



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

***SOLUÇÕES ADITIVAS PARA ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADO DE
PLAQUETAS CANINO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS***

PORTO ALEGRE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**SOLUÇÕES ADITIVAS PARA ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADO DE
PLAQUETAS CANINO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

Autor: Nicole R. C. Hlavac

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

Orientador: Félix H. D. González

Co-orientadora: Luciana de Almeida Lacerda

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Hlavac, Nicole Regina Capacchi
SOLUÇÕES ADITIVAS PARA ARMAZENAMENTO DE
CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO: AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS / Nicole Regina Capacchi
Hlavac. -- 2016.
116 f.

Orientador: Félix Hilário Diaz González.
Coorientador: Luciana de Almeida Lacerda.

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. Patologia Clínica Veterinária. 2. Medicina
Transfusional. 3. Lesão de estoque plaquetário. 4.
Solução aditiva. 5. Canino. I. González, Félix
Hilário Diaz, orient. II. Lacerda, Luciana de
Almeida, coorient. III. Título.

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

**SOLUÇÕES ADITIVAS PARA ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADO DE
PLAQUETAS CANINO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

Nicole R. C. Hlavac

Aprovada em 1 de Abril de 2016

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix H. D. González

Orientador e Presidente da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten (HCPA-UFRGS)

Membro da Comissão Avaliadora

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

Membro da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Rafael Figuera (UFSM)

Membro da Comissão Avaliadora

*“The characteristic of scientific progress is
our knowing that we did not know.”*

Gaston Bachelard, filósofo francês e poeta

1884-1962

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Shirley e Tino Capacchi por terem se dedicado a mim com o amor e carinho que dariam a uma filha; aos meus pais Graciela Capacchi e Volmar Hlavac por seu exemplo de luta e persistência; a minha tia e madrinha Maristela Capacchi, que me instigou a seguir a carreira docente, a minha pequena prima Cecília Dall’agnol por me abrigar em Porto Alegre e seguir meus sonhos. E, ao meu noivo Ricardo Vincenzi, por jamais me deixar baixar a cabeça e por fazer eu me tornar uma pessoa otimista.

AGRADECIMENTOS

Em um momento de crise política e pouco investimento em pesquisa, o sonho de realizar um projeto na área medicina transfusional veterinária parecia irrealizável. O alto custo do material de consumo e a da infra-estrutura, além da necessidade de uma equipe multidisciplinar eram alguns dos desafios a enfrentar. Mas com o auxílio de uma equipe batalhadora, eis aqui a realização deste sonho.

Fica o agradecimento ao Blut's Centro Diagnóstico e Serviços Veterinários por ter permitido o uso da estrutura do laboratório e banco de sangue, a gentil equipe do Laboratório Zanol por permitir a realização das citometrias e agregometrias, Dr. Dirk de Korte do Sanquin Blood Bank por ter cedido as soluções aditivas, a Dr^a. Fátima Guma por permitir a realização das análises de ATP no Departamento de Bioquímica da UFRGS, Prof. Dr. Daniel Gerardi e o Departamento de Importação da UFRGS pelo auxílio na importação destas soluções, aos motoristas do Setor de Transporte da UFRGS, sempre solícitos e pacientes nas coletas nos canis.

Ficam boas lembranças da equipe maravilhosa: Camila Lasta – com muitas datas e calendários – adquiriu a “síndrome de 2020”, auxiliou em cada segundo da execução e organização deste projeto. Obrigada por acreditar na minha loucura e abraçar esta ideia. Jamais teria conseguido realizar este projeto sem a sua ajuda. Além de uma colega de doutorado, também ganhei uma amiga. Sílvia Terra – da bioquímica celular a veterinária em cinco minutos - desde 2011 acreditou neste projeto, incrementando vários testes e nos fazendo acreditar que sabíamos as mil rotas metabólicas. Depois de muitas noites de testes de citometria com resultados estranhos, nos fazia crer que as análises dariam certo. Magnus Dalmolin e a “auto-estima de veia”, sempre presente nas coletas. Agradeço pelos pensamentos práticos, explicações de hemostasia e socorro na estatística. Natália Marcondes a biomédica identificadora de tubos e pipetadora mais rápida e organizada que tenho conhecimento. Muito obrigada por ter aceitado entrar no mundo veterinário. Bruna Soares - encantadora de Goldens - jamais conseguiríamos tantos doadores sem ela. As bolsistas Cecília Dall'agnol, Carolina Hatwing e Daniela Rohr que estiveram dispostas a ajudar nas etapas boas de acariciar cães, mas nas partes ruins identificando mais de 100 microtubos por semana. Luciana Lacerda – orientadora e irmã – não tem palavras para agradecer pelos ensinamentos passados desde 2008, por acreditar que seria possível realizar este projeto. Agradeço pela confiança em permitir o uso da estrutura da Blut's e por ter apresentado o “fantástico mundo da hemoterapia”. Espero poder reproduzir e repassar teus ensinamentos a altura aos meus alunos. Ao meu orientador, Félix González agradeço por permitir e apoiar a realização de projetos com idéias nossas, e nos dar liberdade para sermos verdadeiros pesquisadores.

Abdicar da convivência com a família e amigos para poder concluir a pós-graduação foi um pesado fardo. O amor incondicional da minha família, e a força dos amigos que não desistiram de mim mesmo quando não tinha tempo para vê-los foi fundamental para que tivesse coragem neste ciclo da minha vida. Muito obrigada pela compreensão.

SOLUÇÕES ADITIVAS PARA ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS CANINO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Autor: Nicole R. C. Hlavac

Orientador: Félix H. D. González

Co-orientadora: Luciana de Almeida Lacerda

RESUMO

A prática da transfusão sanguínea teve início no século passado na medicina humana, e vem evoluindo desde então. A pesquisa nesta área é essencial para a melhor capacitação de médicos veterinários e para garantir a qualidade e a rapidez do atendimento dos animais que necessitam de transfusão. O curto tempo de armazenamento limita a quantidade de concentrados de plaquetas (CP) que podem ser efetivamente utilizados nos centros de hemoterapia, o que resulta em muitas unidades sendo descartadas, com conseqüente geração de despesas e necessidade de busca de novos doadores para atender a contínua demanda por este hemocomponente. O desenvolvimento de meios e soluções de preservação de plaquetas possibilita o armazenamento de CP por tempo prolongado e são capazes de diminuir ou evitar os efeitos prejudiciais durante o seu armazenamento, chamados de lesão plaquetária de estoque, para que, ao final, se obtenha um CP de melhor qualidade para ser transfundido. O presente trabalho teve como objetivos avaliar o CP canino armazenado com diferentes soluções aditivas plaquetárias sintéticas (SAP) durante 13 dias, e comparar as soluções aditivas com base no metabolismo plaquetário *in vitro*. Neste estudo foram utilizadas 40 unidades de CP canino, obtidos através do método de plasma rico em plaquetas, conservadas nas soluções aditivas a seguir: Grupo controle (100% plasma; n= 13), Grupo SSP+ (n= 13) e Grupo Composol (n= 14). Os parâmetros avaliados nos dias 1, 5, 9 e 13 incluíram: ATP, lactato, glicose, lactato desidrogenase (LDH), pH, sódio, potássio, bicarbonato, pO₂, pCO₂, *swirling*, contagem de plaquetas, leucócitos residuais, agregação plaquetária, cultura bacteriana, marcação com anticorpos monoclonais CD61 e CD62P (p selectina), exposição da fosfatidilserina (PS) (Anexina V) e viabilidade mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (sondas JC-1 e *Mitotracker Red e Green*). Durante o tempo de armazenamento foi observado comportamento metabólico semelhante ao relatado em trabalhos com plaquetas humanas. Houve redução de ATP, pCO₂, pH, $\Delta\Psi_m$ (JC-1 agregado e *Mitotracker Red*), bicarbonato e glicose; e aumento marcação de CD62-P, *Mitotracker Green* e JC-1 monômero, aumento de pO₂, LDH, PDW e lactato. Ao comparar as SAP com os CP 100% plasma houve diferença significativa nos seguintes parâmetros: *swirling*, PDW, CD62-P, glicose, lactato, pH, pO₂, pCO₂, bicarbonato, PS e em ambas técnicas de avaliação de $\Delta\Psi_m$. De forma geral pode-se afirmar que o grupo 100% plasma manteve os parâmetros de viabilidade até o quinto dia de armazenamento, exceto o valor médio de pH ($6,1 \pm 0,59$). As SAP avaliadas mantiveram os parâmetros até o nono dia, com destaque para a solução SSP+ que manteve estes parâmetros estáveis até o 13º dia de estoque. SSP+ e Composol parecem ser uma excelente alternativa de SAP para serem utilizadas no lugar do plasma na produção dos CP em bancos de sangue veterinários. O estoque prolongado, com manutenção da qualidade *in vitro* parece ser viável e com resultados semelhantes aos observados em trabalhos com plaquetas humanas.

PALAVRAS - CHAVE: hemoterapia veterinária, lesão plaquetária de estoque, soluções aditivas plaquetárias.

ADDITIVE SOLUTIONS FOR CANINE PLATELET CONCENTRATES STORAGE: BIOCHEMICAL EVALUATION

Author: Nicole R. C. Hlavac

Advisor: Félix H. D. González

Co-advisor: Luciana de Almeida Lacerda

ABSTRACT

The practice of blood transfusion began in the last century in human medicine, and has been evolving ever since. Research in this area is essential for better capacitating of veterinarians and to ensure the quality and promptness in assistance of the animals that require transfusion. The short storage time limits the amount of platelet concentrates (PC) that can be effectively used in transfusion centers which result in many units being discarded, with subsequent generation of expenditures and the need of finding new donors to meet the continuous demand for this blood component. The development of platelets preserving solutions provides storage of PC for long periods and is capable of reducing or avoiding adverse effects during storage, called platelet storage lesion. So, it will be possible to have a concentrate of better quality platelet to be transfused. This study aimed to evaluate the canine CP stored in different synthetic platelet additive solutions (SAP) for 13 days, and compare the additive solutions based on in vitro platelet metabolism. This study used 40 canine CP units, obtained with platelet rich plasma method, stored in the following additive solutions: Control group (100% plasma; n=13), SSP+ Group (n=13) and Composol Group (n=14). The parameters were evaluated on days 1, 5, 9 and 13 included: ATP, lactate, glucose, lactate dehydrogenase (LDH), pH, sodium, potassium, bicarbonate, pO₂, pCO₂, swirling, platelet count, residual leukocyte, platelet aggregation, bacterial culture labeling with monoclonal antibodies CD61 and CD62P (p-selectin), exposure of phosphatidylserine (PS) (Annexin V) and mitochondrial viability ($\Delta\Psi_m$) (JC-1 and Mitotracker Red and Green dyes). During the storage time was observed if the metabolic behavior is similar to that reported in studies with human platelets. In the storage period there was a reduction of ATP, pCO₂, pH, $\Delta\Psi_m$ (JC-1 aggregate and Mitotracker Red), bicarbonate and glucose; and increased percentage of CD62-P, Mitotracker Green and JC-1 monomer, increase of pO₂, LDH, lactate and PDW levels. When comparing the SAP with the CP 100% plasma there were no significant differences in the following parameters: swirling, PDW, CD62-P, glucose, lactate, pH, pO₂, pCO₂, bicarbonate, PS and both $\Delta\Psi_m$ techniques. In general it can be said that the 100% plasma group maintained the viability parameters until the fifth day of storage, with the exception of pH average (6.1 ± 0.59). SAP evaluated parameters remained until the ninth day, highlighting the SSP+ solution that kept these parameters stable until the 13th day of storage. SSP+ and Composol seems to be an excellent alternative for use in place of the plasma in the production of the CP in veterinary blood banks. Prolonged storage time and in vitro quality maintenance appears to be feasible and have similar results to those observed in studies with human platelets.

KEY WORDS: *platelet storage lesion, platelet storage media, veterinary hemotherapy.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. A. Microscopia eletrônica do corte transversal de uma plaqueta em repouso (21000X) com as indicações das estruturas internas. B e C. Microscopia eletrônica do corte transversal de uma plaqueta ativada (30000X) de uma plaqueta ativada demonstrando a contração do anel microtubular ao redor dos grânulos e a formação de pseudópodes. Fonte: adaptado de George (2000)..... 30

Figura 2. Principais componentes das vias intrínseca e extrínseca da via da sinalização da apoptose. São componentes da via intrínseca citocromo c, Apaf-1, procaspase-9; e da via extrínseca CD95, FADD, procaspase-8 e caspase-8. As vias ativam a caspase-3, que por sua vez ativa o apoptossomo culminando com o rompimento das estruturas celulares e formação dos corpos apoptóticos. Fonte: adaptado de Hengartner (2000). 33

Figura 3. Representação esquemática das vias metabólicas da plaqueta em um meio de preservação sintético com glicose e acetato. Observar a via aeróbica e anaeróbica para obtenção de energia. Também se observam os ácidos graxos livres e acetato servindo como substrato para o metabolismo oxidativo. O acetato também age como tampão alternativo, assim como o HCO₃⁻ e fosfato (seta pontilhada). Fonte: Ringwald, Zimmermann e Eckstein (2006)..... 38

Figura 4. Preparo do concentrado de plaquetas pelo método do plasma rico em plaquetas (PRP) e *buffy coat* (BC). A. No método de PRP o sangue total é submetido a centrifugação leve, o PRP é extraído para uma bolsa secundária (específica para armazenamento de CP), que é submetida a centrifugação pesada. Posteriormente é retirado o excesso de plasma, resultando em um CP de único doador com aproximadamente 60 mL. B. No método BC (*top and botton*) o sangue total é submetido a centrifugação pesada, o plasma é extraído por cima (*top*) e o concentrado de eritrócitos por baixo (*botton*), deixando o BC com plaquetas na bolsa de coleta inicial. Várias unidades de BC são agrupadas (*pool*) e é adicionado plasma ou solução aditiva plaquetária. Este *pool* é submetido a centrifugação leve para sedimentar os eritrócitos residuais. Então o *pool* de CP é extraído para uma bolsa secundária (específica para armazenamento de CP). Fonte: Adaptado de Devine e Serrano (2010). 40

Figura 5. Adição das soluções aditivas plaquetárias na proporção de 65% solução aditiva (SSP+ ou Composol), deixando 35% de plasma residual. Adaptado de Devine e Serrano (2010).....	66
Figura 6. Armazenamento dos concentrados de plaqueta caninos utilizados no experimento, em agitação horizontal constante, por 13 dias, 22 a 24°C.	66
Figura 7. A. Inserção do dispositivo de amostragem no dia 1. B. Amostragem dos concentrados de plaquetas realizado nos dias 1, 5, 9 e 13.	68
Figura 8. Gráficos de regressão linear dos parâmetros <i>in vitro</i> dos concentrados de plaquetas em plasma e solução aditiva, estocados por 13 dias.	82
Figura 9. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, demonstrando a marcação com os anticorpos monoclonais CD61 e CD62P ao longo dos 13 dias de armazenamento. Observar a marcação de CD61 no quadrante inferior direito, onde esta é sempre superior a 85%. A porcentagem de CD62P é observada nos quadrantes superiores direito e esquerdo, sendo que a análise estatística dos tratamentos evidenciou maior marcação nos dias 1 e 13, e maior marcação no grupo controle (100% plasma) em relação as soluções aditivas (SSP+ e Composol).....	83
Figura 10. Gráfico de regressão linear referentes à dosagem média de glicose ao longo dos 13 dias de armazenamento no grupo controle (100% plasma). Observar a diminuição da concentração de glicose ao longo do período de armazenamento.	86
Figura 11. Gráfico de regressão linear referentes à dosagem média de lactato ao longo dos 13 dias de armazenamento nas soluções aditivas (Composol e SSP+) e grupo controle (plasma). Observar o aumento da concentração de lactato ao longo do período de armazenamento.	87
Figura 12. Taxas de consumo de glicose dos concentrados de plaquetas estocados em plasma e solução aditiva estocados por 13 dias.	88
Figura 13. Taxas de produção de lactato dos concentrados de plaquetas estocados em plasma e solução aditiva estocados por 13 dias.	89
Figura 14. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, da exposição de fosfatidilserina (PS) avaliado pelo marcador Anexina V FITC. Observar que não há diferença na marcação ao longo dos 13 dias de estoque, mas há maior	

marcação no grupo controle (100% plasma), quando comparado com as soluções aditivas SSP+ e Composol..... 92

Figura 15. Gráfico de regressão linear demonstrando a redução da marcação de JC-1 agregados (FL2) e aumento da marcação para JC-1 monômeros (FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Composol) e no grupo controle (100% plasma). 94

Figura 16. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, demonstrando a redução da marcação de JC-1 agregados (FL2) e aumento da marcação para JC-1 monômeros (FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Composol) e no grupo controle (100% plasma). Observar o aumento de células não marcadas ao longo do tempo na região 10^1 95

Figura 17. Gráfico de regressão linear demonstrando a redução da marcação de Mitoracker Red (Potencial mitocondrial, FL3) e aumento da marcação de Mitotracker Green (Swelling mitocondrial, FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Composol) e no grupo controle (100% plasma)..... 98

Figura 18. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, demonstrando a redução da marcação de Mitoracker Red (FL3) e aumento da marcação de Mitotracker Green (FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Composol) e no grupo controle (100% plasma)..... 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das soluções aditivas plaquetárias.....	48
Tabela 2. Comparação entre os resultados de estudos relatando parâmetros <i>in vitro</i> de concentrado de plaquetas (CP) em plasma, utilizando porcentagens variadas de plasma residual para as soluções aditivas plaquetárias em diferentes métodos de obtenção do CP, material das bolsas plásticas e tempos de estoque.	52
Tabela 3. Composição das soluções utilizadas no experimento.	61
Tabela 4. Contagem de leucócitos residuais e plaquetas, <i>swirling</i> e pH no dia experimental 1.	71
Tabela 5. Variáveis quantitativas, morfológicas e marcadores de superfície e função plaquetária avaliados nos dias 1, 5, 9 e 13 nos tratamentos experimentais.	73
Tabela 6. Análises de gases e variáveis metabólicas avaliados nos dias 1, 5, 9 e 13 nos tratamentos experimentais.	74
Tabela 7. Marcadores de apoptose avaliados nos dias 1, 5, 9 e 13 nos tratamentos experimentais.	75
Tabela 8. Comparação dos resultados deste experimento com outros estudos relatando parâmetros <i>in vitro</i> de concentrado de plaquetas (CP) em plasma, SSP+ e Composol, utilizando 35% de plasma residual para as soluções aditivas plaquetárias em diferentes métodos de obtenção do CP, material das bolsas plásticas e tempos de estoque.	76
Tabela 9. Correlação de Pearson entre as características metabólicas dos concentrados de plaquetas armazenados em plasma e solução aditiva por 13 dias.	81
Tabela 10. Resultados da agregometria realizados no dia experimental 1.	84
Tabela 11. Consumo de glicose dos concentrados de plaquetas em plasma e solução aditiva, estocados por 13 dias.....	88
Tabela 12. Produção de lactato dos concentrados de plaquetas em plasma e solução aditiva, estocados por 13 dias.....	88
Tabela 13. Correlação de Pearson entre as principais características metabólicas dos concentrados de plaquetas armazenados em plasma e solução aditiva por 13 dias em relação aos testes de viabilidade mitocondrial JC-1 e Mitotracker.	97

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
AABB	<i>American Association of Blood Banks</i>
ACD	Ácido cítrico dextrose
Acetil-Coa	Acetil Coenzima A
ADP	Adenina difosfato
ALT	Alanina amino transferase
AMP	Adenosina monofostato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil
APAF-1	Fator protease ativador de apoptose-1
AR	Argentina
ATP	Adenosina trifosfato
BC	Capa leucocitária ou <i>Buffy coat</i>
BR	Brasil
BTHC	Butiril tri-n-hexil citrato
CA	Canadá
CD	Marcadores de superfície celular ou <i>Cluster of differentiation</i>
CE	Concentrado de eritrócitos
CH	Suíça
Cl ⁻	Cloro
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Concentrado de plaquetas
CPD	Citrato fosfato dextrose
CZ	República Tcheca
DE	Alemanha
DEHP	Di (2-etilhexil) ftalato
DINCH	Di(isononil) ciclohexano 1,2 dicarboxilato
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte ou <i>Death-inducing signalling complex</i>
DnDP	Di-n-decil ftalato
EDTA K ₂	Ácido etileno diamino tetracético dipotássico
FADD	Proteína de morte associada ao Fas ou <i>Fas-associated death domain protein</i>
FDA	Food and Drug Administration, Estados Unidos
FITC	Fluoresceína isothiocyanate
fL	Fentolitros
GP	Glicoproteína
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Água
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
IL	Interleucinas

