage]. **Rinsho Byori**, v. 49, n. 4, p. 402-7, Apr 2001. ISSN 0047-1860 (Print)

SINGH, H.; CHAUDHARY, R.; RAY, V. Platelet indices as quality markers of platelet concentrates during storage. **Clin Lab Haematol**, v. 25, n. 5, p. 307-10, Oct 2003. ISSN 0141-9854 (Print)

TYNNGÅRD, N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 41, n. 2, p. 97-104, 10// 2009. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050209001244> >.

VERHOEVEN, A. J. et al. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. **Transfusion**, v. 45, n. 1, p. 82-9, Jan 2005. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647022> >.

WAGNER, T. et al. Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution. **Transfusion**, v. 42, n. 6, p. 719-27, Jun 2002. ISSN 0041-1132 (Print)

WANG, C. et al. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. **Transfus Sci**, v. 20, n. 2, p. 129-39, Apr 1999. ISSN 0955-3886 (Print)

WILKERSON, M. J.; SHUMAN, W. Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. **Vet Clin Pathol**, v. 30, n. 3, p. 107-113, 2001. ISSN 0275-6382.

ZHANG, J. G. et al. Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. **Transfusion**, v. 48, n. 5, p. 847-56, May 2008. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18298601> >.

Tabela 1. Metabolismo plaquetário (média ± desvio padrão) in vitro de plaquetas caninas armazenadas por 5 dias.

<i>Parâmetros</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 5</i>
PQT	7,49 ± 2,39	7,69 ± 2,39	7,42 ± 2,79
MPV (fL)	11,51 ± 1,22 ^a	12,48 ± 4,53 ^a	13,17 ± 6,58 ^b
PDW (fL)	12,96 ± 7,90 ^a	13,95 ± 5,46	15,09 ± 1,98 ^b
pH (22°C)	6,97 ± 0,38 ^{a*}	6,45 ± 0,55 ^b	5,94 ± 0,66 ^{c*}
pO ₂ (mm Hg ⁻¹)	107,60 ± 32,19 ^a	115,91 ± 30,99 ^a	140,14 ± 21,84 ^b
pCO ₂ (mm Hg ⁻¹)	43,70 ± 43,7 ^{a*}	25,49 ± 25,48 ^{b*}	9,50 ± 9,50 ^{c*}
Glicose (mg/dL)	456,77 ± 41,38 ^{a*}	338,04 ± 79,63 ^{b*}	247,27 ± 100,46 ^{c*}
Lactato (mg/dL)	6,28 ± 2,59 ^{a*}	16,35 ± 7,17 ^b	25,42 ± 11,20 ^{c*}
ATP (µmol 10 ¹¹ plaq ⁻¹)	1,73 ± 0,64 ^{a*}	1,24 ± 0,33 ^b	0,97 ± 0,32 ^{c*}
CD61 (%)	91,47 ± 4,75	93,38 ± 4,32	91,84 ± 5,69
CD62P (%)	2,72 ± 1,50	2,61 ± 3,58	2,64 ± 2,22
LDH (U/L)	237,91 ± 159,07	404,68 ± 98,49	630,00 ± 162,07
Anexina V (%)	2,36 ± 2,49	1,57 ± 1,12	3,55 ± 4,21
Caspase (%)	10,17 ± 11,45	6,66 ± 5,89	12,03 ± 13,86
ΔΨm JC-1 (%)	91,82 ± 3,90 ^a	84,24 ± 20,48 ^a	55,38 ± 37,29 ^b

PQT, número de plaquetas x 10¹⁰/unidade; ΔΨm, potencial de membrana mitocondrial; ATP, trifosfato de adenina; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam valores significativamente diferentes (p<0,05).

*Representa valores significativamente diferentes (p<0,001).

Tabela 2. Agregação plaquetária (média ± desvio padrão) durante armazenamento por 5 dias.

<i>Agregante</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 5</i>
Ácido Araquidônico (%)	8,545 ± 5,32494 ^a	11,86 ± 5,947 ^a	13,64 ± 7,719 ^b
ADP (%)	8,182 ± 5,31517	12,09 ± 7,302	12,41 ± 7,008
Colágeno (%)	9,636 ± 3,78651	12,68 ± 6,043	13,27 ± 7,072

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam valores significativamente diferentes (p<0,05).

Tabela 3. Parâmetros de qualidade em CPs caninos com menor ou maior número de plaquetas por unidade.

	CPs com contagem de plaquetas ($\leq 7,49 \times 10^{10}$ /unidade)	CPs com contagem de plaquetas ($> 7,49 \times 10^{10}$ /unidade)	<i>p</i>
PDW (fL)	14,99 ± 2,51	18,40 ± 1,70	0,017
MPV (fL)	12,86 ± 1,67	15,05 ± 1,22	0,043
Glicose (mg/dL)	306,85 ± 18,59	143,00 ± 61,54	<0,0001
Lactato (mg/dL)	18,80 ± 6,10	37,00 ± 8,19	<0,0001
ATP ($\mu\text{mol } 10^{11}\text{plaq}^{-1}$)	1,06 ± 0,31	0,79 ± 0,39	<0,0001
pH (22°C)	6,29 ± 0,56	5,32 ± 0,49	<0,0001
pO ₂ (mm Hg ⁻¹)	126,59 ± 16,59	152,87 ± 25,07	<0,0001
pCO ₂ (mm Hg ⁻¹)	13,29 ± 5,98	9,12 ± 7,64	0,043
$\Delta\Psi\text{m JC-1}$ (%)	66,53 ± 26,18	15,27 ± 14,69	0,003
LDH (U/L)	442,71 ± 115,14	957,75 ± 1093,61	0,022

ATP, trifosfato de adenina; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário; $\Delta\Psi\text{m}$, potencial de membrana mitocondrial. Valores apresentados como média ± DP.

Tabelas 4 e 5. Correlações entre características metabólicas de plaquetas caninas armazenadas.

Dia 3					
	Glicose (mg/dL)	Lactato (mg/dL)	pH (22°C)	LDH (U/L)	JC-1 $\Delta\Psi\text{m}$ (%)
<i>Swirling</i>	0,706*	-0,808**	0,732*	-0,744**	-0,645**
Glicose (mg/dL)	-	-0,898**	0,937**	-0,755**	-0,726*
Lactato (mg/dL)	-0,898**	-	-0,867**	0,855**	-0,716*
pH (22°)	0,937**	-0,867**	-	-0,688*	0,507*
PDW(fl)	-0,787*	0,644*	-0,757*	0,469*	-0,213
MPV (fl)	-0,683*	0,518*	-0,757*	0,294	-0,070
LDH (U/L)	-0,755**	0,855**	-0,688*	-	-0,874**

$\Delta\Psi\text{m}$, potencial de membrana mitocondrial; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário.

*Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

**Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,001$).

Dia 5

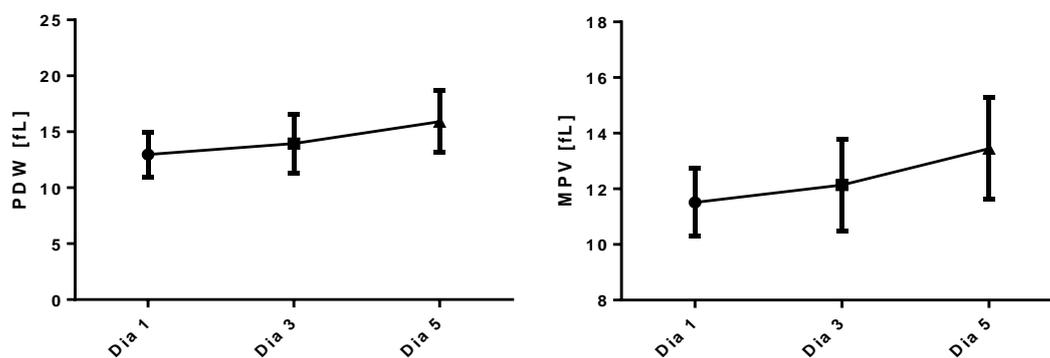
	Glicose (mg/dL)	Lactato (mg/dL)	pH (22°C)	LDH (U/L)	$\Delta\Psi_m$ JC-1 (%)
<i>Swirling</i>	0,828**	-0,813**	0,803**	-0,44*	0,797**
Glicose (mg/dL)	-	-0,927**	0,936**	-0,465*	0,911**
Lactato (mg/dL)	-0,927**	-	-0,871**	0,332	-0,846**
pH (22°C)	0,936**	-0,871**	-	-0,640*	0,894**
PDW (fl)	-0,758*	0,726*	-0,823*	0,429	-0,669*
MPV (fl)	-0,801*	0,733*	-0,883**	0,519*	-0,669*
PQT ($\times 10^{10}$ /unid)	-0,668*	0,760**	-0,593*	0,149	-0,579*
LDH (U/L)	-0,44*	0,332	-0,640*	-	-0,561*

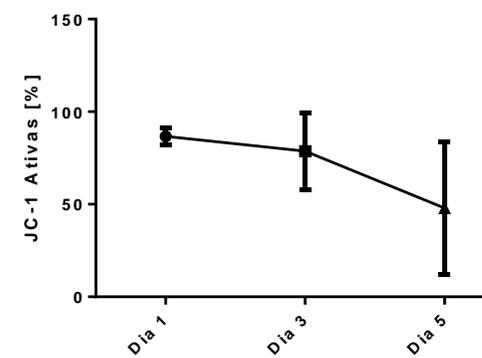
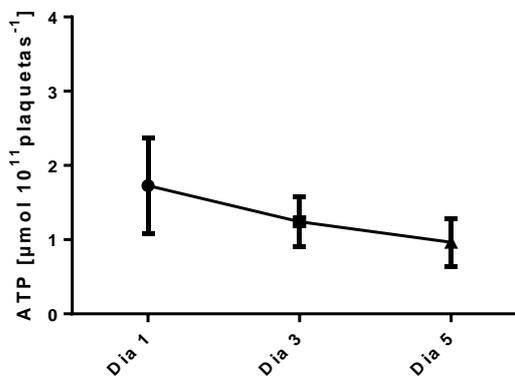
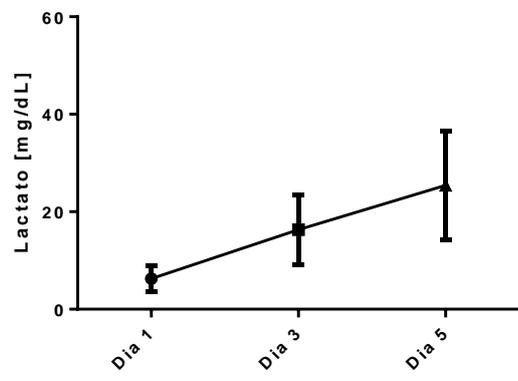
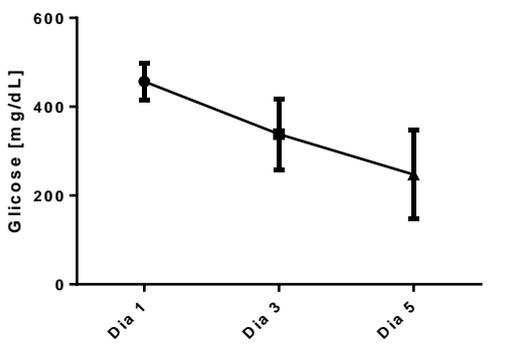
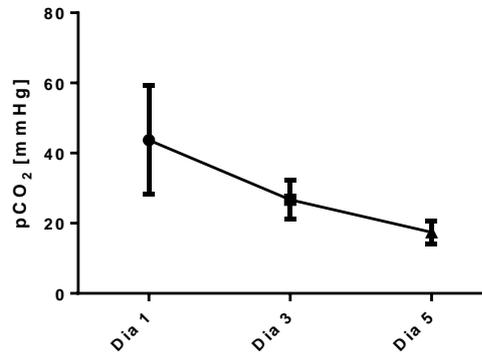
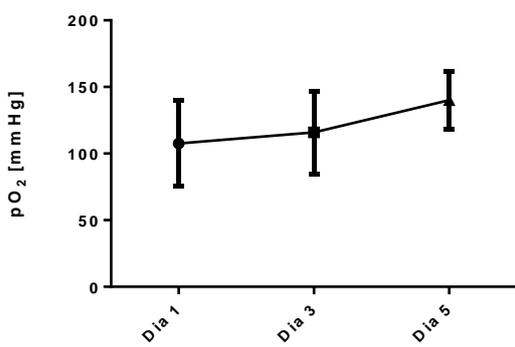
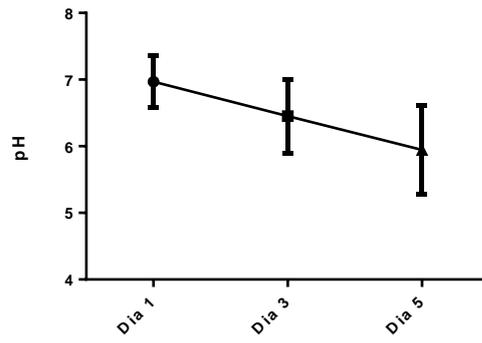
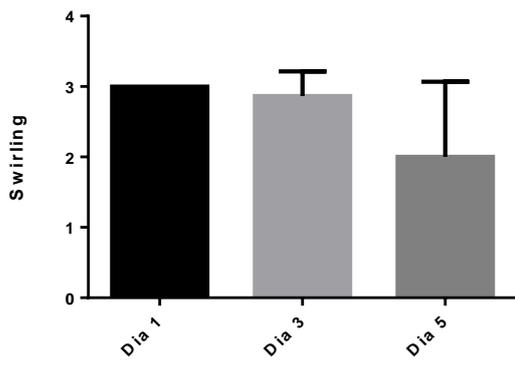
$\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial; LDH, lactato desidrogenase; MPV, volume médio plaquetário.

*Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

**Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,001$).

Figura 1. Parâmetros *in vitro* dos concentrados de plaquetas caninas armazenadas por 5 dias.





SHORT COMUNICACION 1

Comparação de três diferentes métodos de avaliação de pH em concentrado de plaquetas canino

Comparison of three different pH assessment methods in canine platelet concentrate

Camila Serina Lasta^{1*}, Carolina Hating¹, Nicole Hlavac¹, Magnus Larruscain Dalmolin², Luciana de Almeida Lacerda², Félix H.D. González¹.

(Veterinary Clinical Pathology, Qualis B1, Fator de impacto 1,273).

¹ Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Médico Veterinário Autônomo, Porto Alegre, Brasil.

* Correspondence: camilaslata@gmail.com

Resumo: Durante o armazenamento, os concentrados de plaquetas sofrem diversas modificações, entre elas a diminuição do pH. Sendo o pH um importante marcador no controle de qualidade dos concentrados de plaquetas, foram feitas comparações entre 3 diferentes métodos de avaliação em concentrados de plaquetas caninas. Os concentrados de plaquetas foram obtidos a partir do método do plasma rico em plaquetas. Deste, foram retiradas alíquotas e o pH foi mensurado através de pHmetro, analisador de gases e fita colorimétrica. Esse estudo confirmou que existe uma diferença significativa entre os 3 métodos de avaliação de pH comparados, sugerindo que o uso da fita colorimétrica pode levar ao uso indevido de hemocomponentes.

Palavras-chave: controle de qualidade de hemocomponentes, lesão de estoque plaquetário, phmetro, hemogasometro, fita colorimétrica.

INTRODUÇÃO

O concentrado de plaquetas (CP) é o hemocomponente com maior dificuldade de armazenamento nos bancos de sangue, pois é viável por apenas 5 a 7 dias. É recomendado o armazenamento à temperatura ambiente (20 a 24°C), sob agitação constante (Ohto, H. e Nollet, K. E., 2011). Além da possibilidade de contaminação bacteriana, um dos principais problemas é a degradação do CP, devido às chamadas “lesões de armazenamento”. Essas lesões referem-se a mudanças progressivas observadas durante o armazenamento, que incluem diminuição do pH, devido ao acúmulo de lactato; alterações da forma, passando de discoide a esférica; e decréscimo da capacidade de agregação. Como consequência, ocorre diminuição da função e da viabilidade plaquetária pós-transfusão (Yuasa *et al.*, 2004; Dekkers *et al.*, 2007; Schubert e Devine, 2010; Ohto, H. e Nollet, K. E., 2011).

Durante o processamento e armazenamento a temperatura ambiente as plaquetas mantêm sua taxa metabólica de forma bastante ativa, consumindo energia e acumulando metabólitos como lactato, que leva a diminuição do pH. Também é relatada ativação plaquetária durante o processamento e armazenamento, que demanda muita energia das células, havendo aumento do metabolismo anaeróbico, em que a glicose é metabolizada a lactato, levando ao acúmulo de H⁺. Assim, os valores de pH são comumente utilizados na rotina de bancos de sangue como importantes marcadores no controle de qualidade *in vitro* do CP (Gulliksson, 2003; Gyongyossy-Issa, 2011; Gulliksson *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 2013).

A presença de bicarbonato no plasma tem um efeito tamponante, com a conversão de H⁺ produzido na glicólise em CO₂ e H₂O. Estudos demonstraram que plaquetas armazenadas em soluções aditivas sintéticas livres de glicose e com baixa concentração de bicarbonato não conseguem manter sua função e níveis energéticos adequados, indicando que há necessidade de glicose para manutenção do metabolismo energético, assim como bicarbonato e fosfato

para neutralizar o baixo pH provocado pelos altos níveis de lactato (Gulliksson *et al.*, 2003; Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006).

A mensuração do pH extracelular é a técnica mais utilizada nos bancos de sangue humanos e veterinários como forma de avaliar a eficácia dos métodos de processamento e estoque em manter a atividade metabólica das plaquetas estocada. A avaliação da qualidade plaquetária é normalmente realizada usando testes laboratoriais, como pH e análise microbiológica (Tynngård, 2009; Gkoumassi *et al.*, 2013). Além disso, é feita a avaliação do *swirling* plaquetário, cuja técnica consiste em uma avaliação visual do CP, contra a luz, onde é observada a movimentação (turbilhão) das plaquetas (Bertolini *et al.*, 2000; Mathai *et al.*, 2006). Um CP de ótima qualidade apresenta *swirling* adequado, indicando que as plaquetas não perderam sua forma e não sofreram alterações morfológicas; apresenta manutenção do pH ($\leq 6,2$) e análise microbiológica negativa durante o armazenamento (Bertolini *et al.*, 2000; Karnicki *et al.*, 2003).

A importância de um teste preciso para determinação do pH antes da utilização de um CP fica evidente ao analisar o resultado de estudo que propôs identificar os melhores indicadores de viabilidade pós transfusional em CPs humanos e o pH, e em segundo lugar a produção de lactato foram os parâmetros que apresentaram correlação mais forte com a sobrevivência plaquetária (Goodrich *et al.*, 2006). Os pesquisadores recomendam que estes parâmetros sejam utilizados de forma conjunta, como forma de manter a biossegurança na escolha da unidade transfundida (Evaluation of stored platelets, 2004; Kaufman, 2006; Barker *et al.*, 2010).

Existem diversos métodos para se quantificar o pH, como pHmetro, analisador de gases e fita colorimétrica, sendo esta última a mais utilizada na rotina de bancos de sangue. Hipotetizamos que existem diferenças significativas entre os métodos comumente utilizados.

O objetivo do presente estudo é comparar três métodos de quantificação do pH em CPs caninos, durante 5 dias, armazenados sob condições padrão de banco de sangue segundo a AABB (Kaufman *et al.*, 2015).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados 22 CPs caninos obtidos a partir do método do plasma rico em plaquetas (PRP), sendo cada bolsa de sangue total (CPD/SAGM, JP Indústria Farmacêutica, São Paulo, Brasil), submetida à centrifugação leve (1.600 g) por 6 minutos a 22°C (Centrífuga Sorvall Legend RT +, Thermo Scientific, MA, USA), permitindo a separação do PRP dos eritrócitos. Em seguida o PRP foi retirado através de um extrator (Extrator de plasma manual, ACS201, Terumo Medical do Brasil, SP, BRA) e em seguida submetido a uma segunda centrifugação (3.300 g) por 8 minutos a 22°C (Centrífuga Sorvall Legend RT, Sorvall/Thermo, MA, USA), e deste foi retirado o plasma, permanecendo na bolsa aproximadamente 60 mL, constituindo o CP. As bolsas de CP canino foram mantidas em repouso por 1 hora e então armazenadas sob temperatura controlada (20 – 24°C) em agitação constante em incubadora com 60 a 70 ciclos por minuto (câmara ambientadora de plaquetas CDCI 03, Indrel, SP, BRA; agitador de plaquetas linear AP48L, Presvac, ARG). Alíquotas foram obtidas através de cânulas para coleta (Sampling Site Coupler, Fenwal, IL, USA), no primeiro dia de estoque. O uso dos animais teve permissão do proprietário, que foi devidamente alertado sobre os riscos do procedimento, de acordo com conceitos de bioética aplicados à pesquisa animal (Ellery, 1985). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS (Protocolo de aprovação CEUA/UFRGS nº 26102).

pHmetro

Após calibração do pHmetro HI 9126 (Hanna Instruments Inc., RI, USA) em pH 4,01 e 7,01, conforme instruções do fabricante, cerca de 1,5 mL de CP canino foi transferido para tubos de vidro de 10 mL, onde imediatamente mergulhou-se o eletrodo HI 1414D e através deste foi determinado o pH.

Analizador de gases

A determinação do pH foi realizada com um analisador de gases portátil (iStat, Abbott Point of Care, ON, CAN) de acordo com as instruções do fabricante. Para este estudo foi utilizado o cartucho CG8 (Abbott Point of Care, ON, CAN), mantido em temperatura ambiente por 30 minutos até a utilização. Em seguida uma alíquota de CP foi obtida apenas quando o cartucho encontrava-se pronto para uso, quando esta foi inserida no cartucho e este foi introduzido no analisador de gases para determinação do pH. As análises foram realizadas a 37°C e por este motivo foi utilizado um cálculo de conversão do pH para leitura a 22°C, conforme descrito por (Johnson *et al.*, 2013).

Fita colorimétrica

Para este método, mergulhou-se a fita colorimétrica (Macherey-Nagel, Düren, DEU) no tubo contendo a amostra de CP canino, retirando-a logo em seguida. Após 1 minuto foi feita a leitura do pH com o auxílio de uma faixa colorimétrica fornecida pelo fabricante.

Análise estatística

Para comparar os valores de pH obtidos nos diferentes métodos foi realizada ANOVA seguida pelo teste de Tukey. As análises foram executadas em um programa comercial software (GraphPadPrism 6.0, GraphPad Software - CA, USA), com nível de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lesões de armazenamento fazem parte de um processo complexo, influenciado por muitos fatores. Um desses é a diminuição do pH durante o estoque. Tendo em vista que a deterioração do concentrado de plaquetas está relacionada com a acidificação do meio, é importante que seja feita uma avaliação precisa do pH, através de métodos confiáveis (Dekkers *et al.*, 2007; Barker *et al.*, 2010).

A Tabela 1 mostra as médias e desvio padrão (DP) observados em cada método. Esse estudo confirmou que existe uma diferença significativa entre os 3 métodos de avaliação de pH comparados. Diferença significativa foi encontrada entre os métodos da fita colorimétrica e o pHmetro ($p=0,0194$), e entre a fita colorimétrica e o analisador de gases ($p < 0,0001$).

A fita colorimétrica tem como vantagens a sua rapidez e o baixo custo. Porém, por se tratar de um teste de comparação colorimétrica, não é possível estabelecer um valor exato de pH e sim uma faixa, ao contrário do pHmetro e do analisador de gases, que fornecem resultado com até três casas decimais. Outra limitação deste método inclui o fato das fitas serem afetadas por condições de iluminação, pela percepção de quem realiza o teste, havendo uma influência subjetiva de leitura. Devido a essas influências, não se obtém uma reprodutibilidade confiável, induzindo a resultados errôneos que podem levar à utilização do hemocomponente em condições inadequadas. Assim, poderá não se obter os resultados terapêuticos desejados. Apesar de todas estas desvantagens, atualmente é o método mais utilizado na rotina. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) recomenda que as fitas utilizadas sejam validadas por teste comparativo com equipamentos para determinação do pH e que, antes do início da rotina, seja sempre efetuado um controle da fita com um padrão conhecido (Anvisa, 2004; 2014a).

O analisador de gases é um aparelho extremamente confiável, utilizado para avaliação de gases e de pH sanguíneo. O uso de equipamentos automatizados minimiza erros e fornece

resultados mais exatos, sendo considerado, juntamente com o pHmetro, teste padrão-ouro para confirmação dos resultados (Anvisa, 2014a). Existem poucas referências sobre sua utilização na avaliação do pH de CPs em bancos de sangue, provavelmente devido ao seu elevado custo. Para este fim, o equipamento é mais frequentemente usado em pesquisas, pois a mensuração através deste método é rápida e confiável (Mikkelsen *et al.*, 2015). Uma limitação do analisador de gases é que os equipamentos possuem uma faixa de leitura, que no caso do modelo utilizado neste estudo é de 6,5. Caso a mensuração fique abaixo desta faixa não haverá leitura, o que pode ocorrer nos últimos dias de armazenamento do CP.

O pHmetro é um instrumento concebido para buscar medidas confiáveis de um parâmetro de grande aplicabilidade prática. Apesar de ser um equipamento muito confiável e de ótima reprodutibilidade, necessita calibração e manutenção adequadas e periódicas, tornando menos prática e frequente a sua utilização em bancos de sangue. Além disso, as análises devem ser feitas em um pHmetro que possa fazer leitura de pequenos volumes. Por sua confiabilidade, é um equipamento bastante utilizado em pesquisa (Vela *et al.*, 2001).

Existe ainda um novo método que permite a mensuração do pH de maneira menos invasiva, o pH safe, cuja técnica, de fácil execução oferece a possibilidade de se verificar a qualidade plaquetária antes da transfusão. Como desvantagem, o pH safe necessita um detector de fibra óptica fluorescente e bolsa de sangue específica, além de estar disponível para comercialização apenas na Europa (Doescher e Muller, 2013).

As agências de vigilância de cada país possuem diferentes requerimentos em relação ao controle de qualidade dos hemocomponentes. Em relação ao CP, a *American Association of Blood Banks* (AABB) orienta que pelo menos 90% das bolsas apresentem pH superior a $\geq 6,2$ no período final de armazenamento. O Conselho Europeu recomenda testar 1% de toda a produção ou no mínimo 4 unidades a cada mês (o que for maior), sendo que os valores de pH

devem estar entre 6,4 e 7,4 em pelo menos 90% destas. No Brasil, a Anvisa orienta que sejam amostradas 1% da produção mensal ou no mínimo 10 unidades/mês (o que for maior) e que, ao final do período de estoque o pH seja superior a 6,4. A AABB chama a atenção em relação ao uso da fita e, apesar de não proibir o mesmo, salienta que quando utilizada, a fita deve fornecer informação de, no mínimo uma casa decimal (Kaufman *et al.*, 2015).