JC-1	sonda fluorescente <i>J-aggregate forming cation</i>
K ⁺	Potássio
kg	Quilogramas
L	Litros
LDH	Lactato desidrogenase
mg/dL	Miligramas por decilitros
Mg ⁺²	Magnésio
ml	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol	Milimol
MoAB	Anticorpos monoclonais
MPV	Volume plaquetário médio ou <i>Mean platelet volume</i>
MTG	Mitotracker Green
MTR	Mitotracker Red
Na ⁺²	Sódio
NL	Holanda
O ₂	Oxigênio
OCS	Sistema de canalículos abertos ou <i>Open canalicular system</i>
OS	Fosfatidilserina ou <i>Phosphatidylserine</i>
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PDW	Distribuição médio do volume plaquetário ou <i>Platelet distribution width</i>
pH	Potencial hidrogênio iônico
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSGL-1	Glicoproteína ligante de p selectina-1 ou <i>P selectin glycoprotein ligand-1</i>
PSL	Lesão plaquetária de estoque ou <i>Platelet Storage Lesion</i>
PVC	Policloreto de vinila
SAP	Soluções aditivas plaquetárias
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou <i>Tricarboxylic acid cycle</i>
TEHTM	Tri(2-etilhexil) trioctil trimelitato
TIM	Trombocitopenia imuno mediada
TOTM	Tri(2-etilhexil) trioctil trimelitato
UNID	Unidade
US	Estados Unidos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1.	OBJETIVOS.....	18
1.1.1.	Geral.....	18
1.1.2.	Específicos.....	18
1.2.	JUSTIFICATIVA.....	18
1.3.	FOMENTO.....	19
2.	CARACTERIZAÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	20
2.1.	HISTÓRICO DA MEDICINA TRANSFUSIONAL.....	20
2.1.1.	Medicina transfusional veterinária.....	21
2.2.	O USO DE HEMOCOMPONENTES.....	23
2.2.1.	Indicações para uso de concentrado de plaquetas.....	25
2.3.	AS PLAQUETAS.....	27
2.3.1.	Estrutura das plaquetas.....	27
2.3.2.	Formação e senescência plaquetária.....	30
2.3.3.	Função das plaquetas.....	34
2.3.4.	Metabolismo plaquetário.....	36
2.4.	CONCENTRADO DE PLAQUETAS.....	38
2.4.1.	Métodos de preparação.....	39
2.4.2.	Considerações sobre o armazenamento.....	41
2.4.3.	Critérios para avaliação laboratorial.....	42
2.4.4.	Bolsas para armazenamento de concentrado de plaquetas.....	43
2.5.	SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO PARA CONCENTRADO DE PLAQUETAS.....	45
2.5.1.	Componentes das soluções aditivas plaquetárias.....	48
2.5.2.	Requerimento de plasma com uso das soluções aditivas plaquetárias.....	50
2.6.	LESÃO PLAQUETÁRIA DE ESTOQUE.....	53

3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1.	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	58
3.2.	AVALIAÇÕES CLÍNICA E LABORATORIAL DOS ANIMAIS.....	58
3.3.	COLETA DAS BOLSAS DE SANGUE DOS ANIMAIS SELECIONADOS.....	59
3.4.	FASE PRÉ-EXPERIMENTAL.....	60
3.4.1.	Seleção do material da bolsa de armazenamento de concentrado de plaquetas	60
3.4.2.	Escolha das soluções aditivas plaquetárias.....	60
3.4.3.	Seleção e padronização dos testes de avaliação laboratorial do concentrado de plaquetas.....	61
3.5.	ETAPAS DO EXPERIMENTO	63
3.5.1.	Processamento do concentrado de plaquetas canino	63
3.5.2.	Armazenamento do concentrado de plaquetas canino.....	65
3.5.3.	Avaliação laboratorial do concentrado de plaquetas canino.....	67
3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	APÊNDICES	114

1. INTRODUÇÃO

A medicina transfusional está gradualmente tornando-se mais viável em pequenos animais. Isso se deve ao melhor acesso a produtos de sangue, através da compra de produtos de banco de sangue, programas de doadores externos, ou a disponibilidade de substitutos de componentes sanguíneos. No entanto, o uso seguro de hemocomponentes requer o conhecimento dos grupos sanguíneos, da prevalência de anticorpos, dos meios para minimizar o risco de reações adversas, incluindo a utilização de doadores e hemocomponentes adequados. Dentre todos os hemocomponentes, o concentrado de plaquetas (CP) é o que traz mais dificuldades quanto à disponibilidade e acessibilidade devido a sua curta vida de prateleira, e à dificuldade de administrar um número suficiente de plaquetas para atender as necessidades de transfusão de um cão.

Tendo em vista as dificuldades de armazenamento e administração do concentrado de plaquetas, desde 1980 diversas pesquisas buscam uma forma de estocá-las em meio artificial, livre de plasma. Os pesquisadores sugerem que ao usar soluções aditivas plaquetárias (SAP), além de aumentar o tempo de prateleira dos CP, há menor risco de reações transfusionais associadas aos constituintes do plasma (Tynngård, Trinks e Berlin, 2010; Van Der Meer *et al.*, 2012). Desde que as SAP começaram a ser comercializadas na Europa e Estados Unidos, foi possível controlar com mais facilidade a contaminação bacteriana, sugerindo que o uso destas soluções reduz a formação de biofilme bacteriano (Gulliksson *et al.*, 2003; Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006).

A procura por novas formas ou soluções aditivas de preservação sempre foi uma preocupação para a medicina humana, e hoje também é em medicina veterinária. A existência de diferentes soluções comercialmente disponíveis, ou recentemente reformuladas, que ainda não foram avaliadas para o uso em cães, torna esta área da medicina veterinária transfusional um campo interessante que precisa ser explorado.

Para contextualizar a tese, foram abordados temas como uso de hemocomponentes, estrutura, função e metabolismo plaquetário, particularidades do CP canino. Tópicos como bolsas plásticas para armazenamento de CP e caracterização de SAP, são conteúdos frequentes de artigos da área e podem ter influência nos resultados de viabilidade plaquetária, portanto também foram abordados na fundamentação teórica.

As lesões plaquetárias de estoque (*platelet storage lesion* – PSL), critérios e testes para avaliação *in vitro* de CP norteiam o experimento realizado, a partir do estudo destes tópicos apresentam-se os procedimentos metodológicos utilizados. Posteriormente os resultados e discussão dos dados obtidos no experimento são apresentados, e por fim, estes são apresentados em formato de artigo científico.

Com as informações desta tese e resultados do experimento espera-se fornecer dados técnicos que propiciem mais estudos nesta área. E ainda, dar o primeiro passo para que as SAP sejam utilizadas como potencial alternativa para armazenamento de CP em bancos de sangue veterinários.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Geral

Realizar avaliação bioquímica do CP canino em diferentes soluções de armazenamento, com a finalidade de estender o período de estocagem, otimizando e viabilizando a utilização deste hemocomponente em bancos de sangue veterinários.

1.1.2. Específicos

Comparar os parâmetros do metabolismo plaquetário *in vitro* de CP caninos armazenados em plasma e em duas SAP;

Comparar a eficácia *in vitro* das SAP em caninos com os resultados destas mesmas soluções relatados em humanos;

Descrever parâmetros do uso das SAP em CP obtidos pelo método de plasma rico em plaquetas.

1.2. JUSTIFICATIVA

Na medicina humana, assim como na medicina veterinária, o curto tempo de armazenamento é um dos fatores que dificulta e limita a quantidade de hemocomponentes que pode ser efetivamente armazenada e é uma desvantagem na medicina veterinária, pois o acesso a cães doadores é restrito e a demanda é contínua e cada vez maior na prática de clínicas e hospitais veterinários. O CP está entre os hemocomponentes com maior dificuldade para armazenamento nos bancos de sangue, pois este é viável por apenas 5 dias, tendo maior risco de contaminação bacteriana

(temperatura de armazenamento de 22°C), além de evidências de perda de qualidade durante o seu estoque. A avaliação bioquímica durante o armazenamento do CP canino com diferentes SAP constitui uma informação prática para a medicina veterinária, gerando assim maior conhecimento, motivando novos projetos de estudos *in vitro* e *in vivo*, criando um núcleo de pesquisa e extensão no auxílio à hemoterapia veterinária, e proporcionando evidências científicas em modelos animais que podem ser utilizados como base para estudos em humanos.

1.3. FOMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2. CARACTERIZAÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

2.1. HISTÓRICO DA MEDICINA TRANSFUSIONAL

Os primeiros relatos não científicos de hemoterapia estão relacionados à utilização da sangria na Grécia e em Roma, método utilizado para equilibrar os quatro humores que determinavam a saúde ou a doença do indivíduo. Mil anos mais tarde, a sangria era o trabalho do cirurgião barbeiro que utilizava a hemoterapia indiscriminadamente, submetendo à sangria tanto o indivíduo indisposto, bem como o saudável. No século 19 foi sugerido que a transfusão de sangue seria uma forma mais heroica e difícil de hemoterapia se comparada à sangria, mas que poderia ser mais benéfica para alguns pacientes. Entretanto, não deveria ser realizada por cirurgiões barbeiros (Schmidt e Ness, 2006).

A terapia com componentes sanguíneos e plaquetas tornou-se uma realidade com a introdução dos recipientes de plástico para sangue na década de 1960, quando então se estabeleceram os bancos de sangue. Mas em 1970, mesmo com o estabelecimento dos bancos de sangue, ainda existiram relatos de plasmaférese terapêutica utilizada sem motivo para distúrbios clínicos. O método de sangria era a maneira de submeter amostras para perfis laboratoriais. Estas transições na hemoterapia são resultantes de mudanças políticas, religiosas, filosóficas e científicas.

Mesmo que inicialmente utilizada para “libertar maus espíritos” ou “controlar os quatro humores”, a hemoterapia cresceu e tornou-se uma ciência médica com objetivo de repor o sangue não produzido ou perdido. Hoje, é conhecida como medicina transfusional e aplica terapias celulares em cuidados clínicos, assim como biologia molecular e outras tecnologias de ponta em imunohematologia (Martín Villar, 1980; Schmidt, 2006; Schmidt e Ness, 2006).

No Brasil, a medicina transfusional teve um período empírico, que vai até 1900, e outro científico, de 1900 em diante. Em 1879, um relato de autoria de José Vieira Marcondes, discutia se a melhor transfusão seria com sangue de animais para humanos ou entre seres humanos. Mas, somente por volta de 1920 surgiram os primeiros serviços organizados de transfusão de sangue. Destaca-se o STS (Serviço de Transfusão de Sangue) na década de 1940 no Rio de Janeiro. Nos anos 1980, a Constituição de 1980, a criação do Programa Nacional de Sangue, campanhas de doação de sangue promovidas

pela Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, preocupações com a transmissão da Síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) aos receptores e novos conceitos de hemoterapia clínica, deram uma nova dimensão à hemoterapia brasileira (Junqueira, Rosenblit e Hamerschalk, 2005; Silva e Nogueira, 2007; Pereima *et al.*, 2010).

Mesmo com a evolução tecnológica na área, questões básicas como recrutamento de doadores, e as dificuldades de atender a demanda de hemocomponentes solicitados pelos hospitais, ainda norteiam discussões e publicações científicas na área. Contreas e Martínez (2015) descrevem uma análise retrospectiva do século 21 onde somente 25% das doações de sangue humano são altruístas no Chile, em contrapartida, no Reino Unido estas representam aproximadamente 100% das doações. A grande maioria das doações se dá por reposição, logo há necessidade de haver uma doença ou um desastre para que as pessoas se voluntariem a doar sangue. Os autores também trazem uma comparação entre bancos de sangue do Chile e Reino Unido, em relação à estrutura física e controle de qualidade da coleta, produção e estocagem, e doenças infecciosas. O exemplo do Chile pode ser extrapolado para outros países da América Latina. Neste contexto, para que se possa acompanhar a demanda tecnológica relacionada ao desenvolvimento de soluções de preservação de hemocomponentes antes são necessários aperfeiçoamentos de outras demandas como: novos testes de triagem pré doação e pré transfusão, equipamentos sofisticados para processamento e estocagem dos componentes sanguíneos, implementação de regras de hemovigilância eficazes e programas de doação baseados em doadores altruístas e regulares (Junqueira, Rosenblit e Hamerschalk, 2005; Murphy *et al.*, 2013).

2.1.1. Medicina transfusional veterinária

Na medicina veterinária, o processo foi um pouco mais lento, mas atualmente existem grandes bancos de sangue veterinários em vários países do mundo que tornaram possíveis a prática da medicina transfusional veterinária de alta qualidade. A primeira transfusão sanguínea relatada em animais foi em 1665, quando Richard Lower retirou sangue de um cão e reinfundiu em outro. Entretanto, somente na década de 1950 com a viabilidade de técnicas e equipamentos adaptados da medicina humana, que a medicina veterinária transfusional tornou-se mais proeminente, e fez avanços importantes. Tais

avanços tornaram possível a produção e estocagem de hemocomponentes, adequada triagem dos doadores, tipagem sanguínea e testes de compatibilidade; fazendo com que o processo seja mais complexo do que anteriormente, mas possibilitando os clínicos a escolher adequadamente a terapia a ser utilizada (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Davidow, 2013). O aumento do interesse na medicina veterinária transfusional vem acompanhado pelos avanços na oncologia veterinária e terapia intensiva. Atualmente os componentes sanguíneos são rotineiramente preparados por certas instituições e empresas na Europa, Estados Unidos e mais recentemente no Brasil (Lanevski e Wardrop, 2001; Gonçalves, 2005; Ulata, 2005).

No Brasil, observa-se um aumento significativo na disponibilidade e frequência de transfusões de sangue para os pequenos animais. Um desenvolvimento importante na medicina transfusional veterinária foi o reconhecimento que nem todos os pacientes necessitam de sangue total para tratar a sua condição. Em vez disso, o sangue é agora frequentemente dividido em componentes, maximizando assim os benefícios de cada unidade doada. Muitos hospitais veterinários têm programas internos de doadores de sangue. Normalmente, a diferença é que as instituições maiores têm infraestrutura que lhes permite separar o sangue e produzir hemocomponentes. Obviamente, uma solução fácil e prática para os hospitais e clínicas com menor infraestrutura seria encomendar sangue e seus componentes dos bancos de sangue locais ou regionais. No entanto, ainda existem muitos estabelecimentos que preconizam a coleta dos doadores na própria clínica através das técnicas de coleta aberta/fechada, assim como a administração de sangue total fresco, sem a triagem adequada do doador e muitas vezes sem teste de compatibilidade sanguínea.

Na última década pode-se observar um aumento do interesse no tema da comunidade científica no Brasil, e alguns estudos sobre armazenamento de hemocomponentes, frequência de tipo sanguíneo, reações transfusionais e estudos clínicos têm sido realizados (Reichmann e Dearo, 2001; Gonçalves, 2006; Callan, M. B. *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2009; Baumgarten *et al.*, 2011; Costa, 2011; Esteves *et al.*, 2011; Viana, 2011; Casari, 2012; Kohn, Classe e Weingart, 2012; Souza *et al.*, 2012; Lacerda *et al.*, 2014; Thomovsky e Bach, 2014). Entretanto, nota-se que são necessárias mudanças nas práticas de hemoterapia atualmente utilizadas nos hospitais veterinários brasileiros, estabelecendo programas de cadastro de doadores que permitam atender a demanda de cada região e também o fracionamento dos hemocomponentes,

com o controle de qualidade requerido de forma a atender melhor a cada caso que necessite de transfusão (Bücheler e Cotter, 1992; Lacerda, 2005; Baumgarten *et al.*, 2011; Davidow, 2013).

2.2. O USO DE HEMOCOMPONENTES

Transfusão é a palavra que define a terapia intravenosa com sangue total ou seus subprodutos. Há anos, a hemoterapia tem se baseado no uso de sangue total, e este ainda é o principal uso em medicina veterinária (Rozanski e De Laforcade, 2004; Gibson e Abrams-Ogg, 2012). Os componentes sanguíneos são os subprodutos do sangue e podem ser obtidos através de centrifugação ou, menos comumente, através de aférese (técnica que utiliza equipamentos especializados que permitem a separação de apenas um componente do sangue do doador, devolvendo-lhe o restante). Sabe-se que muitas vezes o paciente requer transfusão de apenas um componente sanguíneo específico. Assim, a separação dos hemocomponentes permite que mais de um paciente possa se beneficiar de apenas um doador e reduz os riscos de uma reação transfusional contra os outros componentes desnecessários (Aubuchon, 2003; Tocci e Ewing, 2009; Gibson e Abrams-Ogg, 2012).

Entretanto, sabe-se que isto não depende somente da disponibilidade de componentes sanguíneos e do uso adequado de cada um deles, mas também da qualidade destes componentes. Respeitar normas adequadas para coleta, processamento e armazenamento é a melhor maneira de alcançar os melhores resultados (Abrams-Ogg e Schneider, 2010; Aubuchon, Custer e Sher, 2011)

Ambos, sangue total e seus componentes, podem ser utilizados logo após a coleta (produtos frescos) ou após o armazenamento (produtos armazenados/estocados). A biopreservação é o processo de manutenção da integridade e funcionalidade das células mantidas fora do seu ambiente de origem por períodos extensos de tempo e o armazenamento hipotérmico é a técnica mais antiga e mais estudada no mundo todo (Blajchman, 2001; Scott, Lecak e Acker, 2005; Eder e Moroff, 2010).

O armazenamento permite acesso imediato ao sangue total e seus subprodutos, mas a coleta sanguínea e a preparação destes podem ser intensivamente trabalhosas e consumir bastante tempo, o que justifica a existência de um banco de sangue em clínicas/ hospitais que realizam transfusões rotineiramente. Além disso, a terapia com

hemocomponentes permite opções para reduzir o volume a ser transfundido, reduzir o número de transfusões, escolha do componente ideal de acordo com a enfermidade e também, reduz a frequência de reações transfusionais (Aubuchon, 2003; Gulliksson, 2003; Abrams-Ogg e Schneider, 2010; Kisielewicz, Self e Bell, 2014).

Na coleta de sangue inicial se tem o sangue total fresco. O sangue completo pode ser armazenado como tal ou separado em componentes plasmáticos e concentrado de eritrócitos. A preparação dos hemocomponentes requer técnicas específicas em que há variação da velocidade, tempo e temperatura de centrifugação, além de requerer outros equipamentos auxiliares. Para evitar a contaminação microbiana prioriza-se por usar sistema de coleta fechado, com bolsas satélites de transferência e sistema de conexão estéril. A vida de prateleira é variável, dependendo do produto e do método de armazenamento. Após a coleta do sangue total fresco, se realizada centrifugação pesada, pode-se obter o concentrado de eritrócitos ou o plasma fresco congelado. Entretanto, quando se usa método de centrifugação leve, pode-se obter, além do concentrado de eritrócitos, o plasma rico em plaquetas, que dará origem ao concentrado de plaquetas e plasma fresco congelado. Independente do método de centrifugação, este último pode ainda ser processado em crioprecipitado e criosobrenadante (Abrams-Ogg e Schneider, 2010; Gibson e Abrams-Ogg, 2012).

Alguns casos requerem ainda o uso de substitutos sanguíneos, que possuem algumas propriedades semelhantes a do sangue como a capacidade de carrear oxigênio, de expandir o plasma e a capacidade de coagulação. Entretanto, o custo destes produtos ainda é elevado e os efeitos adversos não são bem reconhecidos (Rentko, 2012). Os principais hemoderivados em estudos clínicos na veterinária são a imunoglobulina intravenosa humana e a oxiglobina. Ambos possuem indicações variadas, o primeiro é utilizado em distúrbios imunomediados e o segundo em anemias severas e choque. Há risco de reações adversas, mas estas parecem ter uma baixa prevalência, em detrimento da eficácia clínica dos produtos. Mas, entre as limitações destes produtos está o custo elevado, e o fato de não serem de fácil acesso em todos os centros do Brasil (Zambelli e Leisewitz, 2009; Spurlock e Prittie, 2011; Balog *et al.*, 2013).

2.2.1. Indicações para uso de concentrado de plaquetas

Na década de 1950 as transfusões de plaquetas eram utilizadas para reduzir a mortalidade por hemorragia em pacientes com leucemia aguda, e a utilização da terapia vem crescendo desde então. O procedimento tornou-se parte essencial do tratamento de câncer, neoplasias hematológicas, falências medulares e transplante de células-tronco hematopoiéticas em humanos. Em centros de hemoterapia humanos sabe-se que mais de 1,5 milhões de componentes plaquetários são transfundidos a cada ano nos Estados Unidos, e 2,9 milhões na Europa (Stroncek e Rebutta; 2007). Não existem dados sobre o número de transfusões de plaquetas realizadas em pequenos animais, entretanto há um aumento significativo em estudos sobre indicações clínicas, protocolos de administração e testes de viabilidade plaquetária (Abrams-Ogg; Callan, Appleman e Sachais, 2009; Abrams-Ogg, 2010; Kisielewicz, Self e Bell, 2014).

As transfusões de plaquetas são indicadas quando a trombocitopenia é detectada. Resumidamente, a trombocitopenia pode ser causada pela diminuição da produção (trombocitopenia hipoproliferativa decorrente de hipoplasia megacariocítica ou trombopoiese ineficaz), remoção acelerada de plaquetas como resultado de um aumento do consumo (coagulação intravascular disseminada) ou destruição (trombocitopenia imunomediada), sequestro (esplenomegalia) e hemodiluição maciça (hemorragia maciça com substituição de hemocomponente pobre em plaquetas) (Abrams-Ogg; Rozanski e De Laforcade, 2004; Collins, Murphy e Stanworth, 2006).

Na prática clínica, a trombocitopenia imunomediada (TIM) é a causa mais comum de trombocitopenia grave nos cães. Entretanto, as transfusões de plaquetas são raramente administradas a cães com TIM, pois as plaquetas transfundidas podem ser rapidamente destruídas após a sua administração. No entanto, nos cães com TIM que evoluem com hemorragia descontrolada ou com risco de vida (por exemplo, suspeita de hemorragia no cérebro, miocárdio, trato gastrointestinal e pulmões), transfusões de plaquetas podem fornecer hemostasia de curto prazo, apesar de haver um aumento insignificante na contagem de plaquetas após a transfusão (Scott e Jutkowitz, 2010; White e Hohenhaus, 2012). O sangramento associado com trombocitopatias hereditárias, como trombopatia do Basset Hound, trombostenia de Glanzman e doença do estoque plaquetário no Cocker Spaniel Americano, podem ser graves e necessitar de transfusões de plaquetas profiláticas (Abrams-Ogg, 2010; Boudreaux, 2010a).

Recomenda-se a infusão de uma unidade de CP (com aproximadamente 60 mL) para cada 10 kg de peso a cada 24 horas. Não é necessária a realização do teste de compatibilidade, uma vez que não existem antígenos de superfície que poderiam causar reação transfusional hemolítica. As principais reações transfusionais associadas à infusão de CP são a reação não hemolítica febril e de hipersensibilidade (Gonçalves, 2006; Callan, Appleman e Sachais, 2009; De la Lucidi *et al.*, 2011).

Outra possível indicação para a administração de plaquetas é a transfusão massiva, definida como transfusão de um volume de sangue total ou hemocomponente em volume maior que o requerido pelo paciente em um período de 24 horas; ou a infusão da metade do requerimento do paciente em um período de três horas. Protocolos de reanimação em traumas humanos enfatizam o uso de cristaloides e concentrado de hemácias para melhorar o débito cardíaco e a oferta de oxigênio, com o uso de plasma e plaquetas reservados para pacientes com hipotensão persistente que não respondem à infusão de cristalóide (Jutkowitz *et al.*, 2002; Buckley, Aktay e Rozanski, 2009; Godier, Samama e Susen, 2013).

Estudos clínicos mostram resultados positivos em pacientes de trauma politransfundidos que recebem transfusões de plaquetas e plasma anteriores, e em uma proporção inferior a transfusões de eritrócitos. Alguns pesquisadores defendem a administração agressiva de plasma e de transfusões de plaquetas no processo de ressuscitação, como forma de prevenir o desenvolvimento de coagulopatia e trombocitopenia (Blajchman; Jutkowitz *et al.*, 2002; Abrams-Ogg, 2010; Godier, Samama e Susen, 2013). Outros estudos também relatam que os pacientes submetidos a transfusão massiva ou única transfusão em transoperatório possuem taxas de sobrevivência menores em comparação aos não transfundidos ou aqueles que usaram protocolos de transfusão profilática prévia ao procedimento cirúrgico (Lynch, O'toole e Hamilton, 2015). No entanto, essas mudanças não estão sendo universalmente adotadas, são provenientes de estudos retrospectivos e relato de casos isolados. Para determinar os riscos e benefícios desta política de transfusão mais agressiva, são necessários mais ensaios clínicos randomizados e maior acessibilidade aos hemocomponentes de qualidade no momento em que as transfusões são requeridas (Rozanski e De Laforcade, 2004; Callan, Appleman e Sachais, 2009).

Todavia, diferentemente das práticas na medicina veterinária transfusional indicadas há 20 anos, onde se preconizava pelo uso do sangue total fresco para incremento plaquetário, há o entendimento das vantagens de transfundir CP. Sabe-se que o CP irá representar uma redução de reações transfusionais, e de sobrecarga circulatória; além do incremento adequado da contagem plaquetária do receptor (Abrams-Ogg, 2010; Kisielewicz e Self, 2014).

2.3. AS PLAQUETAS

As plaquetas são o menor elemento celular presente na circulação sanguínea. Foram descobertas por Max Shultze em 1865, sendo consideradas massas ou moléculas granulares dispostas isoladas e em grupos. Em 1882, Giulio Bizzozero as descreveu como terceiro elemento do sangue. Sua participação na manutenção da hemostasia foi reconhecida no século 19 (Coller, 1984; Brewer, 2006). Mais recentemente foi identificado seu envolvimento na inflamação e na biologia do câncer, além de sua capacidade de recrutar leucócitos. Desta forma, compreender a estrutura e metabolismo plaquetário é importante não só para o tratamento de pacientes com distúrbios plaquetários adquiridos ou hereditários, mas também como marcadores de doenças com envolvimento sistêmico (Franco, Corken e Ware, 2015).

2.3.1. Estrutura das plaquetas

A plaqueta é um tipo celular especializado com uma estrutura complexa e metabolicamente ativa. São células anucleadas, discoides, com aproximadamente de 2 a 5 µm de diâmetro, e volume celular médio de 6 a 10 fL. A porção externa da membrana plasmática possui receptores (proteínas e glicoproteínas) que estão envolvidos nas funções plaquetárias. Entre eles destaca-se o receptor GPIIb-IIIa que é um importante mediador da adesão e agregação plaquetária, e a glicoproteína Ib-IX-V, conhecido como fator de vonWillebrand (Boudreaux, 2010b). A camada lipídica da membrana permite mobilidade lateral, aumenta a sinalização na fase inicial da ativação, e permite a reorganização do citoesqueleto nos momentos de retração do coágulo (Hartwig, 2006; Boudreaux, 2010b).

O citoplasma plaquetário possui um sistema de canalículos abertos (*open canalicular system* – OCS) responsáveis pela liberação de grânulos e ativação das

plaquetas. Os OCS fornecem um canal de ligação com a membrana plasmática durante a formação de pseudopodes necessários para adesão em uma região lesionada. Além disso, partículas como vírus ou bactérias capturados por estes canalículos são responsáveis por desencadear a ativação plaquetária. Grânulos de glicogênio e organelas como a mitocôndria, complexo de Golgi, ribossomos, lisossomos e peroxissomos também estão presentes no citoplasma. As mitocôndrias são responsáveis pela manutenção do metabolismo energético fornecendo ATP para os eventos de agregação e ativação. Além disso, essa organela possui um papel importante no mecanismo de apoptose (Pereira *et al.*, 2002; Devine e Serrano, 2010). O sistema tubular denso é uma estrutura presente no citoplasma das plaquetas, semelhante a um retículo endoplasmático liso que, possivelmente, se originou dos megacariócito. Este participa da ativação plaquetária através da liberação e sequestro de cálcio e produção de prostaglandinas (Hartwig, 2006).

O citoesqueleto plaquetário, possui diversos tipos de proteínas como filamina, aducina, tetrâmetros de espectrina interconectados a filamentos de actina. As moléculas de espectrina são responsáveis por formar uma membrana densa adjacente no lado citoplasmático da membrana plasmática. Os microtúbulos presentes no citoplasma são responsáveis pela manutenção do formato discóide (Figura 1). A $\beta 1$ tubulina é um dos componentes dos microtubulos, e possui importante papel na formação das plaquetas através da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos (Boudreaux, 2010b).

Durante a ativação plaquetária, três tipos de grânulos de estoque (densos, alfa e lisossomais) são exteriorizados. Os grânulos densos servem para estoque de nucleotídeos de adenina (incluído adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP), serotonina, cálcio, magnésio e fosfatos inorgânicos. Além disso, foram identificadas nos grânulos densos proteínas de sinalização da via glicolítica, chaperonas, proteínas de citoesqueleto, além de proteínas envolvidas na glicólise e na função plaquetária. A membrana dos grânulos densos possui receptores que são expressos na membrana plasmática quando a plaqueta libera a reação de agregação plaquetária. Alguns destes receptores são compartilhados com outros grânulos de membrana (ex. p-selectina ou CD62P) (Mcnicol e Israels, 1999; Boudreaux, 2010b).

Os grânulos alfa são os mais numerosos, sua região nucleóide possui proteoglicanos que os conferem maior estabilidade. Nesta região estão localizados o

fator plaquetário 4 (*platelet factor 4* – PF4) e β -tromboglobulina, importantes para ativação da reação de hemostasia primária. Na região tubular dos grânulos alfa estão localizados o fator de von Willebrand e fator V, e na matriz estão localizados o fibrinogênio, trombospondina e fibronectina. Diversas proteínas são sintetizadas especificamente pelos megacariócitos, e as proteínas seletivas às plaquetas são produzidas de forma parácrina por outros tipos celulares. Estas proteínas se tornam componentes das plaquetas através de endocitose mediada pelo receptor glicoproteína IIb-IIIa (CD61 ou integrina α IIb- β 3). Os grânulos alfa e densos são expressos na superfície plaquetária após a secreção como resultado da fusão destes com os OCS. A fusão dos grânulos alfa é um dos indicadores morfológicos mais precoces de lesões plaquetárias de estoque. A proteína de membrana grânulo alfa mais conhecida é a p-selectina que está expressa na superfície das plaquetas ativadas (CD62P) (Rendu e Brohard-Bohn, 2001).

A identificação de glicoproteína IIb-IIIa (CD61) e p-selectina com anticorpos monoclonais podem ser realizadas por citometria (CD62P) (Umeki *et al.*, 2011). A p-selectina, além de ser um marcador de ativação plaquetária, é um mediador inflamatório. Ela é secretada na superfície plaquetária durante a ativação, forma um complexo com a glicoproteína-1 ligante de p-selectina (*P-selecting protein ligand-1* - PSGL-1), e induz os monócitos a secretar fator tecidual e agonistas para o sistema de coagulação. Quando agregados de plaqueta-leucócito ou agregados somente de plaquetas circulam, há um potencial para trombose, inflamação e coagulação. As plaquetas ativadas também produzem micropartículas que contêm fatores de adesão como a p-selectina e fosfatidilserina (*phosphatidylserine* – PS), permitindo uma maior interação com os fatores de coagulação. Esta interação pode contribuir com a inflamação e coagulação, predispondo o paciente a um evento tromboembólico (Wills, Wardrop e Meyers, 2006; Franco, Corken e Ware, 2015)

Por fim, os grânulos lisossomais plaquetários contêm hidrolases acido-dependentes incluindo glicosidases, proteases e lipases, com funções ainda não totalmente compreendidas. A membrana lisossomal possui proteínas que são exteriorizadas durante a liberação da reação plaquetária. A grande importância das proteínas da membrana lisossomal é mediar o transporte de íons e aminoácidos, promovendo a manutenção do pH luminal ácido (Metzelaar e Clevers, 1992; Malini *et al.*, 2015).

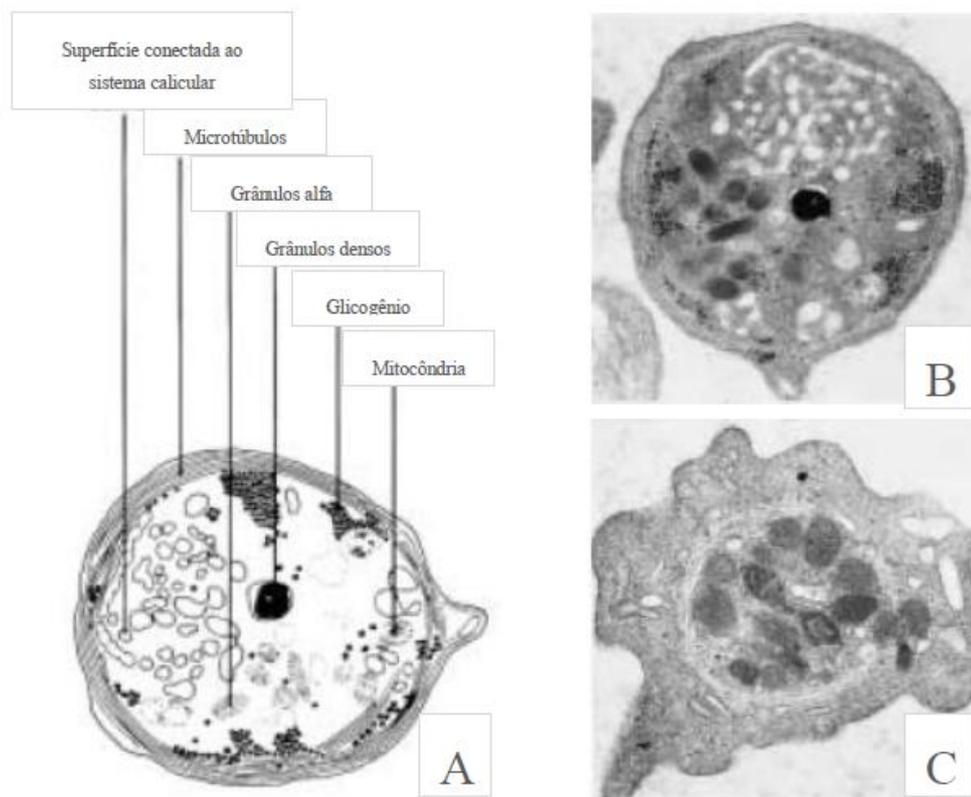


Figura 1. A. Microscopia eletrônica do corte transversal de uma plaqueta em repouso (21000X) com as indicações das estruturas internas. B e C. Microscopia eletrônica do corte transversal de uma plaqueta ativada (30000X) de uma plaqueta ativada demonstrando a contração do anel microtubular ao redor dos grânulos e a formação de pseudópodes. Fonte: adaptado de George, 2000.

2.3.2. Formação e senescência plaquetária

Com relação à cinética plaquetária, sabe-se que o megacariócito recém-diferenciado da célula tronco pluripotencial hematopoética possui intensa marcação para a proteína CD34 e uma menor marcação para CD41. Entretanto, ao longo da diferenciação na linhagem megacariocítica, adquire a marcação para CD61 e CD42, e diminui de CD41. Nos estágios tardios de diferenciação apresentam os marcadores CD61, CD42 e CD36. A identificação das plaquetas com o anticorpo monoclonal CD61, também pode ser realizada através de citometria de fluxo. Estudos em caninos, equinos e humanos já demonstraram a eficácia deste anticorpo na detecção dessa molécula (Kingston Jk Fau – Bayly *et al*, 2002a; b).

Os grânulos alfa e densos são formados na fase de megacariócito, sendo que algumas das proteínas associadas aos grânulos alfa (ex. Von Willebrand) são sintetizadas endogenamente. A trombopoietina é a principal citocina que regula todos os estágios de diferenciação e produção plaquetária e os progenitores megacariocíticos podem ser influenciados por interleucinas (IL-3, 6, 11, e 12), fator estimulador de colônia granulocítico-monocítico (GM-CSF) e eritropoietina. A trombopoietina é produzida pelo fígado, e em pequena quantidade pelo rim (Chang *et al.*, 2007).

O complexo actina/miosina participa ativamente da formação próplaquetária, ou seja, na transformação do megacariócito em proplaqueta. A tubulina e os polímeros de actina estão envolvidos na manutenção do tamanho da plaqueta discóide madura. Na medula óssea, o megacariócito migra para uma região próxima ao endotélio vascular. Isso permite que os pseudópodes das proplaquetas se estendam aos sinusóides da medula, facilitando a migração do megacariócito para a circulação periférica. O processo final de formação plaquetária ocorre na circulação periférica, prevenindo sua retenção na medula óssea. O mesmo processo pode ocorrer no pulmão, sendo este órgão, um sítio alternativo de trombopoiese (Russell, 2010).

As plaquetas circulam por cinco a nove dias e depois são fagocitadas por macrófagos do baço e fígado. A curta meia vida plaquetária suscita uma melhor compreensão sobre os fatores que interferem na remoção destas células da circulação e, principalmente, nos mecanismos relacionados à “morte celular programada”. Tais mecanismos estão diretamente relacionados as limitações no tempo de estoque dos concentrados de plaquetas, que é um ponto crítico que merece especial atenção (Hartwig, 2006; Chang *et al.*, 2007).

Os mecanismos envolvendo exposição da PS, dano ou desnaturação de glicoproteínas e proteoglicanos e a formação de fragmentos e/ou micropartículas plaquetárias são fatores envolvidos com a senescência desta célula. A PS induz a fagocitose direta pelos macrófagos ou através da ligação dos receptores de PS a proteínas macrofágicas (Russell, 2010). A exposição da PS e a formação de micropartículas é um marcador de apoptose bem reconhecido em células nucleadas e plaquetas. Diversos estudos demonstram o aumento da exposição da PS na membrana de plaquetas senescentes através da ligação desta com Anexina V. Os mecanismos

utilizados pelos macrófagos e células endoteliais no reconhecimento e fagocitose de plaquetas senescentes envolvem a ativação da via 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 apoptose é caracterizada pela condensação da cromatina e núcleo, seguido da fragmentação da célula em corpos apoptóticos que poderão ser removidos pelos fagócitos. É um processo controlado e dependente de energia, associado à redução dos níveis de ATP. Essa via de sinalização está diretamente relacionada com uma família de proteases chamadas caspases. As caspases-8 e 9 agem como mediadores da ativação das caspases-3 e 7, que são responsáveis pela morte e rompimento das estruturas celulares. Existem dois principais mecanismos envolvidos na apoptose: uma via extrínseca (via receptor de morte celular); e uma via intrínseca (via mitocondrial) (Hengartner, 2000) (Figura 2).

A via extrínseca é iniciada pela ativação de vários receptores de morte por seus ligantes específicos, incluindo CD95. Ativação destes receptores leva a formação do complexo de sinalização de indução de morte (*death-inducing signalling complex* – DISC) que recruta múltiplas cópias de procaspase-8 ao DISC com auxílio da proteína de morte associada ao Fas (*Fas-associated death domain protein* - FADD). A proximidade das moléculas de procaspase-8 resulta na sua ativação em caspase-8. A caspase-8 é um efetor da ativação da procaspase-3 em caspase-3 e, esta por sua vez, ativa um complexo multimérico chamado de apoptossomo (Pereira *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2013).

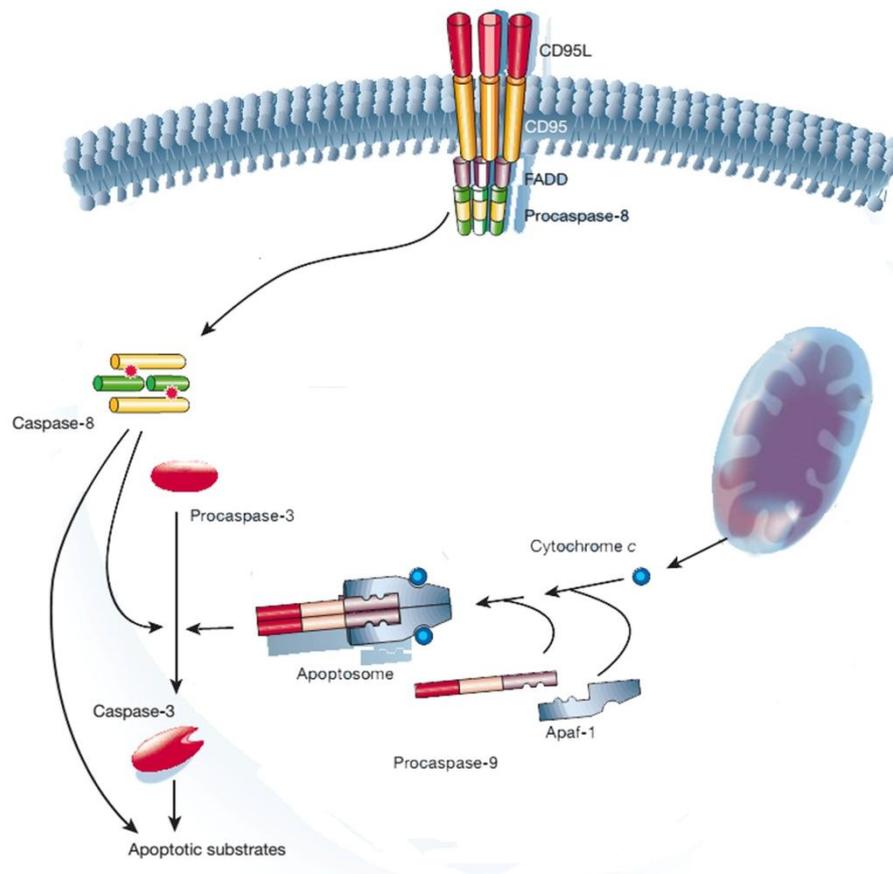


Figura 2. Principais componentes das vias intrínseca e extrínseca da via da sinalização da apoptose. São componentes da via intrínseca citocromo c, Apaf-1, procaspase-9; e da via extrínseca CD95, FADD, procaspase-8 e caspase-8. As vias ativam a caspase-3, que por sua vez ativa o apoptossomo culminando com o rompimento das estruturas celulares e formação dos corpos apoptóticos. Fonte: adaptado de Hengartner (2000).

Na via intrínseca, há liberação de sinais intracelulares que resultam na permeabilização da membrana externa mitocondrial. A permeabilização da membrana externa mitocondrial é um requisito para a liberação dos fatores pró-apoptóticos. O citocromo c é o principal componente pró-apoptóticos do espaço intermembrana da mitocôndria. Ao ser liberado no citosol, o citocromo c se liga com o fator protease ativador de apoptose-1 (Apaf-1) que leva a formação do apoptossomo. Apaf-1 também é responsável por recrutar a procaspase-9, que se autoativa em caspase-9 e age mediando à ativação de procaspase-3 em caspase-3 e, conseqüentemente na ativação do apoptossomo (Pereira *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2013). Outras condições podem levar a formação de poros e conseqüente permeabilização da membrana mitocondrial, como baixos níveis de ATP e dano oxidativo.

A perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi reconhecida em concentrados de plaqueta humanos estocados em plasma e em soluções aditivas sintéticas (Composol e SSP+) através de testes *in vitro* com sondas fluorescentes (*J-aggregate forming cation* - JC-1). A permeabilização da membrana externa mitocondrial leva a despolarização ou perda do $\Delta\Psi_m$, reduzindo a capacidade de sintetizar ATP, desta forma, ocorre o estímulo para formação do complexo Citocromo c-Apaf-1-caspase-9-apoptossomo-caspase-3. A redução do $\Delta\Psi_m$ está diretamente correlacionada com o aumento da exposição da PS (Anexina V) (Pereira *et al.*, 2002; Cookson *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011). Estudos mostram que plaquetas de caninos sofrem apoptose mediada pela mitocôndria de forma semelhante ao que acontece em plaquetas humanas (Pereira *et al.*, 2002).