CONCLUSÃO

Os resultados do estudo sugerem que o uso da fita colorimétrica resulta em valores médios superiores em relação aos outros métodos; e sua utilização pode levar ao uso indevido do hemocomponente. Sendo assim, é recomendada a implementação da mensuração de pH com uso de pHmetro, já que o analisador de gases necessita de um cálculo de conversão para 22°C e tem um limite de leitura.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Diretrizes para transfusão de plaquetas. In: ANVISA, ed. RDC/ANVIS n° 129. Vol RDC/ANVIS n° 129. Diário Oficial da União, 24 de maio de 2004: Brasil; 2004:13.

ANVISA. Boas práticas no ciclo do sangue. In: ANVISA, ed. RDC N° 34. Vol RDC N° 34. Diário Oficial da União, 11 DE JUNHO DE 2014: Brasil; 2014:39.

Barker LM, Nanassy OZ, Reed MW, et al. Multiple pH measurement during storage may detect bacterially contaminated platelet concentrates. *Transfusion*. 2010;50(12):2731-2737.

Bertolini F, Agazzi A, Peccatori F, Martinelli G, Sandri MT. The absence of swirling in platelet concentrates is highly predictive of poor posttransfusion platelet count increments and increased risk of a transfusion reaction. *Transfusion*. 2000;40(1):121-122.

Dekkers DWC, De Cuyper IM, Van Der Meer PF, Verhoeven AJ, De Korte D. Influence of pH on stored human platelets. *Transfusion*. 2007;47(10):1889-1895.

Doescher A, Muller TH. Noninvasive pH Monitoring in Platelet Concentrates. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(2):88-92.

Ellery AW. Guidelines for specification of animals and husbandry methods when reporting the results of animal experiments. Working Committee for the Biological Characterization of Laboratory Animals/GV-SOLAS. *Lab Anim*. 1985;19(2):106-108.

Gyongyossy-Issa MI. Glucose in platelet additive solutions: to add or not to add? *Transfus Apher Sci*. 2011;44(3):283-295.

Gkoumassi E, Klein-Bosgoed C, Dijkstra-Tiekstra MJ, de Korte D, de Wildt-Eggen J. Noninvasive pH monitoring of platelet concentrates: a large field test. *Transfusion*. 2013;53(10):2287-2292.

Gulliksson H, AuBuchon JP, Cardigan R, et al. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sanguinis*. 2003;85(3):199-205.

Gulliksson H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfusion Medicine Reviews*. 2003;17(3):209-215.

Gulliksson H, Sandgren P, Sjodin A, Hultenby K. Storage of platelets: effects associated with high platelet content in platelet storage containers. *Blood Transfus*. 2012;10(2):205-212.

Goodrich RP, Li J, Pieters H, Crookes R, Roodt J, Heyns AuP. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sang*. 2006;90(4):279-285.

Johnson L, Loh YS, Kwok M, Marks DC. In vitro assessment of buffy-coat derived platelet components suspended in SSP+ treated with the INTERCEPT Blood system. *Transfusion Medicine*. 2013;23(2):121-129. Karnicki K, Johnson C, St Cyr J, Ericson D, Rao G. Platelet storage solution improves the in vitro function of preserved platelet concentrate. *Vox Sanguinis*. 2003;85(4):262-266.

Kaufman RM. Platelets: testing, dosing and the storage lesion--recent advances. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:492-496.

Mathai J, Resmi KR, Sulochana PV, Sathyabhama S, Baby Saritha G, Krishnan LK. Suitability of measurement of swirling as a marker of platelet shape change in concentrates stored for transfusion. *Platelets*. 2006;17(6):393-396.

Mikkelsen S, Wolsing-Hansen J, Nybo M, Maegaard CU, Jepsen S. Implementation of the ABL-90 blood gas analyzer in a ground-based mobile emergency care unit. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2015;23:54.

Ohto H, Nollet KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci*. 2011;44(3):321-325.

Ringwald J, Zimmermann R, Eckstein R. The New Generation of Platelet Additive Solution for Storage at 22°C: Development and Current Experience. *Transfusion Medicine Reviews*. 2006;20(2):158-164.

Saunders C, Rowe G, Wilkins K, Collins P. Impact of glucose and acetate on the characteristics of the platelet storage lesion in platelets suspended in additive solutions with minimal plasma. *Vox Sang*. 2013;105(1):1-10.

Schubert P, Devine DV. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. *Blood Transfus*. 2010;8 Suppl 3:s69-72.

Tynngård N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. *Transfusion and Apheresis Science*. 2009;41(2):97-104. Yuasa T, Ohto H, Yasunaga R, Kai T, Shirahama N, Ogata T. Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *Br J Haematol*. 2004;126(1):153-159.

Vela MF, Camacho-Lobato L, Srinivasan R, Tutuian R, Katz PO, Castell DO. Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole. *Gastroenterology*. 2001;120(7):1599-1606.

Tabela 1. Análise descritiva e teste de Tukey das diferentes formas de mensuração de pH.

<i>Método</i>	<i>Média ± DP</i>	<i>Variância</i>
Analisador de gases (22°)	6,8239 ± 0,2179 ^a	0,047516
Phmetro	6,9681 ± 0,3898 ^{a*}	0,151958
Fita	7,1863 ± 0,0639 ^{b*}	0,004090

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes (p<0,05).

*Representa valores significativamente diferentes (p<0,001).

SHORT COMUNICACION 2

Análise da viabilidade mitocondrial em concentrados de plaquetas: modelo canino

Analysis of mitochondrial viability in platelets concentrates: a canine model

Camila Serina Lasta^{1*}, Nicole Hlavac¹, Natália Aydos Marcondes², Sílvia Rezende Terra³, Magnus Larruscain Dalmolin⁴, Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber², Félix H.D. González¹.

(BMC Veterinary Research; Qualis B1, Fator de Impacto 2,815).

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³ Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Brasil.

⁴ Blut's Centro de Diagnóstico e Serviços Veterinários, Porto Alegre, Brasil.

* Correspondence: camilaslata@gmail.com

RESUMO

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela manutenção do balanço energético das plaquetas e participam na regulação de funções celulares como apoptose. Concentrados de plaquetas gradativamente perdem função e viabilidade, limitando o tempo de estoque. O objetivo deste trabalho foi comparar dois testes para avaliar a viabilidade de mitocôndrias de plaquetas caninas estocadas. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos do concentrado de plaquetas estocados por cinco dias e realizada a análise da viabilidade mitocondrial por citometria de fluxo com as sondas fluorescentes JC-1 e Mitotracker. A diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) ao longo do período de armazenamento foi evidenciada pelas duas metodologias utilizadas, bem como pelos demais parâmetros avaliados. Em conclusão, as mitocôndrias das plaquetas caninas, quando estocadas, sofrem

mudanças similares às aquelas observadas em plaquetas humanas, as quais podem estar relacionadas com a diminuição da viabilidade plaquetária pós-transfusional. As sondas fluorescentes JC-1 e Mitotracker foram indicadores confiáveis e sensíveis na avaliação de mitocôndrias de plaquetas caninas.

Keywords: platelet storage lesion, mitochondria, apoptosis, JC-1, mitotracker.

INTRODUÇÃO

Durante o armazenamento as plaquetas sofrem alterações estruturais, bioquímicas e funcionais, chamadas de lesões plaquetárias de armazenamento (PSL), relacionadas com diminuição da meia-vida e da funcionalidade plaquetária após a transfusão (Ohto, 2011; Hayashi *et al.*, 2011). As mitocôndrias são organelas responsáveis por diversos processos catabólicos, cumprindo função fundamental no metabolismo energético celular (Lehninger, 2012; Galluzzi *et al.*, 2013). A produção de ATP é fundamental na manutenção da qualidade das plaquetas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Qualquer alteração da cadeia respiratória mitocondrial pode favorecer a produção de espécies reativas de oxigênio que danificam a membranas da organela (Cookson *et al.*, 2010; Gyulhandanyan *et al.*, 2012; 2013). Os mecanismos utilizados pelos macrófagos e células endoteliais no reconhecimento e fagocitose de plaquetas senescentes também participam da ativação das vias de sinalização de apoptose. Neste contexto, as mitocôndrias são organelas que desempenham um papel chave na regulação deste processo (Pereira *et al.*, 2002; Cookson *et al.*, 2010). A diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) leva ao aumento da permeabilidade mitocondrial e, como consequência, a redução da síntese de ATP (Gulbins, 2003; Cookson *et al.*, 2010; Gyulhandanyan *et al.*, 2012, 2013). O desacoplamento da cadeia respiratória e a presença de poros na membrana mitocondrial leva a liberação da proteína citocromo c para o citoplasma,

formando um complexo denominado apoptossomo. Este complexo ativa a caspase 9, que na sequência ativa a caspase 3, responsável direta pela indução do processo de apoptose (intrínseca/extrínseca) (Wolf *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2001).

A preservação da função mitocondrial da plaqueta está diretamente relacionada com a qualidade do concentrado de plaquetas (CP). A despolarização mitocondrial é um sinal precoce de apoptose plaquetária, sendo assim um marcador bastante sensível no controle de qualidade de um banco de sangue (Verhoeven *et al.*, 2005; Gyulhandanyan *et al.*, 2012; 2013). Tradicionalmente, as mitocôndrias plaquetárias são avaliadas de acordo com seu $\Delta\Psi_m$, através do marcador JC-1 (5,5',6,6' tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianina) (Verhoeven *et al.*, 2005; Cookson *et al.*, 2010; Dasgupta *et al.*, 2010; Skripchenko *et al.*, 2010, 2011). A sonda fluorescente JC-1 é uma molécula monomérica permeável à membrana mitocondrial. Em mitocôndrias funcionais (alto $\Delta\Psi_m$), o JC-1 acumula no interior da organela e forma agregados que emitem fluorescência vermelha (canal FL2). Em mitocôndrias danificadas (baixo $\Delta\Psi_m$), o JC-1 não acumula, mantendo a forma de monômero que emite fluorescência verde (canal FL1). Assim, a formação e manutenção de 'JC1-agregados' no interior da mitocôndria é dependente do gradiente eletroquímico, ou seja, esta sonda fluorescente permite avaliar o $\Delta\Psi_m$ de maneira direta e a morte celular de maneira indireta, uma vez que este evento fisiológico está associado à perda de função desta organela (Cossarizza, 1993; Verhoeven *et al.*, 2005).

Outra técnica utilizada para a avaliação mitocondrial são as sondas fluorescentes MitoTracker Green (MTG) e MitoTracker Red (MTR), que revelam mitocôndrias em *swelling* e mitocôndrias funcionais (alto $\Delta\Psi_m$), respectivamente. As sondas MTG e MTR são amplamente utilizadas para marcar as mitocôndrias de células vivas por citometria de fluxo ou por visualização em microscopia. O MTG emite fluorescência verde (canal FL1) e tem

afinidade pelos lipídios de membranas das mitocôndrias, enquanto o MTR emite fluorescência vermelha (canal FL3) e tem afinidade por mitocôndrias que possuem $\Delta\psi_m$ ativo. A utilização de ambas permite quantificar o *swelling* e a atividade mitocondrial, respectivamente. Quando a intensidade de fluorescência do MTR é maior do que a do MTG, o resultado pressuposto é de manutenção da atividade mitocondrial da célula. Ao contrário, quando a intensidade de fluorescência do MTG é maior do que a do MTR, o resultado pressuposto é a perda de função e o *swelling* mitocondrial, situação que caracteriza dano da organela e geralmente acarreta em morte celular (Agnello *et al.*, 2008).

As PSL envolvem uma série de alterações bioquímicas ligadas à diminuição do $\Delta\psi_m$, falência metabólica, lise da membrana e liberação de componentes citoplasmáticos como a enzima lactato desidrogenase (LDH) e por fim apoptose ou necrose plaquetária. Com o aumento do interesse sobre o envolvimento da apoptose nas PSL, métodos que permitam maior compreensão destes mecanismos têm despertado interesse (Kinnally e Antonsson, 2007; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; 2013). Além disso, este é o primeiro trabalho que utiliza as sondas MTG e MTR na avaliação mitocondrial de plaquetas. O objetivo deste trabalho foi analisar durante um período de estoque de cinco dias, as alterações bioquímicas e a atividade mitocondrial de plaquetas caninas utilizando por citometria de fluxo as sondas fluorescentes JC1 e Mitotracker.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizados 22 CP caninos obtidos através do método do plasma rico em plaquetas (PRP) (Lasta *et al.*, dados não publicados). Alíquotas do CP foram obtidas nos dias 1, 3 e 5 após a coleta da bolsa de sangue através de cânula para coleta (Sampling Site Coupler,

Fenwal, IL, USA) (Wang *et al.*, 1999; Curvers *et al.*, 2004). Este estudo foi provado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS - Protocolo de aprovação nº 26102).