2.3.3. Função das plaquetas

Sabe-se que as plaquetas fazem parte da hemostasia primária realizando cinco funções primárias: aderência, agregação, secreção, e proporcionando a superfície pró-coagulante e de retração do coágulo. A elucidação dos mecanismos moleculares que realizam estas funções levou a uma melhor compreensão da patofisiologia da hemorragia e do desenvolvimento de novas abordagens de tratamento para pacientes com distúrbios plaquetários qualitativos e quantitativos. O conhecimento deste metabolismo também contribui para a aplicação de testes *in vitro* e *in vivo* utilizados em estudos que envolvem hemocomponentes, soluções aditivas, filtros de leucorredução e bolsas de armazenamento (Kickler, 2006).

Em relação à função, as plaquetas aderem às superfícies subendoteliais expostas, formam agregados e liberam substâncias amplificadoras do processo hemostático presente nos grânulos citoplasmáticos. O conteúdo dos grânulos desempenha uma variedade de funções que inclui o recrutamento de plaquetas adicionais, liberação local de proteínas de coagulação e agentes fibrinolíticos. Além disso, fornecem proteínas quimiotáticas para fibroblastos e outras células necessárias para a reparação de tecidos, como os neutrófilos e macrófagos. As plaquetas também servem como suporte para o conjunto de proteínas de coagulação necessárias para a formação eficiente de fibrina. A retração e estabilização do coágulo são eventos fundamentais na prevenção da

dissolução prematura do coágulo e necessitam da participação ativa das plaquetas (Boudreaux e Catalfamo, 2010; Christopherson, Spangler e Boudreaux, 2012).

A ligação de agonistas plaquetários a receptores específicos, induz uma sinalização “de dentro para fora” que resulta em uma mudança conformacional das glicoproteínas da superfície de membrana, facilitando a adesão e agregação plaquetária. A ativação plaquetária altera a conformação dos receptores de membrana de adesão para o colágeno (receptor $\alpha 2\beta 1$) e fibrinogênio (receptor $\alpha IIIb\beta 3$). Por sua vez, a ligação das proteínas aos receptores promove/aumenta a liberação de grânulos e permite a agregação plaquetária, formação de fibrina e retração do coágulo (Saunders *et al.*, 2013). As moléculas são geradas por várias vias de sinalização em resposta ao controle interno e externo de ligação ao colágeno ou fibrinogênio. Há formação de complexos firmes e irreversíveis que consolidam a adesão e agregação. O cálcio ionizado plaquetário fica elevado por tempo prolongado e o receptor $\alpha IIIb\beta 3$ torna-se secundariamente inativado. Na forma inativa o receptor $\alpha IIIb\beta 3$ perde a capacidade de ligação com o fibrinogênio, promovendo a exposição de PS. Quando a PS é externalizada, algumas proteínas de coagulação podem se ligar a superfície plaquetária. Sendo assim, a plaqueta irá atuar como um esqueleto para o complexo tenase-protrombinase, que acelera a formação de trombina e permite a formação do coágulo no local de lesão vascular (George, 2000; Boudreaux e Catalfamo, 2010).

A criação de um *plug* hemostático inicial direciona a coagulação para o exato local da lesão. O confinamento espacial das reações que envolvem a coagulação auxilia a atividade de várias enzimas e facilitar a formação do coágulo. A exposição da PS na superfície plaquetária é um dos fatores que auxilia neste processo. Para que este evento ocorra é essencial manter a assimetria da plaqueta, sendo este processo dependente de ATP (George, 2000). Receptores acoplados a proteína G (GPCR) são responsáveis por ligar as vias de sinalização interna e externa. Os receptores extracelulares para ADP/ATP ($P2\gamma 1$ e $P2\gamma 12$), trombina (PAR1 e PAR4) e colágeno ($\alpha 2\beta 1$ e GPVI) interagem com seus ligantes específicos mediados pelas vias de sinalização “de fora para dentro” (Boudreaux e Catalfamo, 2010).

Embora a função hemostática da plaqueta seja considerada sua função primária, observa-se cada vez mais interesse no entendimento da sua contribuição na inflamação, através do recrutamento dos leucócitos para os locais de lesão vascular e a liberação de

mediadores associados a condições inflamatórias. Além de seu envolvimento na oncogênese e doenças neurológicas (Shrivastava *et al.*, 2011; Franco, Corken e Ware, 2015).

2.3.4. Metabolismo plaquetário

Embora a plaqueta seja um fragmento de célula anucleada, ela é metabolicamente ativa, possui mitocôndria e produz ATP através da glicólise anaeróbica e aeróbica. Assim como em outros tipos celulares, a oxidação da glicose a piruvato ocorre no citosol e a oxidação do piruvato ocorre na mitocôndria via ciclo dos ácidos tricarboxílicos (*tricarboxylic acid cycle* – TCA). Sendo assim, podemos inferir que esses pequenos fragmentos de células possuem a capacidade de produzir paralelamente lactato, pela condição anaeróbica, e piruvato decorrente da oxidação aeróbica (Figura 2). Como a glicólise e a fosforilação oxidativa são processos contínuos, o produto de uma via serve como substrato para a outra (Devine e Serrano, 2010; Gyongyossy-Issa, 2011).

Em resposta a situações de baixa disponibilidade de oxigênio, as plaquetas fazem a conversão de glicose a lactato (efeito Pasteur). O efeito Pasteur ocorre quando há diminuição da função mitocondrial ou perda do $\Delta\Psi_m$; e também em situações em que a $pO_2 < 2,0$ mmHg (estudos *in vitro* em plaquetas humanas) (Guppy *et al.*, 1995). Os primeiros estudos relatavam um metabolismo plaquetário predominantemente anaeróbico. Atualmente se sabe que o metabolismo aeróbico é o maior contribuinte para produção de ATP, e este por sua vez, é proporcional ao número de mitocôndrias presentes/viáveis. O aumento dos níveis de lactato (glicólise anaeróbica) em plaquetas armazenadas sugere uma restrição da oxigenação ou diminuição da função mitocondrial (Gyongyossy-Issa, 2011; Ohto e Nollet, 2011). No estado de ativação plaquetária a maioria da energia metabólica é proveniente da glicólise. A atividade glicolítica se torna mais intensa pela degradação dos grânulos de glicogênio plaquetário em moléculas de glicose que, na sequência, são reduzidas a lactato (Gyongyossy-Issa, 2011).

As plaquetas também possuem capacidade de produzir lactato pela glicólise anaeróbica, mesmo na presença de oxigênio suficiente para suportar a respiração mitocondrial. Isso ocorre pois os metabólitos intermediários produzidos na via glicolítica são necessários para a biossíntese, manutenção e expansão da biomassa

(Devine e Serrano, 2010; Gyongyossy-Issa, 2011). Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez por Otto Warburg e é referido como "efeito Warburg". As plaquetas também são capazes de metabolizar ânions orgânicos, como propionato e glutamina; ácidos graxos, como palmitato, triglicerídeos, corpos cetônicos e beta-hidroxibutirato. Intermediários glicolíticos como piruvato, citrato e acetato podem alimentar a via oxidativa aeróbica (Gyongyossy-Issa, 2011).

O destino das vias de respiração celular é modulado de acordo com as fontes de carbono disponíveis. Quando os combustíveis de preferência (acetato, citrato, ácidos graxos) estão disponíveis, diminui a glicólise, entretanto a produção de lactato nunca deixa de existir. O acetato parece ser a fonte de energia preferencial destas células. Estudos demonstraram que plaquetas armazenadas em soluções aditivas sintéticas livres de glicose e com acetato não conseguem manter sua função e níveis energéticos adequados. Indicando que o acetato é um dos combustíveis preferenciais, entretanto 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 (Figura 3) (Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006).

Destaca-se que a perda de potencial de membrana mitocondrial está diretamente associada ao envelhecimento da plaqueta na circulação e redução do metabolismo aeróbico, o que justifica o aumento na produção de lactato acompanhada a senescência da célula (Boudreaux, 2010b; Devine e Serrano, 2010; Gyongyossy-Issa, 2011).

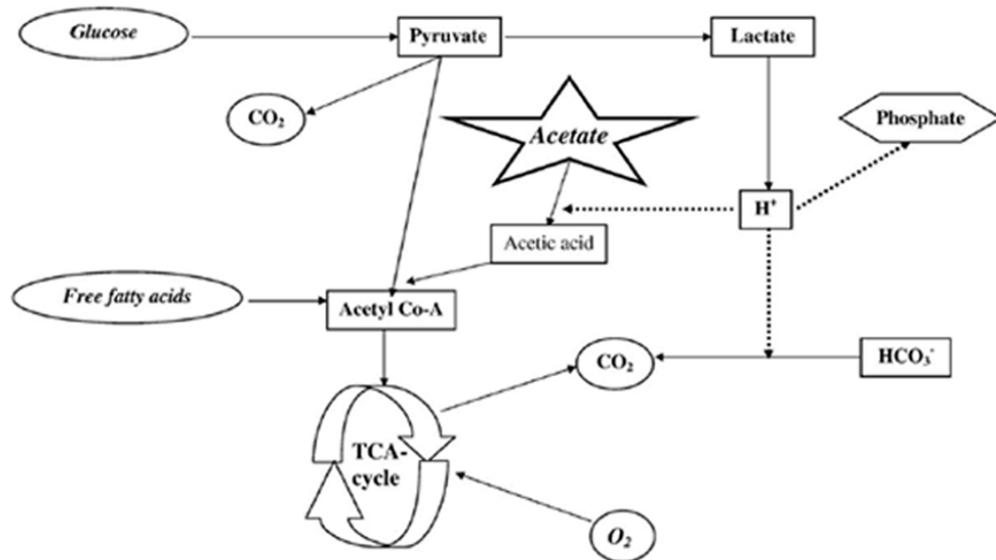


Figura 3. Representação esquemática das vias metabólicas da plaqueta em um meio de preservação sintético com glicose e acetato. Observar a via aeróbica e anaeróbica para obtenção de energia. Também se observam os ácidos graxos livres e acetato servindo como substrato para o metabolismo oxidativo. O acetato também age como tampão alternativo, assim como o HCO_3^- e fosfato (seta pontilhada). Fonte: Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006.

2.4. CONCENTRADO DE PLAQUETAS

A falta de um doador de sangue prontamente disponível, a curta vida de prateleira do CP, e a dificuldade de administrar um número suficiente de plaquetas para atender as necessidades de transfusão de um cão, são as principais dificuldades encontradas, mesmo em instituições veterinárias com serviços de banco de sangue bem estabelecidos. Entretanto, os CP são os produtos ideais para a transfusão de plaquetas terapêutica ou profilática. Eles possuem maior número de plaquetas em um menor volume se comparado com o sangue total fresco e, portanto, podem ser usados para aumentar a contagem de plaquetas rapidamente enquanto minimiza a transfusão desnecessária de outros componentes do sangue e minimiza o risco de reações transfusionais (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Abrams-Ogg, 2010).

2.4.1. Métodos de preparação

Existem três principais métodos para obtenção do CP. O método do plasma rico em plaquetas (PRP-CP), onde o PRP é separado do sangue total por centrifugação leve. Então, por extração manual ou automática o PRP é separado dos eritrócitos e realocado em uma bolsa satélite (específica para armazenamento de CP). Esta bolsa satélite é submetida a uma centrifugação pesada, o excesso de plasma é extraído resultando em um *pellet* de plaquetas ressuscitado em 50 a 70 mL de plasma. Este é o método mais utilizado para produção de CP em bancos de sangue veterinário (Callan, Appleman e Sachais, 2009; Abrams-Ogg e Schneider, 2010) (Figura 4A).

Preferido pelos bancos de sangue europeus, no método de *buffy coat* (BC), após a coleta o sangue total é estocado por 24 horas a 22°C e depois sofre uma centrifugação pesada onde 95% das plaquetas se concentram junto aos leucócitos na capa leucocitária (*buffy coat*). Então, por extração automática onde se faz uma centrifugação pesada extraindo os eritrócitos para uma bolsa satélite, o plasma para outra bolsa e o BC para outra. Normalmente de 4 a 6 BC são misturados, fazendo um *pool*. Posteriormente, a bolsa com BC sofre uma centrifugação leve, onde os eritrócitos e leucócitos remanescentes são retirados. Este método tem como vantagem a possibilidade de armazenar a bolsa por um dia antes do processamento, e também um maior rendimento de plasma para produção de outros hemocomponentes e hemoderivados (Callan, Appleman e Sachais, 2009) (Figura 4B).

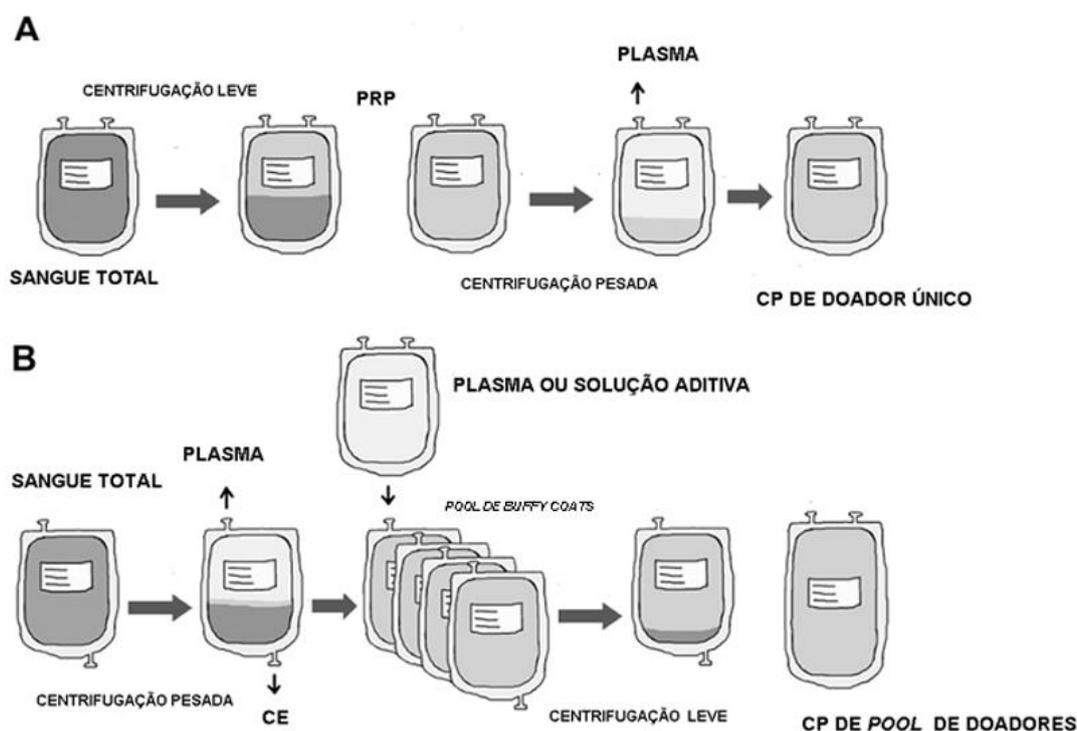


Figura 4. Preparo do concentrado de plaquetas pelo método do plasma rico em plaquetas (PRP) e *buffy coat* (BC). **A.** No método de PRP o sangue total é submetido a centrifugação leve, o PRP é extraído para uma bolsa secundária (específica para armazenamento de CP), que é submetida a centrifugação pesada. Posteriormente é retirado o excesso de plasma, resultando em um CP de único doador com aproximadamente 60 mL. **B.** No método BC (*top and botton*) o sangue total é submetido a centrifugação pesada, o plasma é extraído por cima (*top*) e o concentrado de eritrócitos por baixo (*botton*), deixando o BC com plaquetas na bolsa de coleta inicial. Várias unidades de BC são agrupadas (*pool*) e é adicionado plasma ou solução aditiva plaquetária. Este *pool* é submetido a centrifugação leve para sedimentar os eritrócitos residuais. Então o *pool* de CP é extraído para uma bolsa secundária (específica para armazenamento de CP). Fonte: Adaptado de Devine e Serrano (2010).

A coleta também pode ser realizada por aférese, que é um processo automatizado. Este é o método mais utilizado em bancos de sangue americanos, sendo muito utilizado em humanos, e ocasionalmente em animais (Hoareau *et al.*, 2014). Durante a plaquetaférese, o sangue é removido do doador e anticoagulado com citrato, em um circuito extracorpóreo onde a plaqueta é separada do sangue total por centrifugação e os eritrócitos retornam para o doador. O procedimento tem muitas vantagens para o receptor, pois haverá uma exposição extremamente reduzida aos componentes eritrocitário, plasmático e leucocitário do doador (Callan, Appleman e

Sachais, 2009). Um estudo experimental com doadores caninos relatou que o procedimento foi bem tolerado pelos animais, cada doação teve uma média de 90 a 120 minutos. Mas tem como efeito colateral a redução da concentração de cálcio ionizado, requerendo suplementação deste mineral nos doadores (Callan, M. B. *et al.*, 2008).

2.4.2. Considerações sobre o armazenamento

Um dos principais cuidados durante a coleta, processamento e armazenamento do CP é a correta esterilização. A contaminação bacteriana do componente plaquetário pode resultar em consequências potencialmente fatais. Muitos procedimentos são recomendados para reduzir o risco de bacteremia incluindo tricotomia ampla e anti-sepsia adequada do local de venopunção, descarte dos primeiros 20 mL de sangue para prevenir a contaminação da pele, monitoramento das unidades plaquetárias durante o período de estoque e antes da transfusão. No Brasil, recomenda-se que 10% ao mês das unidades produzidas sejam testadas quanto à contaminação bacteriana durante o período de estoque (Anvisa, 2014a).

A recomendação é que depois de processados, os CP permaneçam em repouso por uma hora e posteriormente sejam colocados em agitação contínua até o final do período de estoque. Estudos demonstram que estocar plaquetas em condições estáticas resulta em decréscimo do pH, baixa capacidade de agregação e aumento da ativação plaquetária. Períodos sem agitação, por até 24 horas não resultam em danos severos a viabilidade, mas quando acima deste período alterações metabólicas funcionais e morfológicas serão observadas (Hunter, Nixon e Murphy, 2001; Dumont *et al.*, 2007; Skripchenko *et al.*, 2010).

Em relação à temperatura, recomenda-se que o CP seja armazenado a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Tentativas experimentais de armazenamento de CP humanos a 37°C , mimetizando a temperatura corporal, mostraram maior risco de contaminação bacteriana, o dobro de consumo de oxigênio, aumento dos níveis de lactato e redução do pH (Blajchman, 2001). Algumas alternativas estão sendo testadas com intuito de reduzir a temperatura de estoque: plaquetas refrigeradas a 4°C , plaquetas criopreservadas a -80°C , que tem como grande vantagem o período de estoque prolongado para 1 ano e plaquetas liofilizadas que permitem o armazenamento a -80°C por muitos anos. Estes métodos não habituais de armazenamento relatados têm como principal vantagem o tempo de

estoque prolongado e o baixo risco de contaminação bacteriana. Entretanto, estudos relatam como desvantagem a baixa recuperação pós-transfusional e redução da meia vida, sendo produtos indicados somente para controle de hemorragia ativa (Allyson, Abrams-Ogg e Johnstone, 1997; Appleman *et al.*, 2009; Callan, Appleman e Sachais, 2009; Davidow *et al.*, 2012).

2.4.3. Critérios para avaliação laboratorial

Segundo Abrams-Ogg (2003; 2010), um CP canino preparado por centrifugação de uma bolsa de 450 mL de sangue total fresco pode tem em média $8,0 \times 10^{10}$ plaquetas por unidade, a contagem de leucócitos é de $0,1$ a $2,3 \times 10^9$ por unidade, e o hematócrito varia de 0,1% a 2,6% (sendo o ideal $< 1\%$). Quando preparado por aférese de um único doador de sangue, pode conter em média de $1,0$ a $2,95 \times 10^{11}$ plaquetas/unidade. Em relação ao volume, enquanto um CP preparado de uma unidade de sangue total contém de 40 a 70 mL, o CP por aférese pode conter de 200 a 300 mL. Os CP são usualmente armazenadas a temperatura ambiente durante 5 dias (Dumont e Vandembroeke, 2003; Callan, Mary Beth *et al.*, 2008).

Como não existe uma agência universal regulamentadora dos procedimentos operacionais padrão para produção de hemocomponentes em medicina veterinária, leva-se em consideração as diretrizes sugeridas pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, BR) e Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB, US). Segundo estas agências o CP obtido do sangue total através do método do PRP deve ser armazenado de 20 a 24°C sob agitação constante e deve seguir parâmetros já pré-definidos: deve ter volume entre 50 e 60 mL, contagem de plaquetas $> 5,5 \times 10^{10}$ por unidade de CP (em pelo menos 90% das unidades produzidas), análise microbiológica negativa, $\text{pH} \geq 6,2$ e presença do efeito *swirling* até o final do período de estoque. Aquelas unidades que foram leucorreduzidas devem ter $< 8,3 \times 10^5$ leucócitos residuais por unidade. Em relação à contaminação eritrocitária, o hematócrito deve ser $< 1\%$ (Stroncek e Rebutta; Anvisa, 2004; Gonçalves, 2006; Stroncek e Rebutta, 2007; Anvisa, 2014a; Kaufman *et al.*, 2015).

2.4.4. Bolsas para armazenamento de concentrado de plaquetas

Mudanças no pH dos concentrados de plaquetas podem exercer efeitos deletérios na viabilidade plaquetária. A fim de manter o pH durante o armazenamento a 22°C, é necessário o uso de bolsas que permitam a eficiente permeabilidade de oxigênio e dióxido de carbono. A primeira geração de bolsas eram compostas de policloreto de vinila (PVC) e di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), possuíam pouca permeabilidade ao oxigênio, permitindo estoque por apenas 3 dias. O pH das unidades caía para menos de 6,0 ao final do tempo de estoque, além disso, foram identificados efeitos nocivos ocasionados pela lixiviação do ftalato no concentrado de plaquetas. Quantidade significativa de ftalato poderia migrar para o sangue estocado, e se estocar no tecido humano com potencial efeito carcinogênico e teratogênico (Carmen, 1993). Então, outra tentativa foi reduzir a quantidade de DEHP e substituir o PVC pelo polietileno. Estudos *in vitro* demonstraram que este último mantinha melhores níveis de pH e taxa reduzida de produção de lactato. Efeito correlacionado ao fato de que o material é duas vezes mais permeável ao oxigênio que o PVC (Jaeger e Rubin, 1972; Van Der Meer e De Korte, 2011). Como descrito anteriormente, Guppy e colaboradores observaram que em condições de anóxia a célula aumenta sua dependência pelo metabolismo anaeróbico com o objetivo de manter os níveis energéticos, e assim aumentar a produção de lactato – efeito Pasteur (1995).

Todavia, o polietileno se mostrou ser muito frágil para produção de bolsas de sangue. Então, uma segunda geração de bolsas, agora usando poliolefina, material robusto o suficiente para uso na rotina e com a permeabilidade adequada para a troca gasosa foi produzido. Outros estudos sugeriram que a fineza do plástico e tamanho da bolsa também influenciaria na viabilidade plaquetária. Plásticos mais finos poderiam ajudar na permeabilidade de oxigênio, e bolsas maiores maximizariam a área de superfície para difusão dos gases (Prowse, De Korte, Hess, Van Der Meer, *et al.*, 2014).

Nesta segunda geração também foram produzidas bolsas com di-n-deciltalato (DnDP)-PVC e tri(2-etilhexil) trioctiltrimelitato (TEHTM ou TOTM)-PVC, estas possuíam uma maior permeabilidade ao oxigênio, estendendo o tempo de estoque para 5 dias (Dekkers *et al.*, 2007; Tynngård, Trinks e Berlin, 2010; Tynngård, N., Trinks, M. e Berlin, G., 2012). Testes comparativos mostraram a eficácia das bolsas desenvolvidas com DnDP-PVC e di-undecil tereftalato-PVC (nome comercial UPX80), outro produto

de segunda geração, quando comparados com os citados anteriormente (Van Der Meer *et al.*, 2010; Van Der Meer e De Korte, 2011).

Entretanto, um estudo mais recente desenvolvido por van der Meer e colaboradores comparou o armazenamento dos CP em seringa, bolsas DEHP-PVC e bolsas butiril tri-n-hexil citrato (BTHC)-PVC, um produto de terceira geração. Todos os resultados correlacionados a manutenção do pH, níveis de oxigênio, consumo de glicose e produção de lactato favoreceram as bolsas de BTHC-PVC (Krailadsiri, Seghatchian e Williamson, 2001; Tynngård, 2009; Van Der Meer e De Korte, 2011).

Dentre as empresas que fornecem sistemas de coleta de sangue no Brasil com bolsas para armazenamento de plaquetas estão: Fenwal, FreseniusKabi, Terumo Medical Corporation e JP Indústria Farmacêutica. Na linha de produtos Fenwal, PL 146 (DEHP-PVC) é o plástico utilizado para o armazenamento de eritrócitos, mas também pode ser utilizado para concentrado de plaquetas. Entretanto não se recomenda armazenamento de CP por mais de 3 dias, por ser considerado um material de primeira geração. A mesma empresa também tem um plástico multiuso de segunda geração PL1240 contendo PVC e trimelitato como plastificante (TOTM-PVC); que é duas vezes mais permeável ao oxigênio e dióxido de carbono do que o PL 146. E também, o PL 2410 que é composto de plástico de poliolefina e é quatro vezes mais permeável ao oxigênio e dióxido de carbono do que o PL 146. A Fresenius Kabi possui as bolsas da linha Compoflex com opções em DEHP e TOTM. A JP Indústria Farmacêutica possui a linha Standard usando TOTM como material das bolsas para armazenamento de plaquetas. A Terumo Medical Corporation utiliza o XT612 que é composto de PVC e utiliza como o DEHP como plastificante. Todas as tecnologias que usam o DEHP foram modificadas; com espessura do plástico reduzida houve incremento na troca de gases e baixo risco de contaminação por ftalato. Esta modificação permite para maior permeabilidade de oxigênio e carbono dióxido através do recipiente, aproximadamente duas vezes que o PL 146 (Simmchen, Ventura e Segura, 2012; Prowse, De Korte, Hess, Van Der Meer, *et al.*, 2014). Todos os materiais citados são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA, US). No Brasil, a Anvisa recomenda somente o DEHP-PVC e TOTM-PVC pra armazenamento de CP humano por 5 dias (Anvisa, 2014b).

Um estudo testou a eficácia do armazenamento de CP canino por 9 dias em bolsas TOTM-PVC (PL1240, Baxter), poliolefina, (PL732, Baxter) e DEHP-PVC (XT

612, Terumo Medical Corporation). Todas mantiveram pH aceitável (> 6,2) até o último dia de estoque. Entretanto, os CP armazenados em XT612 e PL1240 tiveram melhores resultados em relação as avaliações metabólicas de lesão de estoque plaquetário. Mas, corroborando com dados de CP humano pode-se observar uma diminuição significativa da pO₂ nas amostras armazenadas em XT612 (Sink, 2002).

Vários estudos tem sido desenvolvidos para encontrar o material adequado de armazenamento deste hemocomponente. A alta concentração de plaquetas associada ao baixo volume plasmático dos CP faz com que haja um aumento da produção de lactato, levando a variações de pH e redução do tempo de prateleira do produto (Van Der Meer e De Korte, 2011; Prowse, De Korte, Hess, Van Der Meer, *et al.*, 2014).

Estudo baseado em hemoterapia humana mostra que a melhora na permeabilidade das bolsas fez com que o tempo de armazenamento tenha aumentado de três para até sete dias. O material mais recentemente avaliado é totalmente livre de ftalato e PVC - di(isononil)ciclohexano-1,2-dicarboxilato (DINCH) – e mostrou-se eficaz para estoque de plasma, eritrócitos e plaquetas. Sendo a última, armazenada por sete dias (Lagerberg *et al.*, 2015). Obviamente, o aumento do tempo de armazenamento também está associado ao desenvolvimento de soluções aditivas, introdução de técnicas de redução de patógenos e uso de separadores automatizados (Tynngård, 2009; Van Der Meer *et al.*, 2010; Van Der Meer *et al.*, 2012).

2.5. SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO PARA CONCENTRADO DE PLAQUETAS

Nos hospitais veterinários, recomenda-se o uso de múltiplas transfusões de plaquetas em pacientes com contagens plaquetárias baixas. Esta recomendação leva em conta a dificuldade na aquisição de hemocomponentes com um elevado número de plaquetas, e a tendência de transfundir somente por indicação terapêutica, e não profilática. Nota-se também que a sobrevivência média de plaquetas no cão é apenas de 5 a 7 dias *versus* 8 a 11 dias em humanos. Além disso, as plaquetas caninas podem perder a viabilidade mais rapidamente durante o armazenamento à temperatura ambiente. Portanto, a frequência entre transfusões é maior em cães do que as relatadas em humanos (Jutkowitz *et al.*, 2002; Buckley, Aktay e Rozanski, 2009). Abrams-Ogg

(2003), estimou que a contagem de plaquetas possa cair cerca de 33% por dia, o que exige uma nova transfusão a cada dois ou três dias.

A ideia de estocar plaquetas em meio artificial, livre de plasma, começou em 1980, junto com as primeiras tentativas de estocar plaquetas. A procura por novas formas ou soluções aditivas de preservação sempre foi uma preocupação para a medicina humana, este interesse contínuo se dá pelas evidentes vantagens deste método:

- O aumento da disponibilidade de plasma para fracionamento (Alhumaidan e Sweeney, 2012).
- A redução da ocorrência de reações transfusionais. A frequência de reações não hemolíticas agudas em CP tradicionais é de aproximadamente 20%, de reações moderadas a severas de 2,2% (Enright *et al.*, 2003). Em cães, esta frequência chega a 35,7% (Gonçalves, 2006). Estudos anteriores já demonstram a queda de reações relacionadas ao plasma em CP armazenado em salina ou Plasmalyte A (Vo *et al.*, 2001). Posteriormente, estudos clínicos randomizados avaliaram o uso de SAP, assim como a redução do volume residual de plasma para 65% SAP/35% plasma, e os resultados demonstraram redução de reações transfusionais não hemolíticas (1,37 para 0,5%), alérgicas (0,82 para 0,29%) e reações não hemolíticas febris (0,5 para 0,17%) (Capocelli e Dumont, 2014). Estes resultados têm facilitado o manejo de politransfundidos e também modificando indicações clínicas sobre uso ou não de transfusões profiláticas (Kaufman *et al.*, 2015).
- Redução das consequências adversas associadas a PSL, levando a produção de componentes mais padronizados com vida de prateleira estendida (Devine e Serrano, 2010; Leitner *et al.*, 2015).

A primeira geração de soluções aditivas plaquetárias (SAPI; Plasma Lyte A, Baxter) era uma solução salina simples, ainda com necessidade de quantidade significativa de plasma, e com a glicose atuando como substrato energético. Em estudos comparativos, esta solução consegue manter a viabilidade e metabolismo energético por até 3 a 5 dias. Uma segunda geração (SAPII ou SAP-B;T-Sol ou SSP Fenwal, Fresenius Kabi, Macopharma) incluiu o acetato como substrato metabólico obtendo bons resultados de viabilidade *in vitro* e *in vivo*. Mesmo o incremento plaquetário pós-transfusional sendo inferior ao CP tradicional houve uma redução significativa de

reações transfusionais, fazendo com que a Europa começasse a utilizar esta solução (Amorini *et al.*, 2007; Heaton, 2013).

Com o avanço das pesquisas, foram adicionadas as formulações fosfato para agir como tampão (SAPIII ou SAP-C; InterSol, Fenwal, Fresenis Kabi). Esta composição aumenta a taxa de glicólise e consegue manter os níveis de ATP, o que foi associado com boa viabilidade plaquetária (Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006). O desenvolvimento da solução com adição de fosfato foi considerado um marco no desenvolvimento de soluções aditivas plaquetárias. Posteriormente foi sugerida a adição de potássio e magnésio com o intuito de suprimir o metabolismo plaquetário (Gulliksson *et al.*, 2003; Diedrich *et al.*, 2008). Estudos com a SAPIII, também a associaram com a redução de patógenos, e por todos estes fatores foi a primeira SAP aprovada para uso nos Estados Unidos (Heaton, 2013). As soluções têm algumas variações de acordo com o fabricante e composição, sendo distinguidas por nomenclaturas técnicas e comerciais: InterSol (SAPIII ou SAP-CFenwal, Fresenis Kabi), Composol (SAP-D, Fresenius, Alemanha), SSP+ (SAPIIIM ou SAP-E, MacoPharma, França) (Tabela 1). Todas foram criadas baseando-se na formulação base da SAPIII, porém com adição de fosfato, gluconato ou glicose, a fim de aumentar sua capacidade de tampão, reduzir o estresse metabólico, diminuir a progressão das PSL, aumentar a vida de prateleira e melhorar o incremento pós-transfusional. Estas fazem parte da terceira geração de soluções plaquetárias criadas (Gulliksson *et al.*, 2003; Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006).

Grupos de pesquisa europeus têm feito estudos clínicos comprovando a eficácia destas soluções por até 10 dias de armazenamento. Estudos *in vitro* sugerem manutenção de viabilidade plaquetária de CP coletado por aférese e armazenado em 80%SAP/20% plasma por até 18 dias (Slichter *et al.*, 2014). Também, pode-se observar que a adição de magnésio e potássio, teve bons resultados *in vitro*, mas não houve melhora no incremento plaquetário nos testes *in vivo* (Van Der Meer, 2007; Greco *et al.*, 2010; Heaton, 2013).

Uma quarta geração de SAP foi desenvolvida e aprovada para uso *in vivo* nos Estados Unidos, chamada SAP-F (Isoplate, Terumo Medical Corporation) foi testada quanto a sua viabilidade usando 65% SAP/35% plasma por sete dias *in vitro* e cinco dias *in vivo* e mostrou melhores resultados pós-transfusionais e de viabilidade *in vitro*

que as anteriores. Esta solução caracteriza-se por não tem acetato e possuir menor quantidade de fosfato (Dumont *et al.*, 2013). A variável europeia desta solução, chamada de SAP-G (Intersol-G, FreseniusKabi; PASG, PallCorp.; M-sol ou BRS-A, experimentais) tem composição semelhante a SAPIIIM mas com adição de glicose (Gravemann *et al.*, 2015).

Tabela 1. Composição das soluções aditivas plaquetárias

Empresa	Baxter	Fenwal	Fenwal	Fresenius	Macopharma	B. Braum, Terumo	Pall
Nome técnico		SAP-B, SAPII	SAP-C, SAPIII	SAP-D	SAP-E, SAPIIIM	SAP-F	SAP-G
Nome comercial	Plasmalyte A	T-Sol, SSP	Intersol	Composol	SSP+	Isoplate	PAS-G
Componentes							
Fosfato	-	-	28,2	-	28,2	0,5	4
Acetato	27	30	32,5	27	32,5	27	15
Citrato	-	10	10,8	11	10,8	-	7,5
Cl⁻¹	98	116	77,3	98	77,2	98	121
Glicose	-	-	-	-	-	-	30
Gluconato	23	-	-	23	-	23	-
K⁺¹	5	-	-	5	5	5	5
Mg⁺²	1,5	-	-	1,5	1,5	1,5	3
Na⁺²	140	176	192	173	183,9	141	133
pH	7,4	-	7,2	7	7,2	7,4	5,4

*Todos os valores da Tabela estão expressos em mmol/L. Adaptado de Ringwald, Zimmermann e Eckstein (2006); Dumont et al (2013).

2.5.1. Componentes das soluções aditivas plaquetárias

Como descrito acima e demonstrado da Figura 2, a evolução das SAP é baseada em quatro elementos de referência: citrato, acetato, fosfato e glicose. Em relação ao citrato, sua aplicação está associada à coagulação. Todavia, ao se observar que concentrações de citrato entre 14 e 26 mmol/L estavam associadas ao aumento da produção de lactato, fez-se necessário adaptar as concentrações deste elemento. Então, a literatura recomenda o uso de aproximadamente 10 mmol/L nas soluções aditivas (Van Der Meer, 2007).

O fosfato tem dois efeitos contraditórios durante o estoque plaquetário: age com efeito tamponante e ao mesmo tempo, promove glicólise e produção de lactato (Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006). Ele é requerido na conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 3-fosfoglicerato, por isso acaba estimulando a glicólise. Testes *in vitro* comparando uso de SAP com (SAPIII) e sem fosfato (SAPII) mostram uma redução da glicólise e estabilização do pH em concentrações superiores a 10 mmol/L. Resultados significativos foram observados ao utilizar concentrações entre 26 e 40 mmol/L. Sendo o fosfato componentes dos nucleotídeos de adenina, sua presença na SAP também impacta nas concentrações de ATP e ADP. Por este motivo, o CPD (citrato-fosfato-dextrose) é preferido como anticoagulante para produção de hemocomponentes, e não se recomenda o uso de ACD (ácido cítrico-dextrose) (Gulliksson, 2003; Gulliksson, 2014). SAP-D (Composol) contém gluconato ao invés de fosfato com objetivo de manter a capacidade tamponante sem aumentar a produção de lactato.

Como alternativa, testou-se adicionar magnésio e potássio nos meios contendo fosfato (ex. PASIIM ou SAP-E); o objetivo era reduzir a glicólise e a ativação plaquetária com melhor manutenção do pH. O mecanismo envolvido não está muito claro, porém, o aumento da concentração de magnésio pode inibir a agregação por alterar a estabilidade da membrana ou por influenciar na formação de AMP cíclico (Zhang *et al.*, 2008). O potássio parece desempenhar um papel na manutenção do potencial de membrana, sendo que a redução da sua concentração citosólica pode estimular a liberação de citocromo c e promover a formação do apoptossomo, desencadeando o processo de apoptose. SAP com magnésio e potássio parecem ter menores porcentagens de expressão de CD62P e caspase, além de melhor manutenção do pH (Gulliksson *et al.*, 2003).

O acetato foi adicionado às SAP por ser um combustível oxidável, e sua presença pode reduzir o metabolismo anaeróbico e aumentar o consumo de oxigênio (Gulliksson, 2014). No TCA, o acetato é metabolizado a acetil-CoA, oxidado em CO₂ e H₂O, consumindo H⁺. O acetato também pode se ligar ao oxalacetato, formando citrato, que também será metabolizado no TCA. A presença de citrato inibe a fosfofructoquinase, enzima da via glicolítica, reduzindo a formação de lactato. A facilidade com que o acetato é metabolizado a acetil-CoA acaba inibindo a oxidação de outros combustíveis, como os ácidos graxos. Outro benefício da incorporação de acetato

é a remoção do íon H^+ , agindo de forma tamponante contra a redução de pH provocada pela glicólise (Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006; Tynngård, 2009).

Por fim, a adição de glicose também é um ponto muito questionado na produção das SAP. O metabolismo da glicose se dá por via anaeróbica ou através da sua oxidação completa no TCA. Estudos concluíram que aproximadamente 85% da energia gerada nos CP é obtida pelo metabolismo aeróbico, e somente 15% via glicólise, além disso, somente 1,4% da glicose é oxidada no TCA (Guppy *et al.*, 1995; Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006). Estas observações levaram os pesquisadores a tentar retirar a glicose dos meios de armazenamento, mas os resultados obtidos mostraram baixo incremento plaquetário *in vivo* e prejuízo das características metabólicas *in vitro* com redução dos níveis de ATP e lise plaquetária; concluindo que a glicose deve ser mantida nas SAP (Gulliksson, 2003; Amorini *et al.*, 2007; Gyongyossy-Issa, 2011). O objetivo da solução aditiva é reduzir o metabolismo plaquetário para que ele ocorra de forma lenta e contínua. Como observado na Tabela 1, o plasma residual é a única fonte de glicose das formulações de SAP. Com exceção da SAP-G, representante da quarta geração, na qual se adicionou glicose na formulação (Gravemann *et al.*, 2015).

Devido ao processo tecnológico envolvido, as SAP de terceira e quarta geração são soluções mais caras, mas com uso promissor nos bancos de sangue humano. Nos Estados Unidos está liberado o uso de duas soluções aditivas para armazenamento de CP por sete dias, na proporção de 65% SAP/35% plasma residual: SAP-C (SAPIII ou Intersol, Fresenius Kabi) e SAP-F (Isoplate, B. Braum, Terumo Medical Corporation). Na Europa e Austrália estão liberadas: SAP-B (SAPII ou T-Sol, Fenwal, Fresenius Kabi), SAP-C, SAP-D (Composol, Fresenius Kabi) e SAP-E (SSP+, Macopharma) (Heaton, 2013). No Brasil, ainda não existem estudos experimentais que norteiem o uso destas soluções nos bancos de sangue humanos. A SAPI (SAP-A ou Plasmalyte A) está comercialmente disponível no país, mas tem sido utilizada apenas para reposição eletrolítica, que é sua indicação de bula.

2.5.2. Requerimento de plasma com uso das soluções aditivas plaquetárias

As diretrizes para uso de SAP para estoque de CP requerem a incorporação de aproximadamente 30% de plasma autólogo no meio. Esta orientação está baseada em

resultados de vários estudos que observaram que há necessidade de plasma residual para manutenção da qualidade plaquetária *in vitro* (Van Der Meer, P. F., Pietersz, R. N. e Reesink, H. W., 2004; Van Der Meer et al., 2012), mas, a quantidade de plasma dependerá da solução aditiva utilizada. Plasma residual de 30% irá prover aproximadamente 7,5 mmol/L de glicose, com um consumo médio de 1,0 mmol/L/dia (dados em CP humanos), o que deve ser glicose suficiente para manter o metabolismo por 5 a 7 dias (Murphy, 2004).

A presença de bicarbonato no plasma tem um efeito tamponante, com a conversão do íon H^+ produzido pela glicólise em CO_2 e H_2O . Os ácidos graxos presentes no plasma também podem ser um combustível adicional para o metabolismo oxidativo (Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006).

Estudos utilizando plasma residual inferior a 2% reportaram perda das características morfológicas das plaquetas, o que poder ser atribuído não a questões metabólicas, mas a fatores plasmáticos correlacionados com a manutenção da integridade de membrana (Gulliksson, 2003). Existem vários estudos comparando diferentes porcentagens de plasma residual com diferentes soluções aditivas, entretanto o valor mínimo de 30% de plasma residual ainda parece ser o mais recomendável para manutenção da qualidade dos CP (Van Der Meer, P. F., Pietersz, R. N. I. e Reesink, H. W., 2004; Vassallo *et al.*, 2010; Capocelli e Dumont, 2014).