Parâmetros metabólicos

Parâmetros básicos de qualidade do CP como contagens e características morfoestruturais foram obtidas por impedância com um analisador hematológico automático veterinário (PocH-100iV Diff, Sysmex, IL, USA). A contagem de leucócitos residuais foi realizada de forma manual em câmara de Nageotte (LO-Laboroptik GmbH, BH, DE), no dia 1 de avaliação (Gulliksson *et al.*, 2012). A avaliação do metabolismo foi realizada pela mensuração do pH (pHmetro HI 99171, Hanna Instruments Inc., RI, USA). A concentração de glicose foi dosada em um analisador de gases portátil (iStat, Abbott Point of Care, NJ, USA). As determinações de lactato e LDH foram realizadas através de química seca (Vitros 250 Chemistry System, Johnson & Johnson, SP, BRA). As taxas de consumo de glicose e consequente produção de lactato foram calculadas de acordo com a determinação de cada parâmetro e do número de plaquetas por μL em cada unidade de CP (Gulliksson *et al.*, 2012). Os níveis de adenosina-5'-trifosfato (ATP) foram determinados com o kit *ATP Lite* (Luminescence ATP Detection Assay System – PerkinElmer, Waltham, MA, USA) e as leituras foram obtidas em leitor de microplaca multi-modo (Spectramax M5, Molecular Devices Inc., CA, USA).

Ensaio por citometria de fluxo

A marcação com o anticorpo monoclonal CD61 foi realizada a fim de confirmar a posição de plaquetas. As amostras foram diluídas até uma concentração padrão de 500×10^3 plaquetas por μL e colocadas em tubos de poliestireno, sendo submetidas à marcação com $1 \mu\text{L}$ do

anticorpo monoclonal (MoAb) CD61 FITC (clone VI-PL2 - BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) - que reage de forma cruzada com plaquetas caninas (Wilkerson e Shuman, 2001; Pereira *et al.*, 2002) durante 15 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. As amostras foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para análise imediata.

BD™ MitoScreen JC-1 Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) foi usado para avaliar o $\Delta\Psi_m$. As amostras de CP foram diluídas até uma concentração padrão de 5000×10^3 plaquetas por μL , colocadas em tubos de poliestireno e incubadas com JC-1 durante 15 minutos à 37°C , protegidos da luz. As amostras foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS.

Para avaliação com MTG e MTR, 500×10^3 plaquetas por μL foram colocadas em tubos de poliestireno e incubadas com 1 μL da solução de trabalho de cada reagente - MTG e MTR (MitoTracker Green FM & MitoTracker Red CMXRos - Invitrogen, Carisbad, CA, EUA) a 37°C durante 45 minutos no escuro. As amostras foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS.

Um total de 30000 eventos de cada tubo foi adquirido em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). A população de plaquetas foi selecionada de acordo com as características de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) utilizando o software CellQuest™ Pro (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), quando micropartículas e restos celulares foram excluídos da análise. O grau de despolarização da membrana mitocondrial e de *swelling* mitocondrial foram quantificados por percentual de plaquetas marcadas de acordo com a mudança de emissão de fluorescência no canal FL2

para FL1. Posteriormente, todas as amostras foram analisadas com o software FCS Express 5 (De Novo, Software, ON, CAN).

Análise Estatística

Análise estatística foi realizada com teste de ANOVA para medidas repetidas, teste post hoc de Duncan e Correlação de Pearson. As análises foram executadas em software comercial (GraphPadPrism 6.0, GraphPad Software, CA, EUA), diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas significativas. A correlação entre os parâmetros foi considerada significativa quando $P < 0,05$ e considerada significativa e forte quando $P < 0,001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a viabilidade mitocondrial de plaquetas caninas armazenadas em concentrados de plaquetas sob condição de banco de sangue (Shrivastava, 2009; Van der Meer, 2011), por cinco dias. Parâmetros metabólicos foram dosados nos dias 1, 3 e 5 e duas técnicas de avaliação mitocondrial foram utilizadas. A Tabela 1 mostra a Correlação de Pearson entre os resultados obtidos com as sondas JC-1 e MitroTracker, utilizadas para avaliar $\Delta\psi_m$ e *swelling* e a correlação das mesmas com parâmetros metabólicos.

De acordo com a análise do $\Delta\psi_m$ pelo JC-1, houve despolarização das mitocôndrias durante o armazenamento das plaquetas a 22°C por 5 dias ($P=0.0019$). A diminuição do $\Delta\psi_m$ tornou-se evidente com o deslocamento da população celular do canal FL2 para o canal FL1 (Figura 1). Alguns estudos sugerem que a perda do $\Delta\Psi_m$ é o marcador mais sensível de qualidade plaquetária durante o estoque, pois sinaliza o começo do processo de apoptose, antes mesmo da ativação da via das caspases ou da exposição da fosfatidilserina (Verhoeven *et al.*, 2005; Albanyan *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2011). Pereira *et al.* (2002) avaliaram os fenômenos de ativação e apoptose em plaquetas caninas após supressão da

plaquetogênese e observam que o envelhecimento das plaquetas *in vivo* está associado com a diminuição da função mitocondrial e a exposição de fosfatidilserina. O $\Delta\psi_m$ das plaquetas caninas mostrou-se estável ($P=0.5072$) do primeiro ao terceiro dia de armazenamento. Foi observada uma diminuição entre os dias 1 e 5 ($P=0.0016$) e 3 e 5 ($P=0.0373$). Verhoeven *et al.* (2005) afirmam que a diminuição do $\Delta\psi_m$ ocorre nos últimos dias de armazenamento, ou em plaquetas armazenadas por períodos superiores há 5 dias. Em plaquetas caninas armazenadas sob condição padrão de banco de sangue a diminuição ocorreu a partir do terceiro dia. Além de possíveis diferenças interespecíes, o método de obtenção do CP pode ter influenciado os resultados, já que os estudos que avaliam $\Delta\psi_m$ de plaquetas humanas normalmente utilizam metodologias diferentes para a obtenção do CP, como aférese e buffy-coat (Perrotta *et al.*, 2003; Verhoeven *et al.*, 2005), enquanto neste trabalho foi utilizada a metodologia do PRP.

Foi observada correlação significativa forte ($P<0.001$) entre a diminuição do $\Delta\psi_m$ e parâmetros metabólicos deletérios como diminuição do pH, do *swirling*, e consumo de glicose. Durante o armazenamento ocorre *swelling* plaquetário, que leva a ruptura da membrana, formação de micropartículas e consequente liberação de enzimas como a LDH (Gulliksson *et al.*, 2012). Correlação significativa foi observada entre diminuição do $\Delta\psi_m$ e liberação de LDH ($P<0.001$), comumente utilizado para determinar ruptura e morte plaquetária, confirmando a importância da mitocôndria no processo de senescência plaquetária.

A avaliação com a sonda MTR corroborou com os dados obtidos com JC-1, refletindo as mudanças do $\Delta\psi_m$ das plaquetas armazenadas a partir do terceiro dia. Observamos clara correlação entre os resultados obtidos com JC-1 – considerado padrão ouro – e MTR ($P=0.000138$). Foi confirmada a diminuição do $\Delta\psi_m$ entre os dias 1 e 5 e os dias 3 e 5

($P < 0.001$). Assim como observado com o uso de JC-1, MTR apresentou correlação significativa forte ($P < 0.0001$) com os mesmos parâmetros metabólicos descritos acima (Tabela 2). Todos esses dados em conjunto indicam que a diminuição do $\Delta\psi_m$ está relacionada com tempo de armazenamento (Devine e Serrano, 2010; Gyongyossy-Issa, 2011).

A avaliação mitocondrial foi complementada com sondas fluorescentes MTG e MTR - utilizadas pela primeira vez em plaquetas caninas. O deslocamento da população plaquetária em direção a uma maior intensidade de fluorescência verde (MTG) pressupõe a ocorrência de *swelling* mitocondrial. O *swelling* mitocondrial reflete alterações na membrana interna da mitocôndria, que aos poucos perde as cristas tubulares, expande de volume perde a capacidade de geração de energia (Kinnally *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2014). Segundo Michimura *et al.* (2011), o edema mitocondrial é necessário para a liberação de citocromo c durante a via intrínseca da apoptose. Ou seja, quando as plaquetas começam a entrar em apoptose é observado um aumento da fluorescência verde, devido o *swelling* mitocondrial (Agnello *et al.*, 2008). Esse deslocamento da fluorescência verde (MTG) ao longo do tempo acompanhou a diminuição da fluorescência vermelha (MTR) (Figura 2). O deslocamento em direção à fluorescência verde (MTG) ocorreu entre os dias 3 e 5 ($P = 0.004$). No quinto dia de armazenamento a sonda MTG apresentou correlação significativa negativa com indicadores de viabilidade plaquetária, como *swirling*, pH e concentração de glicose; e correlação significativa positiva com concentração de lactato e liberação de LDH ($P < 0.001$). Confirmamos que o *swelling* mitocondrial está inversamente relacionado com a produção de energia, avaliada através da dosagem de ATP ($P < 0.05$).

A mitocôndria é a responsável pela produção de ATP, sendo a quantidade de ATP produzida proporcional ao número de mitocôndrias funcionais presentes. Foi possível

confirmar a relação negativa entre $\Delta\psi_m$ (em ambos testes) e produção de ATP ($P<0.05$). O entendimento deste processo está intimamente relacionado ao ‘Efeito Warburg’ que se refere à capacidade das plaquetas de realizar glicólise anaeróbica (resultando na produção de lactato) em paralelo com a oxidação aeróbica; ou seja, conforme a mitocôndria perde $\Delta\psi_m$ e há diminuição da produção de ATP pela via mais rentável, o metabolismo plaquetário volta-se para a produção de energia através da glicólise anaeróbica, resultando em maior produção de lactato, que levará á queda do pH e diminuição do *swirling*.

CONCLUSÃO

Os resultados das duas técnicas de avaliação da viabilidade mitocondrial permitem afirmar que com a associação das sondas MTG e MTR é possível obter informação não apenas a respeito do $\Delta\psi_m$, mas também do *swelling* mitocondrial. A sonda fluorescente JC-1 foi eficiente somente para demonstrar a perda do $\Delta\psi_m$ ao longo do tempo de estoque plaquetário. Com base nos resultados obtidos, o uso das sondas fluorescentes MTG e MTR oferece uma análise mitocondrial mais completa na avaliação de concentrados de plaquetas caninos. Destaca-se também a simplicidade da realização dos testes em detrimento da qualidade da informação fornecida por eles. Na opinião dos autores, MTR foi considerado tão fidedigno quanto o clássico JC-1, considerado padrão ouro na avaliação do $\Delta\Psi_m$ em plaquetas estocadas sob condições de banco de sangue. Estes testes auxiliam no entendimento dos mecanismos envolvidos com as lesões de estoque e apoptose plaquetária em cães, e podem ser uma ferramenta valiosa para na avaliação das PSL e também de outras doenças ou tratamentos que envolvam alterações no metabolismo mitocondrial.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLO, M.; MORICI, G.; RINALDI, A. M. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*, v. 56, n. 3, p. 145-9, Mar 2008. ISSN 0920-9069 (Print)

ALBANYAN, A. M.; HARRISON, P.; MURPHY, M. F. Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis- and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. *Transfusion*, v. 49, n. 1, p. 108-17, Jan 2009. ISSN 0041-1132.

APPLEMAN, E. H. et al. Cryopreservation of canine platelets. *J Vet Intern Med*, v. 23, n. 1, p. 138-45, Jan-Feb 2009. ISSN 0891-6640 (Print) 0891-6640.

CALLAN, M. B.; APPLEMAN, E. H.; SACHAIS, B. S. Canine platelet transfusions. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, v. 19, n. 5, p. 401-15, Oct 2009. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821881> >.

COOKSON, P. et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution. *Transfusion Medicine*, v. 20, n. 6, p. 392-402, 2010. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2010.01034.x> >.

COSSARIZZA, A. et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, v. 197, n. 1, p. 40-5, Nov 30 1993. ISSN 0006-291X (Print)

CURVERS, J. et al. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion*, v. 44, n. 1, p. 49-58, 2004. ISSN 1537-2995.

DASGUPTA, S. K. et al. Platelet senescence and phosphatidylserine exposure. *Transfusion*, v. 50, n. 10, p. 2167-75, Oct 2010. ISSN 0041-1132.

Galluzzi, L., et al., Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res*, 2012. 111(9): p. 1198-207.

GULBINS, E.; DRESCHERS, S.; BOCK, J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol*, v. 88, n. 1, p. 85-90, Jan 2003. ISSN 0958-0670 (Print)

GYULKHANDANYAN, A. V. et al. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis*, v. 33, n. 4, p. 397-411, May 2012. ISSN 1573-742X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383127> >.

_____. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br J Haematol*, v. 161, n. 2, p. 245-54, Apr 2013. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398569> >.

HAYASHI, T. et al. Role of mitochondria in the maintenance of platelet function during in vitro storage. *Transfusion Medicine*, v. 21, n. 3, p. 166-174, 2011. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2010.01065.x> >.

JOBE, S. M. et al. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood*, v. 111, n. 3, p. 1257-65, Feb 1 2008. ISSN 0006-4971 (Print)

LEAVER, H. A. et al. Calcium-sensitive mitochondrial membrane potential in human platelets and intrinsic signals of cell death. *Platelets*, v. 17, n. 6, p. 368-77, Sep 2006. ISSN 0953-7104 (Print)

LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON, AND M.M. COX, *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. 2013, New York: W.H. Freeman. 1 v. (various pagins).

OHTO, H.; NOLLET, K. E. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci*, v. 44, n. 3, p. 321-5, Jun 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507724> >.