Ao avaliar os dados experimentais deve-se considerar que fatores como: método de coleta, composição da SAP, percentual de SAP/plasma residual utilizado, método de processamento do CP, esterilização e material da bolsa de armazenamento são variáveis que podem influenciar nos resultados de viabilidade do CP; dificultando a comparação dos dados experimentais (Tabela 2) (Van Der Meer, 2007; Greco *et al.*, 2010; Alhumaidan e Sweeney, 2012; Slichter *et al.*, 2014). Não há estudos relatando o uso das SAP em cães, de forma que os bancos de sangue veterinários ainda estocam os CP em 100% plasma, o que diminui a vida de prateleira do produto, aumenta a chance de reações transfusionais e, além disso, minimiza o uso do plasma para o fracionamento e produção de outros hemocomponentes.

Tabela 2. Comparação entre os resultados de estudos relatando parâmetros *in vitro* de concentrado de plaquetas (CP) em plasma, utilizando porcentagens variadas de plasma residual para as soluções aditivas plaquetárias em diferentes métodos de obtenção do CP, material das bolsas plásticas e tempos de estoque.

Soluções aditivas plaquetárias	Plasma		PASIII	SSP+				Composol			
Plasma residual (%)	100%	100%	50%	15%	20%	30%	35%	35%	30%	35%	30%
Método de obtenção do CP	PRP	BC	PRP	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC
N amostral	64	62	5	12	12	14	35	23	5	10	10
Material bolsa CP	DEHP-PVC	DEHP-PVC	Poliiolefina	Poliiolefina		Variado		Variado	BTHC-PVC	Poliiolefina	DEHP-PVC
Leucorredução	Sim	Sim	Não	Sim		Sim		Sim	Sim	Sim	Sim
Tempo de estoque (in vitro)	5	5	7	7	7	7	8	8	12	9	5
pH (dia 5)	6,7±0,26	6,7±0,26	7,31 ± 0,13	> 7,0	> 7,0	> 7,0	> 6,6	> 6,6	6,85 ± 0,09	6,93 ± 0,12	> 7,0
Swirling (dia 5)	>2	>2	Adequado	Adequado					3.0 ± 0	2,0 ± 0,7	3.0 ± 0
Referência	Singh et al, 2009		Sweeney et al., 2006	Gravemann, 2015	van der Meer et al, 2010		van der Meer et al, 2004	van der Meer et al, 2004	Van der meer, 2001	Tynngård et al, 2012	

PRP: plasma rico em plaquetas; BC: *buffy coat*; NI: não informado.

2.6. LESÃO PLAQUETÁRIA DE ESTOQUE

O armazenamento de longo prazo de CP é essencial para garantir um fornecimento estável de plaquetas para transfusão e reduzir o desperdício devido a CP expirados. No entanto, durante o armazenamento, as plaquetas estão sujeitas a numerosas modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais que incluem a diminuição do pH devido ao acúmulo de lactato; mudança na forma de discoide a esférica; liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários, o que leva à exposição dos receptores na superfície das plaquetas e decréscimo significativo da capacidade de agregação; perda de potencial mitocondrial ocasionado pelo estresse metabólico, acúmulo de radicais livres e ativação das vias de apoptose. Essas mudanças progressivas observadas durante o armazenamento são coletivamente denominadas de lesões de armazenamento de plaquetas ou PSL.

A ativação plaquetária resulta em transformação da sua forma discoide habitual para um formato esférico e com espículas. Sugere-se monitorar as mudanças morfológicas através do *swirling* dos CP estocados. Ao agitar gentilmente uma bolsa de CP em direção à luz, a população de plaquetas discóides irá se dissipar em várias direções devido às várias orientações das plaquetas em relação à luz incidente. Este efeito parece um turbilhonamento ou uma “nuvem turbulenta”. Quando as plaquetas estiverem esféricas, este efeito não irá ocorrer (Abrams-Ogg e Schneider, 2010). Esta técnica é simples e não onerosa, mas estudos relacionados com avaliação *in vivo* da eficiência hemostática das plaquetas transfundidas não encontraram uma boa correlação entre este teste e a viabilidade plaquetária. Acredita-se que as plaquetas ao serem ativadas *in vitro* têm a mudança para o formato não discoide, entretanto conseguem circular ou “turbilhonar” normalmente. Portanto, recomenda-se que este parâmetro não seja usado de forma isolada, e sim associado a outros testes como pH e contagem plaquetária (Evaluation of stored platelets, 2004; Kaufman, 2006).

A avaliação do volume plaquetário médio (*mean platelet volume* – MPV) também parece ser uma forma de avaliar a morfologia. Durante o estoque pode-se observar um aumento do MPV relacionado ao *swelling* da população e uma transformação da forma discoide para esférica. Entretanto, deve-se correlacionar com os dados de distribuição média do tamanho plaquetário (*platelet distribution width* – PDW) e observar presença de dupla população plaquetária nos gráficos (Singh, Chaudhary e

Ray, 2003b). Com o tempo de armazenamento há lise e formação de micropartículas, levando a um decréscimo do MPV e aumento do PDW. A contagem plaquetária também deve reduzir em decorrência da lise das plaquetas frágeis e senescentes (Mobarrez *et al.*, 2010; Helmond, Catalfamo e Brooks, 2013).

A ativação plaquetária está correlacionada com PSL e com a eliminação precoce de plaquetas da circulação após a transfusão. O momento da ativação plaquetária é marcado pela liberação dos grânulos secretórios, formação de micropartículas e mudanças conformacionais e mudança nas glicoproteínas de membrana. O principal marcador de liberação de grânulos alfa é a exposição na superfície plaquetária de p-selectina. O marcador CD62P se liga a PSGL-1, então o aumento da expressão deste marcador é um indicativo de ativação plaquetária (Leytin *et al.*, 2004). Este marcador já foi testado em humanos, caninos e equinos, com resultados satisfatórios em relação à identificação de plaquetas ativadas *in vitro* (Yeo *et al.*, 1993; Moritz, Walcheck e Weiss, 2003; Curvers *et al.*, 2008; Umeki *et al.*, 2011). Infelizmente, muitos estudos observam resultados inconsistentes ao correlacionar o aumento da expressão de CD62P com o incremento pós-transfusional (Dijkstra-Tiekstra, Pietersz e Huijgens, 2004; Tong *et al.*, 2015).

As mudanças morfológicas e funcionais interagem com as alterações metabólicas que ocorrem durante o estoque. Como discutido anteriormente, a plaqueta possui efeito Warburg e Pasteur, mantendo sua energia através do metabolismo aeróbico e anaeróbico. A mensuração do pH extracelular é a técnica mais utilizada nos bancos de sangue humanos e veterinários. Níveis de pH abaixo de 6,2 estão associados com baixa viabilidade *in vitro*. Os CP armazenados em 100% plasma apresentam o decréscimo do pH ao longo do tempo de estoque. As taxas de produção de lactato e consumo de glicose são adotadas para avaliar a PSL e viabilidade *in vitro* (Guppy *et al.*, 1995; Amorini *et al.*, 2007). Existem poucos estudos que avaliaram estes parâmetros em CP caninos, mas aqueles que o fizeram observaram comportamento metabólico e valores semelhantes aos relatados em humanos (Sink, 2002; Costa, 2011). Métodos não invasivos para controle do pH tem sido desenvolvidos a fim de que a viabilidade metabólica possa ser inferida no maior número de unidades plaquetárias estocadas (Doescher e Muller, 2013).

O metabolismo aeróbico pode ser monitorado através da mensuração da pressão parcial de oxigênio (pO_2) e dióxido de carbono (pCO_2). Estudos relatam aumento da pO_2 a decréscimo da pCO_2 associado ao declínio do metabolismo oxidativo. Prowse, De Korte e van der Meer (2014) alertam que ao avaliar estes dados deve-se considerar o material plástico e oxigenabilidade da bolsa de sangue utilizada para o armazenamento.

Outra alteração metabólica associada a PSL é a diminuição dos níveis de ATP. Dados de CP humanos mostram uma queda de até 70% até o final do período de estoque (considerando sete dias de estoque), e correlacionam a uma queda de 50% na recuperação *in vivo* de CP reinfundidos (Singh, Chaudhary e Ray, 2003a). Estudos anteriores associam o início da queda do ATP com a perda de 50% dos níveis iniciais de glicose (Kaufman, 2006).

Determinar a capacidade das plaquetas estocadas em CP funcionarem normalmente depois da transfusão é um dos principais objetivos de muitos testes empregados nos estudos de lesão de estoque plaquetário. Neste sentido, uma abordagem lógica é procurar determinar a capacidade de agregação *in vitro* em resposta a agonistas fisiológicos. Os agregômetros medem a transmissão de luz através da amostra, a agregação resulta em um aumento da transmissão de luz, pois haverá a condensação das plaquetas em uma grande partícula (agregado plaquetário) onde a luz incidente é totalmente absorvida. Estudos mostram que plaquetas humanas estocadas por cinco dias têm pouca capacidade de agregação *in vitro* em resposta aos agonistas ADP, epinefrina e colágeno. Os resultados de Hoareau *et al* (2014), que avaliaram CPs caninos, corroboram com os descritos em humanos onde não existe diferença significativa na agregação ao longo do tempo de estoque. Em caninos, testes de agregometria são utilizados para estudos clínicos, e os agonistas citados anteriormente parecem ser os mais adequados para avaliar a capacidade de agregação nesta espécie (Allyson, Abrams-Ogg e Johnstone, 1997; Klein, Adamik e Mischke, 1999; Ciaramella *et al.*, 2005; Christopherson, Spangler e Boudreaux, 2012). Outro estudo em plaquetas caninas criopreservadas optou-se por utilizar trombina como agregante, e as amostras demonstraram habilidade mínima de agregação *in vitro* (Appleman *et al.*, 2009). No entanto os resultados negativos não se refletem *in vivo*; dados comparativos mostram que há capacidade de agregação *in vivo* mesmo quando os resultados da agregometria *in vitro* parecem insatisfatórios (Miyaji *et al.*, 2004; Cardigan, Turner e Harrison, 2005; Jackson, 2007).

A mitocôndria é uma organela importante envolvida na produção de ATP e regulação de funções celulares, incluindo a apoptose. Muitos estudos indicam que o estresse oxidativo induz a disfunção mitocondrial e liberação de radicais livres, como o superóxido e que estas espécies reativas de oxigênio causam apoptose celular. Por isso, considera-se que a disfunção mitocondrial é um mecanismo importante relacionado com a PSL (Dekkers *et al.*, 2007; Devine e Serrano, 2010; Eder e Moroff, 2010; Hayashi *et al.*, 2011).

A perda de capacidade mitocondrial levará a interrupção do metabolismo oxidativo que pode ser associado a todas as mudanças morfológicas e funcionais citadas acima. A perda do $\Delta\Psi_m$ é relacionada como um evento precoce durante a apoptose, levando ao colapso e a morte celular irreversível. Muitos estudos tem se direcionado a determinar os melhores parâmetros para identificar os mecanismos de morte celular relacionados à lesão de estoque plaquetário (Li *et al.*, 2000; Perrotta, Perrotta e Snyder, 2003). A expressão da PS na superfície plaquetária no período de estoque (mensurado pela ligação com Anexina V) é considerada um marcador de ativação e atividade procoagulante, e também indicador de apoptose, pois este fosfolípido de membrana age como um sinalizador para remoção fagocítica da célula (Dasgupta *et al.*, 2010).

A identificação da PSL na membrana interna mitocondrial pode ser realizado através de corantes catiônicos (*J-aggregate forming cation* - JC-1) que avaliam o $\Delta\Psi_m$. Além do JC-1, outro teste também pode ser utilizado para avaliar a mitocôndria, o Mitotracker Green (MTG) e Red (MTR). O MTG é um corante fluorocromo utilizado para identificar a massa ou volume mitocondrial, as mitocôndrias são marcadas e assim permanecem independentemente do potencial de membrana, mesmo que não totalmente funcionais (presença de *swelling* mitocondrial). Em contraste, o MTR marca as mitocôndrias com potencial de membrana, semelhante ao JC-1. Desta forma há como fazer uma correlação do estresse mitocondrial. O MTG indica que existem mitocôndrias, em contrapartida o MTR mostra que estas não possuem mais $\Delta\Psi_m$ (Puleston, 2015). Muitos estudos utilizam este teste para avaliação de apoptose e $\Delta\Psi_m$, no entanto não existem estudos utilizando o Mitotracker para avaliação de plaquetas caninas ou, CP humano ou, PSL (Xiong *et al.*, 2008; Tal *et al.*, 2009). Shrivastava *et al* (2011), em um estudo de caso controle descreveram a avaliação da apoptose na mitocôndria da plaqueta em pacientes com esclerose amiotrófica lateral. É um estudo clínico que demonstrou o envolvimento da disfunção mitocondrial da plaqueta nesta

desordem neurológica, como resultados há aumento da exposição de PS, diminuição do $\Delta\Psi_m$ identificado pelo JC-1 e a diminuição do acúmulo do MTR na matriz mitocondrial indicando apoptose nas plaquetas dos pacientes com esta desordem.

Ohto e Nollet (2011) descreveram que a lesão de estoque plaquetário envolve uma série de alterações bioquímicas ligadas a necrose, dano mitocondrial, *swelling* das membranas da organela, falência metabólica, lise da membrana e liberação de lactato desidrogenase (LDH). Com o aumento do interesse sobre o envolvimento da apoptose na lesão de estoque plaquetário, outros métodos como a atividade de caspase ou identificação de liberação de citocromo c no espaço intermembrana também já foram realizados (Gyulkhandanyan *et al.*, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Cães clinicamente saudáveis, machos e fêmeas, provenientes de proprietários particulares da região da Grande Porto Alegre, foram avaliados e selecionados conforme critérios estabelecidos por pesquisadores da área (Bücheler e Cotter, 1992) e descritos neste projeto de pesquisa. O uso dos animais teve permissão do proprietário, que foi devidamente alertado sobre todos os riscos do procedimento, de acordo com conceitos de bioética aplicados à pesquisa animal (Ellery, 1985) (Protocolo de aprovação CEUA/UFRGS nº20528). Os proprietários dos animais responderam a um questionário (cujas respostas foram analisadas pelo médico veterinário responsável pelo projeto) e assinaram um termo de consentimento antes de cada etapa do experimento (Anexos 1, 2 e 3).

Os animais tinham entre um e oito anos de idade, pesavam mais de 28 kg e tinham comportamento dócil (animais acostumados à manipulação para evitar o estresse) (Abrams-Ogg e Schneider, 2010). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos estavam dentro dos valores de referência para a espécie canina, com hematócrito acima de 40% (Gibson e Abrams-Ogg, 2012). Além disso, os animais participantes estavam em dia com as vacinas para as principais doenças infecciosas para cães (Cinomose, Adenovírus Tipo 2, Coronavírus, Parainfluenza, Parvovirose e Leptospirose Canina) e eram negativos no teste sorológico para antígeno da *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia canis* (Teste Snap 4DX canino, Idexx Laboratories, Maine, US) e *Leishmania spp.* (TecsLab, Minas Gerias, BR) (Reine, 2004; Wardrop *et al.*, 2005; Tocci e Ewing, 2009; Crawford *et al.*, 2013).

3.2. AVALIAÇÕES CLÍNICA E LABORATORIAL DOS ANIMAIS

Antes de cada doação, o histórico do doador foi averiguado (vacinação, controle de endo e ectoparasitas regularizados e atualizados). O animal foi submetido a exame físico (ausculta pulmonar e cardíaca, temperatura retal e palpação) e a testes de controle laboratoriais (exames hematológicos e bioquímicos). Foram coletados de cada animal, após antissepsia adequada, amostras de sangue por punção da veia cefálica utilizando sistema a vácuo com tubos de 3 mL contendo ácido etileno diamino tetracético

dipotássico (EDTA K₂) para as análises hematológicas e tubos de 4 mL sem anticoagulante para as análises bioquímicas e sorológicas (BD Vacutainer Brasil, São Paulo, BR). Todos os resultados dos exames pré-seleção e de monitoração foram repassados ao tutor/criador.

As amostras de sangue para as análises hematológicas foram mantidas sob refrigeração no máximo até 4 horas após a coleta. A contagem total de eritrócitos, plaquetas e leucócitos, e a dosagem de hemoglobina foram realizadas através de aparelho automático (pocH-100iV Diff, Roche Diagnóstica Brasil, São Paulo, BR). O hematócrito foi determinado pelo método de microhematócrito a 10.000 rpm (9.520 g) por cinco minutos (microcentrífuga SPIN-1000-110, Microspin, São Paulo, BR). A contagem diferencial e análise do esfregaço sanguíneo corado foram realizadas através de microscopia ótica (corante Wright-Giemsa, Sigma-Aldrich Co., US).

As amostras de sangue para as análises bioquímicas foram centrifugadas, após a retração do coágulo, o soro separado e congelado (máximo de 1 semana) até a realização dos testes bioquímicos. Foram realizadas determinações séricas de creatinina e ureia, e das atividades das enzima alanina aminotransferase (ALT) através de química seca (Vitros 250 Chemistry System, Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, BR.).

3.3. COLETA DAS BOLSAS DE SANGUE DOS ANIMAIS

SELECIONADOS

Os cuidados descritos a seguir foram tomados durante o experimento: antisepsia adequada antes do procedimento, pressão no local da punção venosa após a doação durante dois a cinco minutos para acelerar o processo de coagulação e observação do animal após a doação por 15 a 30 minutos. O animal recebeu ração após a doação e foi recomendado ao tutor evitar exercícios físicos intensos com o animal por alguns dias. A coleta do sangue foi por punção da veia jugular, através do método gravitacional, com homogeneização automática suave do sangue durante o procedimento com controle do fluxo e volume da doação (homogeneizador de bolsas, Biomixer 323, Ljungberg & Kögel AB, Skane, CH). Os animais realizaram doação sem sedação ou anestesia, o volume de sangue a ser doado foi de 450 mL, ou seja, de 15% a 20% do volume sanguíneo total (volume sanguíneo total estimado em litros = 0,085 x

peso em kg). Em geral, a doação durou de 5 a 15 minutos (Abrams-Ogg e Schneider, 2010; Gibson e Abrams-Ogg, 2012).

3.4. FASE PRÉ-EXPERIMENTAL

3.4.1. Seleção do material da bolsa de armazenamento de concentrado de plaquetas

Por razões já discutidas anteriormente, o DEHP, que é o material mais utilizado para produção das bolsas de sangue foi quase totalmente substituído por outros produtos. Alguns deles são o TOTM, BTHC ou poliolefinas. No Brasil, somente o TOTM e DEHP são recomendados pela Anvisa (Anvisa, 2014b). Estes permitem uma melhor troca gasosa, estendendo o armazenamento por até 7 dias (Simmchen, Ventura e Segura, 2012). Estudos comparando o DEHP com o TOTM, demonstram melhores resultados com uso de TOTM relacionados com manutenção do pH, recuperação *in vivo* em plaquetas retransfundidas, manutenção dos níveis de pO₂, e meia vida plaquetária *in vitro*; permitindo CP viáveis por até 7 dias de armazenamento (Sink, 2002; Prowse, De Korte, Hess, Van Der Meer, *et al.*, 2014). Sendo o TOTM comercialmente disponível no Brasil, optou-se pelo uso de bolsas de sangue produzidas com este material para os testes *in vitro* deste projeto.

3.4.2. Escolha das soluções aditivas plaquetárias

Para análise *in vitro* do metabolismo plaquetário foram escolhidas as soluções de terceira geração Composol (Fresenius Kabi) e SSP+ (Macopharma), ambas comercialmente disponíveis e utilizadas para transfusões de CP na Europa e Austrália (Tabela 3). Muitos estudos clínicos foram realizados demonstrando a eficácia relacionada à redução de reações transfusionais, manutenção da viabilidade plaquetária por até doze dias, e incremento plaquetário pós-transfusional adequado por até sete dias (Dumont *et al.*, 2002; Dumont e Vandebroek, 2003; Van Der Meer, P. F., Pietersz, R. N. I. e Reesink, H. W., 2004; Vassallo *et al.*, 2010).

Seguindo recomendações do fabricante, optou-se pela proporção de 65% SAP/35% plasma residual. Este é o valor mínimo recomendado a ser adicionado de SAP para

cada unidade de CP. Também, observa-se que dados publicados a partir dos testes iniciais de viabilidade de SAP utilizam 35% de plasma residual, ainda, esta é a proporção recomendada para uso *in vivo* nos Estados Unidos e Europa (Dumont *et al.*, 2013; Capocelli e Dumont, 2014). Estudos demonstraram bons resultados *in vitro* com 10 e 5% de plasma residual (Saunders *et al.*, 2011; Van Der Meer *et al.*, 2012; Gravemann *et al.*, 2015). Entretanto, estes estudos são realizados em CP obtidos pelo método de BC e com uso de sistema automatizado de extração de plasma com bolsas *top and botton*. Mimetizando a realidade dos bancos de sangue veterinários brasileiros, neste projeto foram utilizados CP pelo método PRP e extração manual de plasma.

Tabela 3. Composição das soluções utilizadas no experimento.

Empresa		Fresenius	Macopharma
Nome técnico	CPD/Plasma	SAP-D	SAP-E, SAPIIM
Nome comercial		Composol	SSP+
Componentes			
Ácido Cítrico (anidro)	15,53	-	-
Citrato de Sódio (diidratado)	89,59	-	-
Fosfato de sódio monobásico	18,52	-	28,2
Dextrose	141,82	-	-
Acetato	-	27	32,5
Citrato	-	11	10,8
Cl⁻¹	-	98	77,2
Gluconato	-	23	-
K⁺¹	-	5	5
Mg⁺²	-	1,5	1,5
Na⁺²	-	173	183,9
Ph	-	7	7,2

*Todos os valores da Tabela estão expressos em mmol/L.

3.4.3. Seleção e padronização dos testes de avaliação laboratorial do concentrado de plaquetas

Em relação à escolha dos dias para realização dos testes laboratoriais levou-se em consideração os seguintes critérios:

- Avaliação após as primeiras 24 horas de estoque para que se tenham valores base das amostras seguindo padrão utilizado na literatura para

testes *in vitro* de CP humanos e caninos. Também, este foi o momento em que as amostras que estavam fora dos padrões recomendados pela Anvisa foram excluídas do experimento (Anvisa, 2004).

- Avaliação no dia cinco, por ser o último dia atualmente recomendado para estoque de CP tradicionais, 100% plasma (CPD plasma, no caso deste projeto representando o grupo controle) nos bancos de sangue brasileiros (Anvisa, 2014a). Este mesmo padrão é empregado para bancos de sangue veterinários, e dados experimentais mostram que há comprometimento da viabilidade plaquetária neste período (Abrams-Ogg, 2010; Costa, 2011; Gibson e Abrams-Ogg, 2012).
- Avaliação no dia nove, pois dados experimentais em CP caninos tradicionais (100% plasma) demonstraram viabilidade plaquetária *in vitro* por até nove dias (Sink, 2002).
- van der Meer, Pietersz e Reesink (2004) relataram viabilidade *in vitro* de CP armazenados em 35% de plasma residual, utilizando as SAP Composol, SSP+ e Intersol por até doze dias após coleta. Baseando-se nestes resultados e para manter um intervalo regular entre avaliações optou-se por realizar as avaliações *in vitro* nos dias experimentais 1, 5, 9 e 13.

Para escolha dos testes de avaliação *in vitro* levou-se em consideração, além dos artigos publicados sobre o tema, o consenso publicado em 2004 (Evaluation of stored platelets, 2004):

- Como avaliação morfológica sugere-se: efeito *swirling*, MPV e PDW.
- Para identificação e quantificação da população plaquetária a literatura cita o uso do anticorpo monoclonal CD61 para caninos (Wilkerson e Shuman, 2001; Majoy *et al.*, 2015).
- Para avaliação da ativação sugere-se realização de testes que identifiquem a liberação de grânulos secretores como a p-selectina (Wills, Wardrop e Meyers, 2006). O método utilizado para este fim é a identificação de expressão de superfície através do marcador CD62P.
- Existem poucos testes efetivos para avaliação de função plaquetária. Daqueles relatados na literatura, o mais viável para aplicação em caninos

é a agregometria, utilizando ADP, ácido araquidônico e colágeno como agregantes (Appleman *et al.*, 2009; Christopherson, Spangler e Boudreaux, 2012).

- Em relação ao metabolismo, preconiza-se pela avaliação de pH, glicose, lactato, ATP, pO₂ e pCO₂ (Devine e Serrano, 2010; Hoareau *et al.*, 2014).
- Muitos estudos indicam a perda do potencial de membrana mitocondrial associado ao dano oxidativo, senescência e apoptose plaquetária. Estudos sugerem avaliar marcadores da via extrínseca da apoptose (exposição de PS e Caspase-3 ou 7) e avaliação de via apoptótica intrínseca (JC-1 ou Mitotracker) (Cookson *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011). Também pode haver uma correlação positiva entre os parâmetros anteriores e a mensuração de LDH intra ou extraplaquetário. Quando há morte celular e lise das membranas haverá liberação de LDH (Evaluation of stored platelets, 2004; Ohto e Nollet, 2011).

As marcações com CD61, CD62P, Anexina V, JC-1 e Mitotracker foram previamente padronizadas para CP canino (Lasta, 2016, dados não publicados).

3.5. ETAPAS DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado em três momentos, totalizando 40 bolsas de sangue, e o sangue de cada um foi armazenado em plasma ou em uma das solução teste. Em cada momento, foram avaliados, nos dias 1, 5, 9 e 13 após coleta, os parâmetros bioquímicos no CP. Os momentos foram os seguintes: Tratamento 1: 100% plasma (controle) n=13; Tratamento 2: SSP+ (SAPIIIM, SAP-E, Macopharma) n=13; Tratamento 3: Composol (SAP-D, Fresenius Kabi) n=14.

3.5.1. Processamento do concentrado de plaquetas canino

Para avaliar as SAP, foi utilizado um sistema de bolsas triplo fechado (CPD/SAGM, bolsas Standard, JP Indústria Farmacêutica, São Paulo, BR), o qual consiste em uma bolsa primária A contendo a solução CPD (anticoagulante), uma bolsa

satélite B contendo a solução aditiva para o concentrado de eritrócitos e uma bolsa vazia para o plasma e concentrado de plaquetas produzida com o material TOTM-PVC. As bolsas permaneceram em repouso por uma hora antes do processamento.

A centrifugação foi previamente padronizada e adaptada para a obtenção de CP a partir do método do PRP, o qual é composto por duas centrifugações até 4 horas após a doação (Lasta, 2016, dados não publicados). A primeira centrifugação foi leve, de 1.600 g por 6 minutos a 22°C (centrífuga Sorvall Legend RT+, Thermo Scientific, Maine, US). O PRP foi transferido para a bolsa TOTM vazia através de um extrator (extrator de plasma manual, ACS201, Terumo Medical do Brasil, São Paulo, BR), em seguida foi adicionada a solução aditiva (SAGM) para concentrado de eritrócitos. O concentrado de eritrócitos ficou armazenado em posição horizontal sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por 35 dias. A bolsa com PRP foi submetida a uma segunda centrifugação pesada (3.300 g por 8 minutos a 22°C) realizada a fim de retirar o excesso de plasma. Nas bolsas do tratamento 1 (100% plasma) foi mantido um volume médio de $65,92 \pm 1,977$ mL.

Nos tratamentos 2 e 3 foram adicionadas as SAP na proporção de 65% SAP para 35% de plasma residual. Para padronização das amostras dos três tratamentos, procurou-se manter um volume médio de CP semelhante. Portanto, tendo como volume alvo aproximadamente 65 mL. Para adicionar a SAP procedeu-se da seguinte forma:

- Extraíu-se, pelo método de extração manual, o plasma das bolsas até que restasse um residual de 22 ± 2 mL para atingir a proporção 65%SAP/35% plasma;
- A bolsa de CP com plasma residual de 35%, ou seja 22 ± 2 mL, foi pesada com intuito de obter o valor final exato de plasma residual;
- A partir deste volume, calculou-se o volume a ser adicionado de SAP. Para atingir os 65% de SAP, foram adicionados em média 42 ± 2 mL destas;
- Colocou-se um dispositivo de amostragem (*Sampling Site Coupler*, Fenwal, Fresenius Kabi, Illinois, US) em todas as bolsas, tanto nos CP quando nas bolsas que continham a SAP;
- Retirou-se com auxílio de seringa e agulha estéreis o volume de SAP a ser adicionado em cada CP (em média 42 ± 2 mL);

- O volume de SAP foi adicionado nos CP com auxílio de dispositivo de amostragem, seringa e agulha estéreis. O volume final médio das bolsas de SSP+ foi $65 \pm 3,29$ mL e de Composol $65,74 \pm 2,87$ mL (Figura 5).
- O CP foi identificado de acordo com a SAP que recebeu e foi deixado em repouso por uma hora.

Optou-se por realizar os tratamentos 2 e 3 de forma aleatória, para que a experiência adquirida ao longo do processo de processamento não interferisse no resultado final da qualidade dos CP. Foram consideradas viáveis aquelas bolsas que possuíam parâmetros mínimos requeridos pela ANVISA e AABB no dia 1, além de estarem de acordo com os dados de padronização de CP caninos (Lasta, 2016, dados não publicados).

3.5.2. Armazenamento do concentrado de plaquetas canino

As bolsas de CP foram mantidas em repouso durante 1 hora após o processamento e então colocadas em um agitador de plaquetas linear localizado dentro de uma câmara de conservação com temperatura regulada entre 22 a 24°C por 13 dias (Figura 6) (câmara ambientadora de plaquetas CDCI 03, Indrel, São Paulo, Brasil; e agitador de plaquetas linear AP48L, Presvac, San Martín, AR).

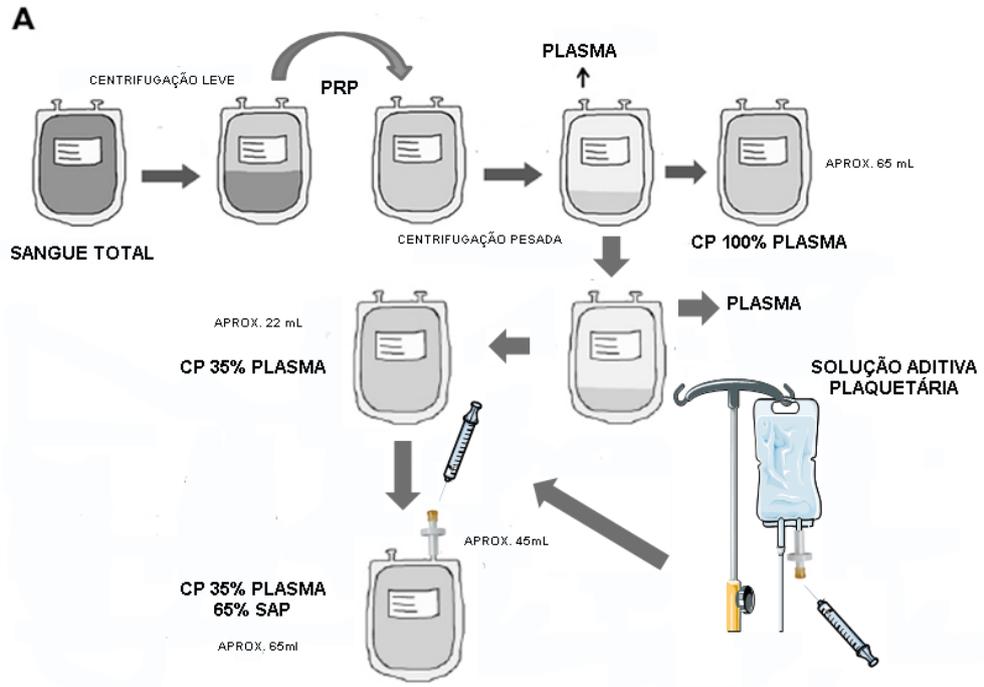


Figura 5. Adição das soluções aditivas plaquetárias na proporção de 65% solução aditiva (SSP+ ou Composol), deixando 35% de plasma residual. Adaptado de Devine e Serrano (2010).



Figura 6. Armazenamento dos concentrados de plaqueta caninos utilizados no experimento, em agitação horizontal constante, por 13 dias, 22 a 24°C.

3.5.3. Avaliação laboratorial do concentrado de plaquetas canino

O CP armazenado em cada um dos tratamentos foi submetido a testes laboratoriais em intervalos estabelecidos (dias 1, 5, 9 e 13). Para assegurar que o sistema continuasse fechado e sem contaminação externa, a amostragem para as determinações foi realizada através de um dispositivo de amostragem (*Sampling Site Coupler*, Fenwal, Fresenius Kabi, Illinois, EUA) com auxílio de seringa e agulhas. As bolsas eram retiradas do agitador por no máximo 5 minutos até que fossem avaliadas e amostradas, foram retirados aproximadamente 7 mL em cada momento de amostragem (Figura 7).

Dia experimental 1

Esta etapa corresponde as primeiras 24 horas após o processamento. Nesta etapa foram realizadas: contagem plaquetária, MPV, PDW, *swirling*, contagem de leucócitos residuais, pH, glicose, lactato, LDH, bicarbonato, pO₂ e pCO₂, ATP, CD61, CD62P, Anexina V, JC-1, Mitotracker e agregometria.

Antes da amostragem das bolsas foi realizada avaliação do *swirling* plaquetário, com uma escala de zero a 3, sendo que zero indica ausência de *swirling* e 3 *swirling* ótimo (Gonçalves, 2006). Foram incluídas no projeto somente bolsas com *swirling* 2 e 3 no dia 1.

Foi realizada uma diluição 9:1 com solução de Türk (Newprov, Paraná, BR) e com auxílio de câmara de Nageotte (LO-Laboroptik GmbH, Höhe, DE) para obtenção do valor de leucócitos residuais quando o valor obtido pelo contador hematológico era igual a zero. A contagem de plaquetas, MPV e PDW foram realizados em contador hematológico automático (pocH-100iV Diff, Roche Diagnóstica Brasil, São Paulo, Brasil). Concomitantemente, os valores de glicose, bicarbonato, pO₂ e pCO₂ foram determinados com auxílio de analisador de gases portátil (CG8, iStat, Abbott Point of Care, Ontario, CA). Posteriormente, as taxas de consumo de glicose e produção de lactato foram calculadas de acordo com a determinação dos parâmetros e o número de células em cada CP.

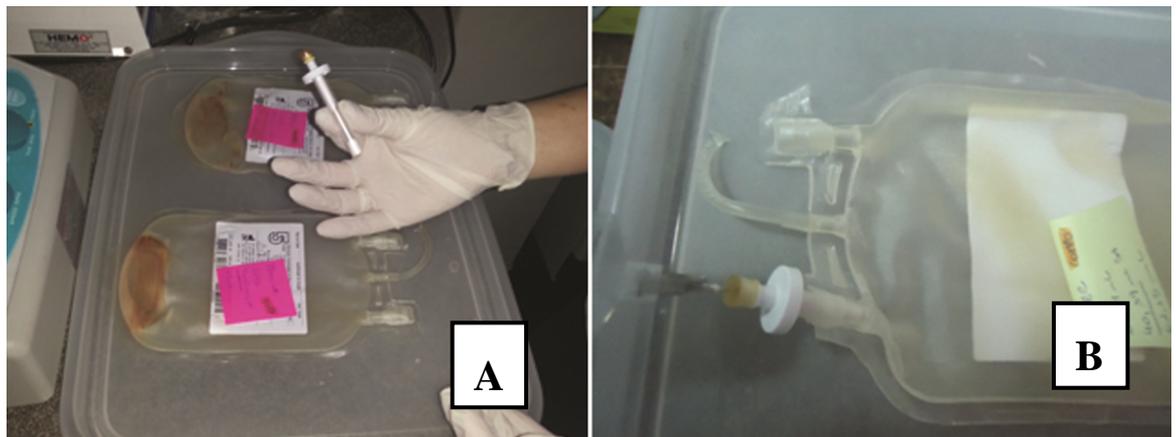


Figura 7. A. Inserção do dispositivo de amostragem no dia 1. **B.** Amostragem dos concentrados de plaquetas realizado nos dias 1, 5, 9 e 13.

Uma alíquota da amostra retirada foi preparada em solução de ácido tricloroacético, e congelada em freezer a -80°C para determinação de adenosina-5'-trifosfato através de ensaio de bioluminescência (ATP Lyte Luminescence detection 1010224, Perkin Elmer, Hague, NL), como descrito por Johson *et al* (2013). A análise foi realizada com auxílio de leitor de microplaca multi-modo (Spectramax M5, Molecular Devices Inc., US). Outra alíquota foi centrifugada para obtenção do sobrenadante, que foi armazenado -80°C para posterior determinação de lactato e lactato desidrogenase através de química seca (Vitros 250 Chemistry System, Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, São Paulo, BR).

O pH também foi mensurado através de pHmetro HI 9126 (Hanna Instruments Inc., Rhode Island, US) após calibração do equipamento 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 mergulhou-se o eletrodo HI 1414D e através deste foi determinado o pH.

Foram realizados os testes de marcação com anticorpos monoclonais (MoAbs) CD61 FITC (clone VI-PL2, BD Biosciences, California, US) para identificação da população de plaquetas; e CD62p (clone AC1.2, BD Biosciences, California, US) para avaliação da ativação plaquetária. A exposição da PS foi avaliada com Anexina V (ApoFlowEx[®] FITC Kit, Exbio, Praga, CZ) como marcador de apoptose; sondas

fluorescentes MitoTrackerTM Green FM (MTG) e MitoTrackerTM Red CMXRos (MTR) (Invitrogen, Califórnia, US) e MitoScreen JC-1 (BD Biosciences, California, US) para avaliação da viabilidade mitocondrial.

Todos os experimentos de citometria de fluxo foram realizados em citômetro FACSCaliburTM, e processadas conforme protocolos previamente padronizados para CP canino (Lasta, 2016, dados não publicados) onde foram adquiridos 30.000 eventos para cada análise utilizando o software CellQuestTM Pro (BD Biosciences, California, US). Posteriormente, todos os dados foram analisados quanto a porcentagem de marcação com auxílio do software comercial FCS Express 5 software (De Novo Software, Ontario, CA).

As amostras submetidas ao ensaio de agregação por transmissão de luz foram padronizadas em uma concentração de 250×10^3 plaquetas/ μL . De acordo com a contagem de plaquetas do CP, este foi diluído com PPP (plasma pobre em plaquetas) autólogo para atingir a concentração desejada. As leituras foram realizadas em agregômetro de plaquetas (Agreg-Myr4, Qualitem, São Paulo, BR) e software AgregMY4, utilizando-se os agonistas ADP (5 μM), colágeno (5 $\mu\text{g/mL}$) e ácido araquidônico (1 μM), gerando uma curva que foi monitorada por 10 minutos. Como controle negativo foi utilizado PPP autólogo.

Dia experimental 5, 9 e 13

Nestas etapas foram realizadas: contagem plaquetária, MPV, PDW, *swirling*, pH, glicose, lactato, LDH, bicarbonato, pO₂ e pCO₂, ATP, CD61, CD62P, Anexina V, JC-1, Mitotracker, usando as metodologias descritas anteriormente

Nos dias 5 e 13 todos CPs foram enviados para cultura microbiológica para aeróbios e anaeróbios no Laboratório de Microbiologia 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. Aquelas positivas foram descartadas do n amostral.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão. A comparação entre as SAP e o plasma foi realizada com ANOVA de duas vias. A análise de agregometria e contagem de leucócitos residuais foi realizada com ANOVA de uma via. Quando alguma diferença era encontrada, era realizada análise multicomparada post hoc com teste de Tukey ou teste de Duncan para avaliar o intervalo de confiança. As análises foram executadas com GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, California, US). Foram considerados resultados significativos aqueles com $p < 0,05$. Foi realizada correlação de Pearson entre as variáveis, considerando valores significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros de qualidade *in vitro* foram avaliados no dia 1 (Tabela 4). No primeiro dia de avaliação, o valor de pH variou significativamente ($p= 0,01$) entre as soluções testadas e o plasma. Em relação à diferença estatística do pH, a composição das soluções aditivas influencia diretamente na caracterização metabólica dos CPs avaliados (Tabela 3). O valor inicial de pH inferior ao do grupo controle reflete positivamente na manutenção do metabolismo ao longo do armazenamento.

Tabela 4. Contagem de leucócitos residuais e plaquetas, *swirling* e pH no dia experimental 1.

	Dia 1		
	Plasma	SSP+	Composol
Volume (ml)	65,92 ± 1,977	64,05 ± 2,66	63,48 ± 3,11
Leucócitos residuais ($\times 10^6$ /unid)	0,0037 ± 0,0021	0,010 ± 0,009	0,005 ± 0,002
Contagem de plaquetas ($\times 10^{10}$ /unid)	7,197 ± 2,86	7,88 ± 2,13	7,64 ± 2,44
Swirl	3 ± 0	3 ± 0	2,86 ± 0,53
pH (22°C)	7,162 ± 0,24 ^a	6,72 ± 0,20 ^b	6,44 ± 0,45 ^b

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Resultados reportados como média ± desvio padrão.

Todos os CPs apresentaram leucorredução (leucócitos residuais $< 2,0 \times 10^8$ /unid.), volume médio (40 a 70 mL), e concentração média de plaquetas nas unidades ($> 5,5 \times 10^{10}$ plaquetas/unidade) conforme as recomendações da Anvisa. Não houve diferença significativa entre os tratamentos no que se refere a leucócitos residuais ($p= 0,22$), volume das bolsas ($p= 0,22$) e contagem de plaquetas ($p= 0,977$).

Para selecionar os 40 indivíduos participantes, foram avaliados uma totalidade de 83 cães, dos quais 23 foram excluídos por não apresentarem-se aptos nos exames laboratoriais. Além disso, 10 bolsas não foram utilizadas por outras questões como: dificuldade de contenção do doador, volume da bolsa inferior a 450 mL, não permissão do tutor para realizar tricotomia. Realizou-se coleta e processamento de um total de 50 bolsas de sangue total. Destas, 40 foram utilizadas no experimento e 10 foram excluídas por não se apresentarem dentro dos requisitos mínimos preconizados pela Anvisa E AABB. Foram excluídas 6% (3/50) devido contaminação bacteriana, 4% (2/50) por não apresentarem *swirling* mínimo de 2+ no dia 1 de avaliação, 6% (3/50) por apresentarem

contagem abaixo de $5,5 \times 10^{10}$ por unidade, 2% (1/50) por lipemia e 2%(1/50) por apresentar hematócrito superior a 1% no dia 1.