PEREIRA, J. et al. Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost*, v. 87, n. 5, p. 905-9, May 2002. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12038796> >.

PERROTTA, P. L.; PERROTTA, C. L.; SNYDER, E. L. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*, v. 43, n. 4, p. 526-35, Apr 2003. ISSN 0041-1132 (Print)

RAND, M. L.; LEUNG, R.; PACKHAM, M. A. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci*, v. 28, n. 3, p. 307-17, Jun 2003. ISSN 1473-0502 (Print)

SCHUBERT, P.; DEVINE, D. V. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. *Blood Transfus*, v. 8 Suppl 3, p. s69-72, Jun 2010. ISSN 1723-2007 (Print)

SHIMIZU, M. et al. [Whole blood flow cytometry for detection of activated platelets. I. Platelet identification, blood collection and storage]. *Rinsho Byori*, v. 49, n. 4, p. 402-7, Apr 2001. ISSN 0047-1860 (Print)

SKRIPCHENKO, A. et al. Periods without agitation diminish platelet mitochondrial function during storage. *Transfusion*, v. 50, n. 2, p. 390-399, 2010. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02450.x> >.

_____. Mitochondrial dysfunction of platelets stored in first- and second-generation containers is, in part, associated with elevated carbon dioxide levels. *Transfusion*, v. 51, n. 2, p. 371-9, Feb 2011. ISSN 0041-1132.

VERHOEVEN, A. J. et al. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*, v. 45, n. 1, p. 82-9, Jan 2005. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647022> >.

WANG, C. et al. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfus Sci*, v. 20, n. 2, p. 129-39, Apr 1999. ISSN 0955-3886 (Print)

WOLF, B. B. et al. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*, v. 94, n. 5, p. 1683-92, Sep 1 1999. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

Tabela 1. Metabolismo plaquetário (média ± desvio padrão) *in vitro* de plaquetas caninas armazenadas por 5 dias.

Parâmetro	Dia 1	Dia 3	Dia 5
$\Delta\Psi_m$ MT Red (%)	82,0486 ± 10,30 ^{a*}	76,7168 ± 15,23 ^a	51,1068 ± 32,45 ^b
MT Green (%)	9,4691±6,07 ^a	14,4136±9,31 ^a	34,2309±32,25 ^b
$\Delta\Psi_m$ JC-1 (%)	91,8209 ± 3,90 ^a	84,2395 ± 20,48 ^a	55,3773 ± 37,29 ^b

$\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial; MT, Mitotracker.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam valores significativamente diferentes (p< 0,05).

*p<0,001

Tabela 2. Correlações de Pearson dos parâmetros avaliados em plaquetas caninas armazenadas sob condições de banco de sangue durante 5 dias.

Parâmetro	JC-1 $\Delta\Psi_m$	Mito Red $\Delta\Psi_m$	Mito Green Swelling
<i>Swirling</i>	0.797**	0.822**	-0.856**
Glicose (mg/dL)	0.814**	0.723**	-0.754**
Lactato (mg/dL)	-0.837**	-0.735**	0.765**
Taxa de produção de glicose (mmol/10 ¹¹ plaq/dia)	0.677**	0.543**	-0.576**
Taxa de produção de lactato (mmol/10 ¹¹ plaq/dia)	-0.342*	-0.248*	0.328*
pH (22°C)	0.778**	0.695**	-0.752**
ATP ($\mu\text{mol } 10^{11}\text{plaq}^{-1}$)	0.373*	0.356*	-0.428*
JC-1 $\Delta\Psi_m$ (%)	1	0.797**	-0.809**
Mito Red $\Delta\Psi_m$ (%)	0.797**	1	-0.892**
Mito Green (%)	-0.809**	-0.892**	1
LDH (U/I)	-0.657**	-0.595**	0.672**

* P<0.05

** P<0.001

Figura 1. Diminuição do $\Delta\Psi_m$ (JC-1) durante o armazenamento caracterizada pelo deslocamento da população analisada para FL1. Observa-se aumento plaquetas não marcadas na região inferior esquerda indicando a presença de possíveis micropartículas plaquetárias. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 5.

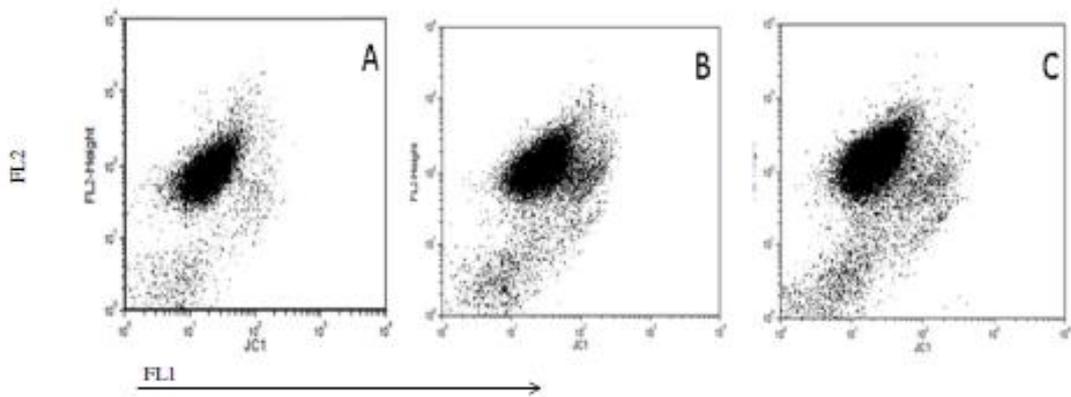
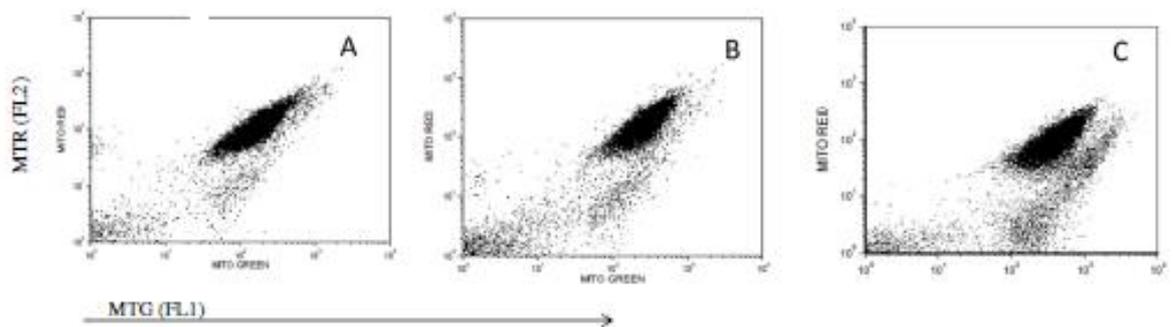


Figura 2. Diminuição do $\Delta\Psi_m$ (MTR) e presença de *swelling* mitocondrial (MTG) durante o armazenamento, caracterizadas pelo deslocamento da população analisada para FL1. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 5.



8. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra a necessidade de padronização das centrifugações para a obtenção de concentrados de plaquetas caninas pelo método do plasma rico em plaquetas. Os resultados apresentados aqui permitem concluir que as técnicas utilizadas na avaliação de CPs humanas podem ser utilizadas em plaquetas caninas com algumas adaptações. De maneira geral, as plaquetas caninas sob condições de armazenamento apresentam comportamento similar àquele observado em plaquetas humanas, como diminuição do pH, glicose, ATP, *swirling* e aumento da concentração de lactato; além das mudanças no $\Delta\Psi_m$ e *swelling* mitocondrial, esta nunca antes descritas em plaquetas caninas.

Apesar de não haver um limite superior da quantidade de plaquetas em um CP, com base nestes resultados, os autores concluem que os CPs caninos não devem conter número excessivo de plaquetas, pois a quantidade elevada de plaquetas tem um caráter deletério e está associada a lesões de armazenamento mais pronunciadas e recentes, como maior consumo de glicose e consequente maior produção de lactato e queda mais rápida do pH, diminuição da quantidade de ATP, além de lesões mitocondriais. Sugere-se que bolsas com contagens superiores a $7,43 \times 10^{10}$ plaquetas/unidade sejam transfundidas em menos de 5 dias.

Os resultados do estudo que comparou os métodos de determinação do pH sugere que a avaliação pela fita colorimétrica pode resultar no uso indevido de hemocomponentes, já que apresentou valores médios superiores em relação aos outros métodos. Sendo assim, é recomendada a implementação da mensuração de pH com uso de pHmetro nos bancos de sangue. Esta medida merece especial atenção no caso de CPs caninos, cujas plaquetas apresentam uma tendência a um metabolismo mais acelerado e consequente queda do pH mais pronunciada.

Concluimos ainda, que as mitocôndrias das plaquetas caninas armazenadas sob condição padrão de banco de sangue sofrem mudanças similares àquelas observadas em plaquetas humanas, as quais podem estar relacionadas com a diminuição da viabilidade plaquetária pós-transfusional; e que a utilização das sondas fluorescentes MitoTracker Red e MitoTracker Green fornecem informações complementares e de relevância na avaliação de mitocôndrias de plaquetas caninas, nunca antes avaliadas por esta técnica.

Ainda há um longo caminho a ser percorrido na medicina veterinária no que concerne à hemoterapia e especialmente à transfusão de plaquetas. O passo inicial é a definição dos parâmetros de qualidade esperados em um CP e o entendimento das lesões de estoque plaquetárias, para que então ocorra a implantação de controle de qualidade padronizado nos serviços de hemoterapia veterinária. Através de avaliação aleatória dos produtos finais de acordo com normas pré-estabelecidas é possível garantir a qualidade do CP aumentando o sucesso transfusional de maneira mais segura e confiável. Ainda, a escolha da melhor solução aditiva para o armazenamento de plaquetas, a utilização de novas tecnologias no processamento das bolsas (aférese, *buffy-coat*), a redução de patógenos e a determinação da viabilidade plaquetária pós-transfusional são campos que merecem ser explorados na medicina veterinária. Ou seja, seguindo as pesquisas referentes aos concentrados de plaquetas em hemoterapia humana, os testes descritos aqui podem ser utilizados em pesquisas futuras sobre o uso de soluções aditivas, inativação de patógenos e também pesquisas que visem analisar a viabilidade das plaquetas pós-transfusão em cães.

APÊNDICES

Apêndice 1: Questionário pré-doação de sangue

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária

Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Av. Bento Gonçalves, 9090. Porto Alegre, RS. 91540-000

Centro Diagnóstico Blut's S/A – Rua Dr. Florêncio Ygartua, 427. Porto Alegre, RS, 90430-110

Contato: 3308-8034 ou 30720427 Cel: 84056791. E-mail: nicole.hlavac@ufrgs.br; camila.lasta@ufrgs.br

NOME DO DOADOR:

IDADE:

SEXO: F M

CASTRADO: SIM NÃO

NOME DO TUTOR:

CANIL:

RAÇA:

1) Possui o animal desde filhote?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
2) O animal recebe todas as vacinas anualmente?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
3) Seu animal recebe vermífugos regularmente?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
4) Alguma outra medicação é utilizada em seu animal?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
5) Seu animal já doou sangue?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
6) Seu animal já recebeu alguma transfusão sanguínea?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
7) Seu animal já esteve em outro estado/ país?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
8) Seu animal já teve algum problema de saúde? (ex. sangramentos)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
9) Seu animal já sofreu alguma cirurgia (com exceção da castração)?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
10) Seu animal já teve algum colapso ou convulsões?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
11) Alguma alteração cardíaca já foi diagnosticada em seu animal?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
12) Notou alguma alteração recente em seu animal? Qual?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO

Obs. As respostas serão analisados pelo médico veterinário responsável pelo projeto.

Assinatura: _____

Data: _____

Data: _____

Apêndice 2: Termo de consentimento para pesquisa e cuidados recomendados após a doação de sangue.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária

Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Av. Bento Gonçalves, 9090. Porto Alegre, RS. 91540-000

Centro Diagnóstico Blut's S/A – Rua Dr. Florêncio Ygartua, 427. Porto Alegre, RS, 90430-110

Contato: 3308-8034 ou 30720427 Cel: 84056791. E-mail: nicole.hlavac@ufrgs.br; camila.lasta@ufrgs.br

TERMO DE CONSENTIMENTO & CUIDADOS APÓS-DOAÇÃO DE SANGUE

Tenha certeza de tomar alguns cuidados para que seu animal não apresente complicações após a doação de sangue.

- ⇒ Permita acesso livre à água potável fresca. Seu animal deve beber aproximadamente 4 xícaras de água adicionais após a doação. Permita que ele tenha acesso à comida normalmente.
- ⇒ Mantenha a bandagem seca e no pescoço do animal por pelo menos 30 minutos e não mais que 1 hora após a doação, este fato pode prevenir lesão, hematomas e edema na região de punção venosa.
- ⇒ Evite fazer pressão sobre o local (próxima à área de punção da veia jugular), como o uso de coleiras que possam lesionar a região, por aproximadamente 12 horas após a doação.
- ⇒ O seu cão pode continuar com suas atividades normais após a doação, mas evite atividades físicas intensas (caminhadas longas, treinamentos e etc).
- ⇒ Se seu cão parecer estar cansado ou desinteressado, permita que ele descanse pelo resto do dia. Se esta letargia continuar por mais de 12 horas, por favor, entre em contato conosco.
- ⇒ Um pequeno hematoma no local da punção pode ser normal. Entretanto, se este o hematoma for muito extenso, se a área estiver muito edemaciada ou dolorida, por favor, entre em contato conosco.

Obrigado por permitir que seu animal participe do nosso projeto.

Data: _____

Apêndice 3: Termo de consentimento para divulgação e utilização de fotos na pesquisa.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária

Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Av. Bento Gonçalves, 9090. Porto Alegre, RS. 91540-000

Centro Diagnóstico Blut's S/A – Rua Dr. Florêncio Ygartua, 427. Porto Alegre, RS, 90430-110

Contato: 3308-8034 ou 30720427 Cel: 84056791. E-mail: nicole.hlavac@ufrgs.br; camila.lasta@ufrgs.br

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA DIVULGAÇÃO DE FOTOS

NOME DO DOADOR:

IDADE:

SEXO: F M

CASTRADO: SIM NÃO

NOME DO TUTOR:

CANIL:

RAÇA:

Eu _____, responsável pelo cão doador _____, dou minha permissão para que a UFRGS utilize qualquer fotografia tirada hoje, do meu cão ou minha, em campanhas de publicidade para educar a população sobre a necessidade de cães doadores.

Assinatura: _____

Data: _____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS-OGG, A. C. Triggers for prophylactic use of platelet transfusions and optimal platelet dosing in thrombocytopenic dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v. 33, n. 6, p. 1401-18, Nov 2003. ISSN 0195-5616. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14664205> >.

ABRAMS-OGG, A. C. G.; SCHNEIDER, A. Principles of canine and feline blood collection processing and storage. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). *Schalm's: Veterinary Hematology*. 6ª. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Ltd, 2010. cap. 94, p.731-737. (Transfusion Medicine).

ABRAMS-OGG, A. G. Platelet and Granulocyte Transfusion. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). *Schalm's: Veterinary Hematology*. 6ª. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Ltd, 2010. cap. 97, p.751 - 756. (Transfusion Medicine).

AGNELLO, M.; MORICI, G.; RINALDI, A. M. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*, v. 56, n. 3, p. 145-9, Mar 2008. ISSN 0920-9069 (Print)

AHMED, A. S.; LEHETA, O.; YOUNES, S. In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates. *Blood Transfus*, v. 8, n. 1, p. 28-35, Jan 2010. ISSN 1723-2007 (Print)

ALBANYAN, A. M.; HARRISON, P.; MURPHY, M. F. Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis- and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. *Transfusion*, v. 49, n. 1, p. 108-17, Jan 2009. ISSN 0041-1132.

ALBANYAN, A. M. et al. Measurement of phosphatidylserine exposure during storage of platelet concentrates using the novel probe lactadherin: a comparison study with annexin V. *Transfusion*, v. 49, n. 1, p. 99-107, Jan 2009. ISSN 0041-1132.

ALHUMAIDAN, H. et al. Manufacture of pooled platelets in additive solution and storage in an ELX container after an overnight warm temperature hold of platelet-rich plasma. *Am J Clin Pathol*, v. 136, n. 4, p. 638-45, Oct 2011. ISSN 1943-7722. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917688> >.

ALHUMAIDAN, H.; SWEENEY, J. Current status of additive solutions for platelets. *J Clin Apher*, v. 27, n. 2, p. 93-8, 2012. ISSN 1098-1101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22298435> >.

AMORINI, A. M. et al. Evaluation of biochemical parameters in platelet concentrates stored in glucose solution. *Blood Transfus*, v. 5, n. 1, p. 24-32, Jan 2007. ISSN 1723-2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204748> >.

ANDONEGUI, G. et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, v. 106, n. 7, p. 2417-23, Oct 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print)

ANVISA, A. N. D. V. S. Diretrizes para transfusão de plaquetas. RDC/ANVIS nº 129. ANVISA. Diário Oficial da União, 24 de maio de 2004: Brasil. RDC/ANVIS nº 129: 13 p. 2004.

_____. Boas práticas no ciclo do sangue. RDC N° 34. ANVISA. Diário Oficial da União, 11 DE JUNHO DE 2014: Brasil. RDC N° 34: 39 p. 2014a.

_____. Ensaio para bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano e seus componentes. RDC N° 35. ANVISA. Diário Oficial da União, 12 de Junho de 2014: Brasil. RDC N° 35: 22 p. 2014b.

BABIC, A. M. et al. In vitro function and phagocytosis of galactosylated platelet concentrates after long-term refrigeration. *Transfusion*, v. 47, n. 3, p. 442-51, Mar 2007. ISSN 0041-1132 (Print)

BARKER, L. M. et al. Multiple pH measurement during storage may detect bacterially contaminated platelet concentrates. *Transfusion*, v. 50, n. 12, p. 2731-7, Dec 2010. ISSN 0041-1132.

BECKER, G. A. et al. Studies of platelet concentrates stored at 22 C nad 4 C. *Transfusion*, v. 13, n. 2, p. 61-8, Mar 1973. ISSN 0041-1132 (Print)

BERGMANN, C. B. et al. Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model. *Immunol Res*, Oct 15 2015. ISSN 0257-277x.

BERTINO, A. M. et al. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 degrees C. *Transfusion*, v. 43, n. 7, p. 857-66, Jul 2003. ISSN 0041-1132 (Print)

BERTOLINI, F. et al. The absence of swirling in platelet concentrates is highly predictive of poor posttransfusion platelet count increments and increased risk of a transfusion reaction. *Transfusion*, v. 40, n. 1, p. 121-2, Jan 2000. ISSN 0041-1132 (Print)

BLAJCHMAN, M. A.; GOLDMAN, M.; BAEZA, F. Improving the bacteriological safety of platelet transfusions. *Transfus Med Rev*, v. 18, n. 1, p. 11-24, Jan 2004. ISSN 0887-7963 (Print)

BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, v. 15, n. 6, p. 725-31, Dec 2003. ISSN 0955-0674 (Print)

BOUDREAUX, M. K. Inherited intrinsic platelet disorders. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). Schalm's: Veterinary Hematology. 6^a. Iowa, EUA: Wiley-Blackwell Ltd, 2010a. cap. 82, p.619 - 625. (Platelets).

_____. Platelet structure. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). Schalm's: Veterinary Hematology. 6^a. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Ltd, 2010b. cap. 75, p.561 - 567. (Platelets).

BOUDREAUX, M. K.; CATALFAMO, J. L. Platelet biochemistry, signal transduction, and function. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). Schalm's: Veterinary Hematology. 6^a. Iowa:EUA: Blackwell Publishing Ltd, 2010. cap. 76, p.569 - 575. (Platelets).

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem, v. 46, n. 8 Pt 2, p. 1221-9, Aug 2000. ISSN 0009-9147 (Print)

BROWN, S. B. et al. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program. J Biol Chem, v. 275, n. 8, p. 5987-96, Feb 25 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. Methods, v. 44, n. 3, p. 235-40, Mar 2008. ISSN 1046-2023 (Print)

BULLARD, D. C. et al. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. J Exp Med, v. 183, n. 5, p. 2329-36, May 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print)

BURNS, K. H.; WERCH, J. B. Bacterial contamination of platelet units: a case report and literature survey with review of upcoming american association of blood banks requirements. Arch Pathol Lab Med, v. 128, n. 3, p. 279-81, Mar 2004. ISSN 0003-9985.

CALLAN, M. B.; APPLEMAN, E. H.; SACHAIS, B. S. Canine platelet transfusions. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), v. 19, n. 5, p. 401-15, Oct 2009. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821881> >.

CASARI, T. M. Reações transfusionais na clínica de pequenos animais. 2012. 54 (Graduation student). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

CASOLI, T. et al. Platelet as a physiological model to investigate apoptotic mechanisms in Alzheimer beta-amyloid peptide production. Mech Ageing Dev, v. 129, n. 3, p. 154-62, Mar 2008. ISSN 0047-6374 (Print)

CLEMMONS, R. M.; MEYERS, K. M. Acquisition and aggregation of canine blood platelets: basic mechanisms of function and differences because of breed origin. Am J Vet Res, v. 45, n. 1, p. 137-44, Jan 1984. ISSN 0002-9645 (Print)

COGNASSE, F. et al. The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors. *Front Immunol*, v. 6, p. 83, 2015. ISSN 1664-3224.

COOKSON, P. et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution. *Transfusion Medicine*, v. 20, n. 6, p. 392-402, 2010. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2010.01034.x> >.

COSSARIZZA, A. et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, v. 197, n. 1, p. 40-5, Nov 30 1993. ISSN 0006-291X (Print)

COSTA, C. C. M. R. Influências das alterações físicas e químicas sobre a função plaquetária e a expressão da GPIIb/IIIa em concentrados de plaquetas caninos estocados. 2011. 91 (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, Universidade do Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

CURVERS, J. et al. Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort. *Transfusion*, v. 48, n. 7, p. 1439-46, Jul 2008. ISSN 0041-1132 (Print)

_____. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion*, v. 44, n. 1, p. 49-58, 2004. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0041-1132.2004.00628.x> >.

DASGUPTA, S. K. et al. Platelet senescence and phosphatidylserine exposure. *Transfusion*, v. 50, n. 10, p. 2167-75, Oct 2010. ISSN 0041-1132.

DAVIDOW, B. Transfusion medicine in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v. 43, n. 4, p. 735-56, Jul 2013. ISSN 1878-1306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747258> >.

DAVIDOW, E. B. et al. Use of fresh platelet concentrate or lyophilized platelets in thrombocytopenic dogs with clinical signs of hemorrhage: a preliminary trial in 37 dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, v. 22, n. 1, p. 116-25, Feb 2012. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016747> >.

DEKKERS, D. W. C. et al. Influence of pH on stored human platelets. *Transfusion*, v. 47, n. 10, p. 1889-1895, 2007. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01412.x> >.

DEVINE, D. V.; SERRANO, K. The Platelet Storage Lesion. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, n. 2, p. 475-487, 6// 2010. ISSN 0272-2712. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272271210000089> >.

DOESCHER, A.; MULLER, T. H. Noninvasive pH Monitoring in Platelet Concentrates. *Transfus Med Hemother*, v. 40, n. 2, p. 88-92, Apr 2013. ISSN 1660-3796 (Print)

DUMONT, L. J. et al. Autologous transfusion recovery of WBC-reduced high-concentration platelet concentrates. *Transfusion*, v. 42, n. 10, p. 1333-9, Oct 2002. ISSN 0041-1132 (Print)

DUMONT, L. J. et al. In vitro pH effects on in vivo recovery and survival of platelets: an analysis by the BEST Collaborative. **Transfusion**, v. 46, n. 8, p. 1300-5, Aug 2006. ISSN 0041-1132 (Print)

_____. Interruption of agitation of platelet concentrates: a multicenter in vitro study by the BEST Collaborative on the effects of shipping platelets. *Transfusion*, v. 47, n. 9, p. 1666-73, Sep 2007. ISSN 0041-1132 (Print)

ELLERY, A. W. Guidelines for specification of animals and husbandry methods when reporting the results of animal experiments. Working Committee for the Biological Characterization of Laboratory Animals/GV-SOLAS. *Lab Anim*, v. 19, n. 2, p. 106-8, Apr 1985. ISSN 0023-6772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3999685> >.

ESTEVEZ, V. S. et al. Frequencies of DEA blood types in a purebred canine blood donor population in Porto Alegre, RS, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Brasil. 31: 178-181 p. 2011.

FALATI, S. et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*, v. 197, n. 11, p. 1585-98, Jun 2 2003. ISSN 0022-1007 (Print)

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, v. 82, n. 2, p. 331-71, Apr 2002. ISSN 0031-9333 (Print)

GHASEMZADEH, M.; HOSSEINI, E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res*, v. 131, n. 3, p. 191-7, Mar 2013. ISSN 0049-3848.

GHEZELBASH, B. et al. In vitro assessment of platelet lesions during 5-day storage in Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO) centers. *Arch Iran Med*, v. 18, n. 2, p. 114-6, Feb 2015. ISSN 1029-2977.

GKOUMASSI, E. et al. Noninvasive pH monitoring of platelet concentrates: a large field test. *Transfusion*, v. 53, n. 10, p. 2287-92, Oct 2013. ISSN 0041-1132.

GONÇALVES, S. Reações transfusionais após a administração de concentrado de plaquetas em cães. 2006. 94 (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GOODRICH, R. P. et al. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sang*, v. 90, n. 4, p. 279-85, May 2006. ISSN 0042-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635070> >.

GULBINS, E.; DRESCHERS, S.; BOCK, J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol*, v. 88, n. 1, p. 85-90, Jan 2003. ISSN 0958-0670 (Print)

GULLIKSSON, H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 17, n. 3, p. 209-215, 7// 2003. ISSN 0887-7963. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796303000208> >.

GULLIKSSON, H. et al. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sanguinis*, v. 85, n. 3, p. 199-205, 2003. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1423-0410.2003.00356.x> >.

_____. Storage of platelets: effects associated with high platelet content in platelet storage containers. *Blood Transfus*, v. 10, n. 2, p. 205-12, Apr 2012. ISSN 1723-2007 (Print)

GUTENSOHN, K. et al. Binding of activated platelets to WBCs in vivo after transfusion. *Transfusion*, v. 42, n. 10, p. 1373-80, Oct 2002. ISSN 0041-1132 (Print)

GYONGYOSSY-ISSA, M. I. Glucose in platelet additive solutions: to add or not to add? *Transfus Apher Sci*, v. 44, n. 3, p. 283-95, Jun 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21493158> >.

GYULKHANDANYAN, A. V. et al. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis*, v. 33, n. 4, p. 397-411, May 2012. ISSN 1573-742X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383127> >.

_____. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br J Haematol*, v. 161, n. 2, p. 245-54, Apr 2013. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398569> >.

HATTORI, N.; SAIKI, S.; IMAI, Y. Regulation by mitophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 53, p. 147-50, Aug 2014. ISSN 1357-2725.

HAYASHI, T. et al. Role of mitochondria in the maintenance of platelet function during in vitro storage. *Transfusion Medicine*, v. 21, n. 3, p. 166-174, 2011. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2010.01065.x> >.

HOAREAU, G. L. et al. Comparison of the platelet-rich plasma and buffy coat protocols for preparation of canine platelet concentrates. *Vet Clin Pathol*, v. 43, n. 4, p. 513-8, Dec 2014. ISSN 0275-6382.

HOFFMEISTER, K. M. Death regulates platelet birth and life. *Blood*, v. 119, n. 24, p. 5617-8, Jun 14 2012. ISSN 0006-4971.

HOFFMEISTER, K. M. et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell*, v. 112, n. 1, p. 87-97, Jan 10 2003. ISSN 0092-8674 (Print)

HOLME, S.; HEATON, W. A.; COURTRIGHT, M. Platelet storage lesion in second-generation containers: correlation with platelet ATP levels. *Vox Sang*, v. 53, n. 4, p. 214-20, 1987. ISSN 0042-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125686> >.

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. 12-7, Jan 1997. ISSN 0041-1132 (Print)

HOLME, S.; VAIDJA, K.; MURPHY, S. Platelet storage at 22 degrees C: effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood*, v. 52, n. 2, p. 425-35, Aug 1978. ISSN 0006-4971 (Print)

HOSSIEN, T. N.; FARHAD, R.; GHARIB, K. The effect of 24 h resting of old PCs at 22-24 degrees Celsius in permeable bags on in vitro platelet parameters. **Transfus Apher Sci**, v. 50, n. 1, p. 106-10, Feb 2014. ISSN 1473-0502 (Print)

HUANG, Z. et al. Platelet parameters and expression of platelet membrane glycoprotein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genet Mol Res*, v. 14, n. 4, p. 16074-89, 2015. ISSN 1676-5680.

HUNTER, S.; NIXON, J.; MURPHY, S. The effect of the interruption of agitation on platelet quality during storage for transfusion. *Transfusion*, v. 41, n. 6, p. 809-14, Jun 2001. ISSN 0041-1132 (Print)

JACKSON, S. P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, v. 109, n. 12, p. 5087-95, Jun 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print)

JAIN, A. et al. Serial changes in morphology and biochemical markers in platelet preparations with storage. *Asian J Transfus Sci*, v. 9, n. 1, p. 41-7, Jan-Jun 2015. ISSN 0973-6247 (Print)

JANDREY, K. E. Assessment of platelet function. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, v. 22, n. 1, p. 81-98, Feb 2012. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016745> >.

JANDREY, K. E. et al. Clinical characterization of canine platelet procoagulant deficiency (Scott syndrome). *J Vet Intern Med*, v. 26, n. 6, p. 1402-7, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1939-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23061683> >.

JENNE, C. N. Platelets: crossroads of immunity and hemostasis. *Blood*, v. 124, n. 5, p. 671-2, Jul 31 2014. ISSN 0006-4971.

JOBE, S. M. et al. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood*, v. 111, n. 3, p. 1257-65, Feb 1 2008. ISSN 0006-4971 (Print)

JOHNSON, L. et al. In vitro assessment of buffy-coat derived platelet components suspended in SSP+ treated with the INTERCEPT Blood system. *Transfusion Medicine*, v. 23, n. 2, p. 121-129, 2013. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/tme.12020> >.

_____. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion*, Oct 4 2015. ISSN 0041-1132.

JUNQUEIRA, P. C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHALK, N. História da Hemoterapia no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. São Paulo. 27: 201-207 p. 2005.

JURK, K.; KEHREL, B. E. [The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation]. *Dtsch Med Wochenschr*, v. 133, n. 21, p. 1130-5, May 2008. ISSN 0012-0472.

KARNICKI, K. et al. Platelet storage solution improves the in vitro function of preserved platelet concentrate. *Vox Sanguinis*, v. 85, n. 4, p. 262-266, 2003. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0042-9007.2003.00362.x> >.

KATTLOVE, H. E.; ALEXANDER, B.; WHITE, F. The effect of cold on platelets. II. Platelet function after short-term storage at cold temperatures. *Blood*, v. 40, n. 5, p. 688-96, Nov 1972. ISSN 0006-4971 (Print)

KAUFMAN, R. M. Uncommon cold: could 4 degrees C storage improve platelet function? *Transfusion*, v. 45, n. 9, p. 1407-12, Sep 2005. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16131372> >.

_____. Platelets: testing, dosing and the storage lesion--recent advances. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p. 492-6, 2006. ISSN 1520-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124104> >.

KAUFMAN, R. M. et al. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med*, v. 162, n. 3, p. 205-13, Feb 3 2015. ISSN 0003-4819.

KICKLER, T. S. Platelet biology – an overview. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*, v. 2, p. 79 - 85, 2006.

KINNALLY, K. W.; ANTONSSON, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis*, v. 12, n. 5, p. 857-68, May 2007. ISSN 1360-8185 (Print)

KLEIN, A.; ADAMIK, A.; MISCHKE, R. [Changes in platelet concentrates from dogs due to storage. I. Platelet count in in vitro function]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, v. 112, n. 6-7, p. 243-53, Jun-Jul 1999. ISSN 0005-9366 (Print)

KUEHNERT, M. J. et al. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, v. 41, n. 12, p. 1493-9, Dec 2001. ISSN 0041-1132 (Print)

LACERDA, L. A. Transfusão sanguínea em Veterinária: desafios a vencer. In: F.H.D., G. e SANTOS, A. P., II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária, 2005, Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.62 - 81.

LACERDA, L. A. et al. Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. *Vet Clin Pathol*, v. 43, n. 3, p. 362-70, Sep 2014. ISSN 0275-6382.

_____. Prevalência dos tipos sanguíneos A, B e AB em gatos domésticos mestiços da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, p. 46 - 53, 2009.

LEAVER, H. A. et al. Calcium-sensitive mitochondrial membrane potential in human platelets and intrinsic signals of cell death. *Platelets*, v. 17, n. 6, p. 368-77, Sep 2006. ISSN 0953-7104 (Print)

LEITNER, G. C. et al. Additive solutions differentially affect metabolic and functional parameters of platelet concentrates. *Vox Sang*, Aug 14 2015. ISSN 0042-9007.

LEYTIN, V. et al. Role of platelet surface glycoprotein Iba α and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. *Transfusion*, v. 44, n. 10, p. 1487-95, Oct 2004. ISSN 0041-1132 (Print)

_____. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest*, v. 89, n. 4, p. 374-84, Apr 2009. ISSN 1530-0307. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238135> >.

_____. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. In: (Ed.). *Br J Haematol*. England, v.142, 2008. p.494-7. ISBN 1365-2141 (Electronic)

LI, J.; KUTER, D. J. The end is just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release. *Int J Hematol*, v. 74, n. 4, p. 365-74, Dec 2001. ISSN 0925-5710. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11794690> >.

LI, J. et al. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion*, v. 40, n. 11, p. 1320-9, Nov 2000. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099659> >.

LONG, A. T. et al. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost*, Dec 26 2015. ISSN 1538-7836.

MAEDA, N. Y. et al. Platelet protease-activated receptor 1 and membrane expression of P-selectin in pulmonary arterial hypertension. *Thromb Res*, v. 125, n. 1, p. 38-43, Jan 2010. ISSN 0049-3848.

MATHAI, J. et al. Suitability of measurement of swirling as a marker of platelet shape change in concentrates stored for transfusion. *Platelets*, v. 17, n. 6, p. 393-6, Sep 2006. ISSN 0953-7104 (Print)

MAURER-SPUREJ, E.; CHIPPERFIELD, K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. *Transfus Med Rev*, v. 21, n. 4, p. 295-306, Oct 2007. ISSN 0887-7963 (Print)

MEIRA MARTINS, L. A. et al. The interplay between apoptosis, mitophagy and mitochondrial biogenesis induced by resveratrol can determine activated hepatic stellate cells death or survival. *Cell Biochem Biophys*, v. 71, n. 2, p. 657-72, Mar 2015. ISSN 1085-9195.

MIKKELSEN, S. et al. Implementation of the ABL-90 blood gas analyzer in a ground-based mobile emergency care unit. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, v. 23, p. 54, 2015. ISSN 1757-7241.

MINOR, A. H.; BURNETT, L. A method for separating and concentrating platelets from normal human blood. *Blood*, v. 7, n. 7, p. 693-9, Jul 1952. ISSN 0006-4971 (Print)

MIRSHAFIEE, H. et al. The Effects of Ultraviolet Light and Riboflavin on Inactivation of Viruses and the Quality of Platelet Concentrates at Laboratory Scale. *Avicenna J Med Biotechnol*, v. 7, n. 2, p. 57-63, Apr-Jun 2015. ISSN 2008-2835 (Print)

MIYAJI, R. et al. Decreased platelet aggregation of platelet concentrate during storage recovers in the body after transfusion. *Transfusion*, v. 44, n. 6, p. 891-9, Jun 2004. ISSN 0041-1132 (Print)

MOHAMAD, N. et al. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell*, v. 29, n. 2, p. 149-61, Aug 2005. ISSN 0327-9545 (Print)

MORISON, I. M. et al. A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nat Genet*, v. 40, n. 4, p. 387-9, Apr 2008. ISSN 1061-4036.

MOROFF, G.; FRIEDMAN, A.; ROBKIN-KLINE, L. Factors influencing changes in pH during storage of platelet concentrates at 20-24 degree C. *Vox Sang*, v. 42, n. 1, p. 33-45, Jan 1982. ISSN 0042-9007 (Print)

MORRISON, A. et al. Stored red-blood-cells inhibit platelet function under physiologic flow. *Vox Sanguinis*, v. 99, n. 4, p. 362-368, 2010. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01355.x> >.

MUTLU, A. et al. Concurrent and separate inside-out transition of platelet apoptosis and activation markers to the platelet surface. *Br J Haematol*, v. 163, n. 3, p. 377-84, Nov 2013. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24033315> >.

NACHMAN, R. L.; LEUNG, L. L. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. *J Clin Invest*, v. 69, n. 2, p. 263-9, Feb 1982. ISSN 0021-9738 (Print)

NAIR, C. S.; VIDYA, R.; ASHALATHA, P. M. Hexamoll DINCH plasticised PVC containers for the storage of platelets. *Asian J Transfus Sci*, v. 5, n. 1, p. 18-22, Jan 2011. ISSN 0973-6247.

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, 6// 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050211000632> >.

_____. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci*, v. 44, n. 3, p. 321-5, Jun 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507724> >.

PALAVECINO, E. L.; YOMTOVIAN, R. A.; JACOBS, M. R. Bacterial contamination of platelets. *Transfus Apher Sci*, v. 42, n. 1, p. 71-82, Feb 2010. ISSN 1473-0502 (Print)

PANZER, S.; JILMA, P. Methods for testing platelet function for transfusion medicine. *Vox Sang*, v. 101, n. 1, p. 1-9, Jul 2011. ISSN 0042-9007.

PATEL, S. R.; HARTWIG, J. H.; ITALIANO, J. E., JR. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, v. 115, n. 12, p. 3348-54, Dec 2005. ISSN 0021-9738 (Print)

PATI, H. P.; JAIN, S. Flow cytometry in hematological disorders. *Indian J Pediatr*, v. 80, n. 9, p. 772-8, Sep 2013. ISSN 0019-5456.

PATTERSON, W. R.; CISSIK, J. H. A comparison of human and canine platelet fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol B*, v. 99, n. 1, p. 147-50, 1991. ISSN 0305-0491 (Print)

PELAGALLI, A. et al. Characterization of canine platelet adhesion to extracellular matrix proteins. *Vet J*, v. 189, n. 1, p. 115-7, Jul 2011. ISSN 1532-2971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20659807> >.

PERAZZI, A. et al. Description of a double centrifugation tube method for concentrating canine platelets. *BMC Vet Res*, v. 9, p. 146, 2013. ISSN 1746-6148.

PERROTTA, P. L.; PERROTTA, C. L.; SNYDER, E. L. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*, v. 43, n. 4, p. 526-35, Apr 2003. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12662287> >.

PERSEGHIN, P. et al. Platelet activation during plasma-reduced multicomponent PLT collection: a comparison between COBE Trima and Spectra LRS turbo cell separators. *Transfusion*, v. 44, n. 1, p. 125-30, Jan 2004. ISSN 0041-1132 (Print)

PICKER, S. M. In-vitro assessment of platelet function. *Transfus Apher Sci*, v. 44, n. 3, p. 305-19, Jun 2011. ISSN 1473-0502 (Print)

PLENCHETTE, S. et al. Early increase in DcR2 expression and late activation of caspases in the platelet storage lesion. *Leukemia*, v. 15, n. 10, p. 1572-81, Oct 2001. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587215> >.

PULESTON, D. Detection of Mitochondrial Mass, Damage, and Reactive Oxygen Species by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, v. 2015, n. 9, p. pdb.prot086298, Sep 2015. ISSN 1559-6095.

RAND, M. L.; LEUNG, R.; PACKHAM, M. A. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci*, v. 28, n. 3, p. 307-17, Jun 2003. ISSN 1473-0502 (Print)

RECHCINSKI, T. et al. Prognostic value of platelet indices after acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Cardiol J*, v. 20, n. 5, p. 491-8, 2013. ISSN 1898-018x.

RIDYARD, A. E.; SHAW, D. J.; MILNE, E. M. Evaluation of platelet activation in canine immune-mediated haemolytic anaemia. *J Small Anim Pract*, v. 51, n. 6, p. 296-304, Jun 2010. ISSN 0022-4510.

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. 409-14, Jun 1991. ISSN 0041-1132 (Print)

RINGWALD, J.; ZIMMERMANN, R.; ECKSTEIN, R. The New Generation of Platelet Additive Solution for Storage at 22°C: Development and Current Experience. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 20, n. 2, p. 158-164, 4// 2006. ISSN 0887-7963. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796305001112> >.

RONDINA, M. T.; GARRAUD, O. Emerging evidence for platelets as immune and inflammatory effector cells. *Front Immunol*, v. 5, p. 653, 2014. ISSN 1664-3224.

RUMJANTSEVA, V. et al. Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets. *Nat Med*, v. 15, n. 11, p. 1273-80, Nov 2009. ISSN 1078-8956.

RUMJANTSEVA, V.; HOFFMEISTER, K. M. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. *Transfus Apher Sci*, v. 42, n. 1, p. 63-70, Feb 2010. ISSN 1473-0502 (Print)

RUSSELL, K. E. Platelet kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia. In: WEISS, D. J. e WARDROP, J. K. (Ed.). *Schalm's: Veterinary Hematology*. 6. Iowa, EUA: Willey - Blackwell Ltd, 2010. cap. 77, p.576 - 585. (Platelets).

SABOOR, M. et al. Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology. *Pak J Med Sci*, v. 29, n. 3, p. 891-6, May 2013. ISSN 1682-024X (Print)

SABOOR, M.; MOINUDDIN, M.; ILYAS, S. New horizons in platelets flow cytometry. *Malays J Med Sci*, v. 20, n. 2, p. 62-6, Mar 2013. ISSN 1394-195X (Print)

SANDGREN, P.; SAEED, K. Storage of buffy-coat-derived platelets in additive solution: in vitro effects on platelets of the air bubbles and foam included in the final unit. *Blood Transfus*, v. 9, n. 2, p. 182-8, Apr 2011. ISSN 1723-2007 (Print)

SAUNDERS, C. et al. Impact of glucose and acetate on the characteristics of the platelet storage lesion in platelets suspended in additive solutions with minimal plasma. *Vox Sang*, v. 105, n. 1, p. 1-10, Jul 2013. ISSN 1423-0410. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347286>>.

SCHOENWAELDER, S. M. et al. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*, v. 114, n. 3, p. 663-6, Jul 16 2009. ISSN 0006-4971.

SCHUBERT, P.; DEVINE, D. V. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. *Blood Transfus*, v. 8 Suppl 3, p. s69-72, Jun 2010. ISSN 1723-2007 (Print)

SCOTT, M. A.; JUTKPWITZ, L. A. Immunr-Mediated Thrombocytopenia. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). *Schalm's: Veterinary Hematology*. 6^a. Iowa, EUA: Blackwell Publising Ltd, 2010. cap. 78, p.586 - 595. (Platelets).

SEMPLE, J. W.; FREEDMAN, J. Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci*, v. 67, n. 4, p. 499-511, Feb 2010. ISSN 1420-682x.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E., JR.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, v. 11, n. 4, p. 264-74, Apr 2011. ISSN 1474-1733.

SHATTIL, S. J.; CUNNINGHAM, M.; HOXIE, J. A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, v. 70, n. 1, p. 307-15, Jul 1987. ISSN 0006-4971 (Print)

SHATTIL, S. J. et al. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*, v. 260, n. 20, p. 11107-14, Sep 15 1985. ISSN 0021-9258 (Print)

SHIMIZU, M. et al. [Whole blood flow cytometry for detection of activated platelets. I. Platelet identification, blood collection and storage]. *Rinsho Byori*, v. 49, n. 4, p. 402-7, Apr 2001. ISSN 0047-1860 (Print)

SHRIVASTAVA, M. et al. Mitochondrial perturbation and execution of apoptosis in platelet mitochondria of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci*, v. 121, n. 3, p. 149-58, Mar 2011. ISSN 0020-7454.

SIMON, T. L.; NELSON, E. J.; MURPHY, S. Extension of platelet concentrate storage to 7 days in second-generation bags. *Transfusion*, v. 27, n. 1, p. 6-9, Jan-Feb 1987. ISSN 0041-1132 (Print)

SINGH, H.; CHAUDHARY, R.; RAY, V. Platelet indices as quality markers of platelet concentrates during storage. *Clin Lab Haematol*, v. 25, n. 5, p. 307-10, Oct 2003. ISSN 0141-9854 (Print)

SINK, C. Canine Platelet Concentrates: An In Vitro Study to Effectively Provide a Source of Functional Platelets. 2002. 67 (Master of Science in Veterinary Medical Science). Virginia Polytechnic Institute, Virginia.

SKRIPCHENKO, A. et al. Periods without agitation diminish platelet mitochondrial function during storage. *Transfusion*, v. 50, n. 2, p. 390-399, 2010. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02450.x> >.

SLICHTER, S. J. In vitro measurements of platelet concentrates stored at 4 and 22 degree C: correlation with posttransfusion platelet viability and function. *Vox Sang*, v. 40 Suppl 1, p. 72-86, 1981. ISSN 0042-9007 (Print)

SLICHTER, S. J. et al. Viability and function of 8-day-stored apheresis platelets. *Transfusion*, v. 46, n. 10, p. 1763-9, Oct 2006. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17002633> >.

SMITH, S. A.; TRAVERS, R. J.; MORRISSEY, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 50, n. 4, p. 326-36, 2015. ISSN 1040-9238.

SMOLEWSKI, P. et al. Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J Immunol Methods*, v. 265, n. 1-2, p. 111-21, Jul 1 2002. ISSN 0022-1759 (Print)

SNYDER, E. L. et al. 5-day storage of platelet concentrates in CLX containers: effect of type of agitation. *Vox Sang*, v. 45, n. 6, p. 432-7, 1983. ISSN 0042-9007 (Print)

SOLHEIM, B. G. et al. Clinical implications of red blood cell and platelet storage lesions: an overview. *Transfus Apher Sci*, v. 31, n. 3, p. 185-9, Dec 2004. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556465> >.

STOKOL, T. Essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). *Shalm's: Veterinary Hematology*. 6^a. Iowa, EUA: Wiley-Blackwell Ltd, 2010. cap. 80, p.605 - 611. (Platelets).

TAYLOR, M. A.; TANDY, N. P.; FRASER, I. D. Effect of new plastics and leucocyte contamination on in vitro storage of platelet concentrates. *J Clin Pathol*, v. 36, n. 12, p. 1382-6, Dec 1983. ISSN 0021-9746 (Print)

THUSHARA, R. M. et al. Sesamol induces apoptosis in human platelets via reactive oxygen species-mediated mitochondrial damage. *Biochimie*, v. 95, n. 11, p. 2060-8, Nov 2013. ISSN 0300-9084.

TRAVERS, R. J.; SMITH, S. A.; MORRISSEY, J. H. Polyphosphate, platelets, and coagulation. *Int J Lab Hematol*, v. 37 Suppl 1, p. 31-5, May 2015. ISSN 1751-5521.

TYNNGÅRD, N. et al. The quality of platelet concentrates produced by COBE Spectra and Trima Accel cell separators during storage for 7 days as assessed by in vitro methods. *Transfusion*, v. 48, n. 4, p. 715-22, Apr 2008. ISSN 0041-1132 (Print)

_____. Platelet adhesion changes during storage studied with a novel method using flow cytometry and protein-coated beads. *Platelets*, v. 26, n. 2, p. 177-85, 2015. ISSN 0953-7104.

TYNNGÅRD, N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 41, n. 2, p. 97-104, 10// 2009. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050209001244> >.

VALERI, C. R. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored at 4 C or 22 C: studies in aspirin-treated normal volunteers. *Transfusion*, v. 16, n. 1, p. 20-3, Jan-Feb 1976. ISSN 0041-1132 (Print)

VAN DER MEER, P. F.; DE KORTE, D. Platelet preservation: agitation and containers. *Transfus Apher Sci*, v. 44, n. 3, p. 297-304, Jun 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514232> >.

VAN DER MEER, P. F. et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sanguinis*, v. 98, n. 4, p. 517-524, 2010. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01283.x> >.

VAN DER MEER, P. F.; KORTE, D. D. Platelet preservation: Agitation and containers. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 44, n. 3, p. 297-304, 6// 2011. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050211000607> >.

VAN DER MEER, P. F.; LIEFTING, L. A.; PIETERSZ, R. N. The effect of interruption of agitation on in vitro measures of platelet concentrates in additive solution. *Transfusion*, v. 47, n. 6, p. 955-9, Jun 2007. ISSN 0041-1132 (Print)

VAN DER MEER, P. F.; PIETERSZ, R. N. Sterilization method of platelet storage containers affects in vitro parameters. *Vox Sang*, v. 92, n. 1, p. 32-6, Jan 2007. ISSN 0042-9007 (Print)

VELA, M. F. et al. Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole. *Gastroenterology*, v. 120, n. 7, p. 1599-606, Jun 2001. ISSN 0016-5085 (Print)

VERHOEVEN, A. J. et al. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*, v. 45, n. 1, p. 82-9, Jan 2005. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647022> >.

VETLESEN, A. et al. Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrbiSac system. *Transfusion*, v. 47, n. 1, p. 126-32, Jan 2007. ISSN 0041-1132 (Print)

WAGNER, S. J. et al. Maintenance of platelet in vitro properties during 7-day storage in M-sol with a 30-hour interruption of agitation. *Transfusion*, v. 48, n. 12, p. 2501-607, Dec 2008. ISSN 0041-1132.

WAGNER, T. et al. Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution. *Transfusion*, v. 42, n. 6, p. 719-27, Jun 2002. ISSN 0041-1132 (Print)

WANDALL, H. H. et al. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4 degrees C-stored platelets. *Blood*, v. 111, n. 6, p. 3249-56, Mar 15 2008. ISSN 0006-4971 (Print)

WANG, C. et al. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfus Sci*, v. 20, n. 2, p. 129-39, Apr 1999. ISSN 0955-3886 (Print)

WANG, Z. et al. Essential roles for platelets during neutrophil-dependent or lymphocyte-mediated defense against bacterial pathogens. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Nov 19 2015. ISSN 0957-5235.

WARDROP, K. J. et al. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J Vet Intern Med*, v. 19, n. 1, p. 135-42, 2005 Jan-Feb 2005. ISSN 0891-6640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15715062> >.

WILKERSON, M. J. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v. 42, n. 1, p. 53-71, Jan 2012. ISSN 0195-5616.

WILKERSON, M. J.; SHUMAN, W. Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. *Vet Clin Pathol*, v. 30, n. 3, p. 107-113, 2001. ISSN 0275-6382.

WILLS, T. B.; WARDROP, K. J.; MEYERS, K. M. Detection of activated platelets in canine blood by use of flow cytometry. *American Journal of Veterinary Research*, v. 67, n. 1, p. 56-63, 2006/01/01 2006. ISSN 0002-9645. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.67.1.56> >. Acesso em: 2013/07/22.

WOLF, B. B. et al. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*, v. 94, n. 5, p. 1683-92, Sep 1 1999. ISSN 0006-4971 (Print)

YEO, E. L. et al. Characterization of canine platelet P-selectin (CD 62) and its utility in flow cytometry platelet studies. *Comp Biochem Physiol B*, v. 105, n. 3-4, p. 625-36, Jul-Aug 1993. ISSN 0305-0491 (Print)

YU, D.; NOH, D.; PARK, J. Flow cytometric evaluation of disseminated intravascular coagulation in a canine endotoxemia model. *Can J Vet Res*, v. 79, n. 1, p. 52-7, Jan 2015. ISSN 0830-9000 (Print)

YUASA, T. et al. Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *Br J Haematol*, v. 126, n. 1, p. 153-9, Jul 2004. ISSN 0007-1048 (Print)

ZHANG, J. G. et al. Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion*, v. 48, n. 5, p. 847-56, May 2008. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18298601> >.

_____. Comparison of a novel viscous platelet additive solution and plasma: preparation and in vitro storage parameters of buffy-coat-derived platelet concentrates. *Vox Sang*, v. 94, n. 4, p. 299-305, May 2008. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18179681> >.

ZHANG, S. et al. Use of Platelet Indices for Determining Illness Severity and Predicting Prognosis in Critically Ill Patients. *Chin Med J (Engl)*, v. 128, n. 15, p. 2012-8, Aug 5 2015. ISSN 0366-6999 (Print)

ZHANG, Z. et al. Platelet indices are novel predictors of hospital mortality in intensive care unit patients. *J Crit Care*, v. 29, n. 5, p. 885.e1-6, Oct 2014. ISSN 0883-9441.

ZHUANG, Y. et al. In vitro properties of apheresis platelet during extended storage in plasma treated with anandamide. *Transfus Apher Sci*, v. 51, n. 1, p. 58-64, Aug 2014. ISSN 1473-0502 (Print)