A contaminação bacteriana das bolsas de CP de 2 doadores foi positiva nos dias 5 e 13, e de um outro doador, somente no dia 13. No isolamento identificou-se cultura pura de *Staphylococcus spp.* coagulase negativa. De acordo com Greco et al (2010) contaminação ocorre durante a coleta de sangue ou produção do hemocomponente. O *Staphylococcus* coagulase negativa normalmente é originário da pele do doador, é frequentemente isolado em CP e quando transfundido pode causar reações fatais associadas a endotoxemia. Em cães, os cuidados com antissepsia da pele devem ser redobrados. Muitos tutores não autorizam a tricotomia; nestes casos os autores sugerem que as bolsas de sangue destes doadores não sejam utilizadas para produção de CP, ou que o doador seja excluído do cadastro. A fim de permitir a análise das amostras nos dias propostos, utilizou-se um dispositivo de amostragem (*Sampling Site Coupler*, Fenwal, Fresenius Kabi, Illinois, US), entretanto, este procedimento viola as regras do banco de sangue, onde nenhum sistema fechado pode ser aberto. Não foi possível determinar se a contaminação ocorreu devido contaminação no momento da coleta ou durante o procedimento de amostragem das bolsas.

Durante o tempo de armazenamento de 13 dias pode-se observar diferenças em vários parâmetros ao comparar as soluções com os CP 100% Plasma e entre as soluções teste (Tabelas 5, 6 e 7). De forma geral pode-se afirmar que o grupo controle manteve os parâmetros recomendados pelas agências reguladoras (Anvisa e AABB) até o quinto dia de armazenamento, exceto o valor médio de pH ($6,1 \pm 0,59$). As soluções testes mantiveram os parâmetros recomendados até o nono dia, com um maior destaque para a solução SSP+ que manteve estes parâmetros estáveis até o 13º dia de estoque.

Tabela 5. Variáveis quantitativas, morfológicas e marcadores de superfície e função plaquetária avaliados nos dias 1, 5, 9 e 13 nos tratamentos experimentais.

Parâmetros	Dia 1			Dia 5			Dia 9			Dia 13		
	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol
Contagem plaquetas ($\times 10^{10}/\text{unit}$)	7,197 ($\pm 2,87$)	7,88 ($\pm 2,13$)	7,64 ($\pm 2,44$)	7,23 ($\pm 3,37$)	7,96 ($\pm 2,11$)	8,01 ($\pm 2,54$)	7,17 ($\pm 3,4$)	7,91 ($\pm 1,96$)	8,41 ($\pm 2,70$)	7,35 ($\pm 3,04$)	7,6 ($\pm 2,10$)	8,07 ($\pm 2,62$)
Celulas viáveis (%)	91,86 ($\pm 4,86$)	91,97 ($\pm 3,68$)	92,42 ($\pm 4,82$)	93,93 ($\pm 3,12$)	91,71 ($\pm 6,71$)	92,5 ($\pm 4,21$)	86,59 ($\pm 26,18$)	93,16 ($\pm 4,59$)	92,4 ($\pm 5,30$)	92,5 ($\pm 3,06$)	92,93 ($\pm 5,37$)	93,63 ($\pm 3,81$)
Swirling	3 a§ (± 0)	3 a§ (± 0)	2,86 a§ ($\pm 0,53$)	2,07 a¶ ($\pm 0,95$)	2,76 b¶ ($\pm 0,43$)	2,35 c¶ ($\pm 1,0$)	1,07 a£ ($\pm 0,64$)	2,3 b£ ($\pm 0,52$)	1,86 c£ ($\pm 1,17$)	0,61 a† ($\pm 0,50$)	1,61 b† ($\pm 0,76$)	1,43 c† ($\pm 0,85$)
MPV (fL)	11,23 § ($\pm 1,02$)	11,38 § ($\pm 0,90$)	12,57 § ($\pm 1,37$)	13,23 ¶ ($\pm 1,74$)	12,93 ¶ ($\pm 0,97$)	13,04 ¶ ($\pm 1,75$)	12,65 ¶ ($\pm 2,47$)	13,11 ¶ ($\pm 1,17$)	12,78 ¶ ($\pm 1,65$)	13,78 ¶ ($\pm 1,52$)	12,62 ¶ ($\pm 1,01$)	12,53 ¶ ($\pm 1,23$)
PDW (fL)	12,66 § ($\pm 1,80$)	13,49 § ($\pm 1,77$)	14,98 § ($\pm 2,52$)	15,92 ¶ ($\pm 2,79$)	17,92 ¶ ($\pm 2,77$)	16,15 ¶ ($\pm 3,27$)	15,8 ¶ ($\pm 3,53$)	17,5 ¶ ($\pm 2,25$)	15,96 ¶ ($\pm 2,83$)	18,32 a¶ ($\pm 1,74$)	16,95 b¶ ($\pm 2,35$)	16 b¶ ($\pm 2,46$)
CD62P-PE (%) P selectin	2,15 a§ ($\pm 0,95$)	1,58 b§ ($\pm 1,15$)	2,11 b§ ($\pm 2,83$)	1,64 a¶ ($\pm 1,13$)	0,49 b¶ ($\pm 0,40$)	0,87 b ¶ ($\pm 0,59$)	2,36 a¶ ($\pm 0,98$)	0,63 b¶ ($\pm 0,60$)	1,11 b¶ ($\pm 1,14$)	3,01 a£ ($\pm 2,1$)	0,90 b£ ($\pm 0,70$)	0,91 b£ ($\pm 0,85$)

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Símbolos diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dias de avaliação (ao longo do tempo). Resultados reportados como média \pm desvio padrão.

Tabela 6. Análises de gases e variáveis metabólicas avaliados nos dias 1, 5, 9 e 13 nos tratamentos experimentais.

Parâmetros	Dia 1			Dia 5			Dia 9			Dia 13		
	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol
Glicose (mg/dL)	465,4 a§ (± 38,91)	114,8 b§ (± 25,84)	123,8 b§ (± 30,3)	262,5 a¥ (± 101,7)	66,5 b¥ (± 40,31)	69,0 b¥ (± 25,21)	168,0 a£ (± 64,71)	20 b£ (± 0)	35,0 b£ (± 0)	157,5 a£ (± 48,18)	20 b£ (± 0)	20 b£ (± 0)
Lactato (mg/dL)	5,59 a§ (± 2,34)	4,49 b§ (± 1,7)	4,49 b§ (± 2,48)	22,86 a¥ (± 9,5)	17,92 b¥ (± 5,77)	13,26 b¥ (± 5,4)	34,46 a£ (± 6,84)	20,0 b£ (± 4,03)	19,7 b£ (± 4,47)	37,28 a£ (± 5,88)	21,24 b£ (± 2,72)	21,12 b£ (± 3,85)
pH (a 22°C)	7,162 a§ (± 0,24)	6,73 b§ (± 0,19)	6,44 c§ (± 0,46)	6,1 a§ (± 0,59)	6,36 b§ (± 0,15)	6,04 c§ (± 0,67)	5,48 a¥ (± 0,34)	6,49 b¥ (± 0,33)	5,99 c¥ (± 0,67)	5,42 a¥ (± 0,20)	6,6 b¥ (± 0,44)	6,13 c¥ (± 0,78)
ATP ($\mu\text{mol}/10^{11}$ plaquetas)	1,75 § (± 0,72)	1,19 § (± 0,81)	1,33 § (± 0,58)	0,98 ¥ (± 0,31)	1,17 ¥ (± 0,37)	1,19 ¥ (± 0,51)	1,05 ¥ (± 0,43)	1,18 ¥ (± 0,57)	0,87 ¥ (± 0,25)	1,09 ¥ (± 0,36)	1,0 ¥ (± 0,71)	1,07 ¥ (± 0,35)
pO ₂ (mmHg)	107,6 a§ (± 30,85)	77,76 b§ (± 30,76)	76,21 b§ (± 13,29)	141,1 a¥ (± 21,9)	105,8 b¥ (± 30,78)	119,1 b¥ (± 37,77)	157,8 a£ (± 6,97)	111,0 b£ (± 36,69)	126,3 b£ (± 41,1)	155,5 a£ (± 9,33)	148,6 b£ (± 12,33)	133,3 b£ (± 43,97)
pCO ₂ (mmHg)	40,55 a§ (± 15,8)	24,62 b§ (± 4,6)	30,49 b§ (± 10,8)	11,83 a¥ (± 6,03)	18,22 a¥ (± 3,78)	16,22 a¥ (± 9,21)	5,43 a£ (± 1,58)	13,5 b£ (± 2,99)	12,38 b£ (± 7,43)	5 a£ (± 0)	9,9 b£ (± 1,9)	10,27 b£ (± 6,2)
Sódio (mmol/L)	143,7 a§ (± 1,25)	146,9 b§ (± 0,86)	150,5 c§ (± 1,74)	144,1 a§ (± 2,25)	147,8 b§ (± 0,6)	149,6 c§ (± 4,14)	145,8 a¥ (± 1,3)	148 b¥ (± 0,81)	150,9 c¥ (± 1,77)	148,3 a£ (± 1,8)	148,8 b£ (± 0,8)	152,3 c£ (± 0,99)
Potássio (mmol/L)	2,762 a§ (± 0,83)	3,41 b§ (± 0,13)	3,66 c§ (± 0,17)	2,25 a§ (± 0,65)	3,06 b§ (± 1)	4,14 c§ (± 0,77)	3,45 a¥ (± 0,73)	4,06 b¥ (± 0,40)	4,55 c¥ (± 0,57)	3,64 a¥ (± 0,54)	4,46 b¥ (± 0,3)	4,82 c¥ (± 0,40)
Bicarbonato (mmol/L)	12,45 a§ (± 1,267)	5,12 b§ (± 0,84)	4,11 b§ (± 0,82)	2,63 a¥ (± 0,83)	2,46 a¥ (± 0,80)	3,88 a¥ (± 1,14)	1,1 a¥ (± 0)	2,65 b¥ (± 1,32)	3,17 b¥ (± 0,8)	1,1 a£ (± 0)	3,2 b£ (± 1,96)	5,38 b£ (± 1,93)

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Símbolos diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dias de avaliação (ao longo do tempo). Resultados reportados como média±desvio padrão.

Tabela 7. Marcadores de apoptose avaliados nos dias 1, 5, 9 e 13 nos tratamentos experimentais.

Parâmetros	Dia 1			Dia 5			Dia 9			Dia 13		
	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol	Plasma	SSP+	Composol
$\Delta\psi_m$ (%) JC-1 agregados	92,93 § (± 2,62)	92,46 § (± 2,62)	91,10 § (± 6,94)	65,93 ¥ (± 34,37)	64,95 ¥ (± 17,45)	63,23 ¥ (± 33,84)	16,78 a£ (± 17,48)	51,02 b£ (± 17,86)	56,40 b£ (± 29,21)	10,89 a£ (± 8,45)	43,54 b£ (± 17,35)	45,53 b£ (± 19,5)
$\Delta\psi_m$ (%) Mitotracker Red	88,92 § (± 7,46)	84,20 § (± 11,01)	83,91 § (± 12,21)	65,03 ¥ (± 33,67)	59,11 ¥ (± 25,79)	52,83 ¥ (± 34,29)	17,55 £ (± 27,91)	29,18 £ (± 17,57)	26,99 £ (± 34,31)	5,18 £ (± 7,26)	23,45 £ (± 19,96)	16,92 £ (± 23,47)
Annexin-V (%) Fosfatidilserina (PS)	1,78 a (± 1,28)	2,14 b (± 0,99)	2,94 b (± 1,72)	3,87 a (± 4,44)	1,76 b (± 0,88)	1,92 b (± 2,09)	3,64 a (± 3,72)	1,34 b (± 0,71)	1,47 b (± 1,10)	2,22 a (± 1,45)	1,23 b (± 0,93)	1,49 b (± 1,43)
LDH U/L	252,69 § (± 160,45)	110,30 § (± 118,73)	57,78 § (± 92,72)	353,2 § (± 208,2)	422,2 § (± 456,0)	727,5 § (± 931,66)	3483,0 ¥ (± 2863,0)	1766,0 ¥ (± 1783,0)	2575,0 ¥ (± 2569,0)	4032,53 £ (± 2078,0)	3933,0 £ (± 3097,5)	6317,1 £ (± 5278,84)

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Símbolos diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dias de avaliação (ao longo do tempo). Resultados reportados como média±desvio padrão.

Tabela 8. Comparação dos resultados deste experimento com outros estudos relatando parâmetros *in vitro* de concentrado de plaquetas (CP) em plasma, SSP+ e Composol, utilizando 35% de plasma residual para as soluções aditivas plaquetárias em diferentes métodos de obtenção do CP, material das bolsas plásticas e tempos de estoque.

Dados avaliados	Plasma					SSP+			Composol	
Plasma residual (%)	100%	100%	100%	100%	100%	35%	35%	35%	35%	35%
Método de obtenção de CP	PRP	PRP	PRP	PRP	PRP	PRP	BC	BC	BC	PRP
N amostral	64	8*	22*	15*	13*	13*	35	23	10	14*
Material bolsa CP	DEHP-PVC	DEHP-PVC	TOTM-PVC	TOTM-PVC	TOTM-PVC	TOTM-PVC	Variado	Variado	Poliolefina	TOTM-PVC
Leucorredução	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Tempo de estoque (dias)	5	7	7	9	5	9	8	8	9	9
pH (dia 5)	6,7±0,26	7,30 ± 0,3	6,7±0,2	> 7,0	6,1±0,59	6,36±0,15	> 6,6	> 6,6	6,93 ± 0,12	6,04±0,67
Swirling (dia 5)	>2	NI	>2	NI	2,07 ± 0,95	2,76 ± 0,43	Adequado		2,0 ± 0,7	2,35 ± 1
Referência	Singh et al, 2009	Hoareau et al., 2014	Costa et al, 2011	Sink, 2002	Este estudo			van der Meer et al, 2010	Van der meer, 2001	Este estudo

*Estudos realizados em caninos; PRP: plasma rico em plaquetas; BC: *buffy coat*; NI: não informado.

O período de armazenamento para CPs 100% plasma obtidos pela técnica de PRP é de 5 dias, então a qualidade do grupo controle está de acordo com as recomendações estabelecidas (Anvisa, 2004; Kaufman *et al.*, 2015). Segundo Singh *et al* (2009), os CP se mantêm com parâmetros estáveis até o quinto dia de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com os observados neste projeto (Tabelas 5, 6 e 8), Entretanto, ao contrário do que é sugerido por este autor, não há estabilidade destes parâmetros ao estender o estoque até o nono dia. Ao comparar as três técnicas (PRP, BC e aférese) para obtenção de CP, o autor observou ausência de diferenças extremas entre elas, e uma limitação do tempo de estoque em função do material plástico da bolsa. Hoareau *et al* (2014) compararam a obtenção de CP canino por PRP e BC. Pelo método de PRP os autores observaram que os CP produzido apresentaram menor contaminação com leucócitos e eritrócitos. Além disso, quando comparados aos CP produzidos pelo método de BC demonstraram função plaquetária superior por até 7 dias. Variações para a técnica de BC para caninos podem ocorrer de acordo com a tecnologia do equipamento utilizado, sendo assim, há uma maior necessidade de padronização da técnica.

Nos Estados Unidos e na Europa, com uso de soluções aditivas o tempo de estoque dos CPs foi prolongado para 7 dias, e os métodos preconizados para obtenção de CP são aférese e BC, respectivamente (Heaton, 2013). Estudos em bancos de sangue humanos já testaram o metabolismo *in vitro* destas mesmas soluções por períodos superiores a 12 dias (Van Der Meer, Pietersz e Reesink, 2001; Van Der Meer, P. F., Pietersz, R. N. e Reesink, H. W., 2004; Sweeney *et al.*, 2006; Cookson *et al.*, 2010; Van Der Meer *et al.*, 2010; Tynngård, Nahreen, Trinks, Marie e Berlin, Gösta, 2012; Hoareau *et al.*, 2014; Gravemann *et al.*, 2015). Nas Tabelas 2 e 8, pode-se observar dados comparativos de alguns estudos e também deste experimento. Nota-se que há muita variabilidade em relação ao percentual de plasma residual, técnica de obtenção do CP e material plástico da bolsa.

As bolsas DEHP-PVC são recomendadas para uso por até 5 dias, mas essa limitação de tempo suscita discussões dos resultados obtidos nas pesquisas com esse material (Van Der Meer e De Korte, 2011; Prowse, De Korte, Hess, Van Der Meer, *et al.*, 2014). Um estudo testou a eficácia do armazenamento de CP canino por 9 dias em bolsas TOTM-PVC, poliolefina e DEHP-PVC. Todas as bolsas mantiveram pH aceitável (> 6,2) até o último dia de estoque, confirmando uma diminuição significativa

da pO₂ nas amostras armazenadas em DEHP-PVC e anteriormente observadas em CP humanos (Sink, 2002).

Ao preparar o CP com SAP há uma variabilidade de opiniões sobre a quantidade de plasma residual utilizado. A recomendação do fabricante é que seja utilizado um valor de 32 a 47% de plasma residual. Muitos estudos avaliam a viabilidade de produção de CP com menos de 10% de plasma residual com manutenção do metabolismo plaquetário (Saunders *et al.*, 2011; Gravemann *et al.*, 2015). Neste estudo, optou-se por padronizar o uso de 35% de plasma residual. Os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos em trabalhos com plaquetas humanas, que utilizaram este mesmo percentual para as soluções SSP+ e Composol (Tabela 8) (Van Der Meer *et al.*, 2010).

Neste estudo houve variação significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento dos CPs dos três tratamentos nos seguintes parâmetros: lactato, glicose, LDH, *swirling*, pH, pCO₂, pO₂, bicarbonato, potássio, $\Delta\Psi_m$, ATP e expressão de CD62P. Pode-se observar variação significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e as soluções aditivas, nos seguintes parâmetros: lactato, glicose, *swirling*, pH, pO₂, bicarbonato, potássio, exposição da PS (Anexina V), $\Delta\Psi_m$ e expressão CD62P.

Variáveis quantitativas e morfológicas

A contagem plaquetária manteve-se estável ao longo do tempo de armazenamento ($p = 0,977$) e não houve diferença entre o plasma e as SAP ($p = 0,276$) (Tabela 5). Estes resultados foram divergentes em relação a pesquisas que avaliaram CP canino em 100% plasma. No CP 100% de plasma foi observado que a redução significativa da contagem plaquetária está associada a formação de microagregados plaquetários, lise celular e alterações metabólicas durante o armazenamento (Sink, 2002; Costa, 2011). Entretanto Gonçalves (2006); Horeau et al (2014), não observaram variação na contagem plaquetária; assim como outros autores que avaliaram CP humanos nas mesmas SAP utilizadas neste experimento (Van Der Meer *et al.*, 2010). Permite-se então destacar que a obtenção de concentrações adequadas de plaquetas nas bolsas depende de uma padronização adequada dos protocolos de centrifugação para cada banco de sangue.

Somente no primeiro dia de análise não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao *swirling* ($p = 0,436$). Observa-se que há uma redução

significativa deste parâmetro ao longo de tempo ($p < 0,001$). O *swirling* se manteve em 2+ (adequado para uso) até o dia 9 nas duas SAP, e até o dia 13, nos CPs armazenados com SSP+. No dia 9, as amostras do grupo controle apresentaram diminuição do *swirling* em relação ao grupo SSP+ ($p < 0,001$), enquanto no dia 13 o *swirling* do plasma mostrou-se inferior ao das soluções aditivas ($p < 0,001$) (Tabela 5, Figura 8).

O *swirling* plaquetário é utilizado para mensurar mudanças na morfologia plaquetária de discoide para esférica, sendo utilizado como indicador de viabilidade (Johnson *et al.*, 2013). Conforme os dados das Tabelas 2 e 8 percebe-se que em todos os estudos, independente do uso ou não da SAP há manutenção deste parâmetro até o quinto dia de armazenamento. A manutenção do *swirling* com uso de SSP+ e Composol por 7 dias ou mais foi observada por outros autores e corroboram com os resultados obtidos neste trabalho (Van Der Meer, Pietersz e Reesink, 2001; Van Der Meer *et al.*, 2010; Gravemann *et al.*, 2015).

Os índices morfoestruturais PDW e MPV apresentaram diferenças entre os dias de avaliação. Ambos os parâmetros apresentaram aumento significativo em relação ao dia 1 e aos demais dias de avaliação ($p = 0,001$), havendo um aumento expressivo no PDW no grupo controle no dia 13 ($p = 0,001$) em comparação com as SAP (Figura 8).

O aumento dos índices plaquetários - MPV e PDW - apresentou forte associação com a diminuição dos níveis de glicose, aumento da produção de lactato, redução do pH, e perda de $\Delta\Psi_m$. Conforme ocorre o consumo de glicose a concentração de lactato aumenta, o pH diminui e associado a estes eventos ocorre perda de potencial mitocondrial. Sink (2002) observou aumento do MPV em CP canino 100% plasma a partir do 5º dia de estoque, a autora sugere que as plaquetas perdem a capacidade de manutenção do equilíbrio osmótico e conseqüentemente perdem a forma discoide.

Durante o estoque pode-se observar um aumento do MPV relacionado ao *swirling* da população e uma transformação da forma discoide para esférica. Entretanto, deve-se correlacionar com os dados de PDW, que indica anisocitose plaquetária, dado que não é demonstrado com frequência em experimentos que avaliam o estoque plaquetário (Singh, Chaudhary e Ray, 2003b). Com o tempo de armazenamento há lise e formação de micropartículas, levando a um decréscimo do MPV e aumento do PDW. A contagem plaquetária também pode reduzir em decorrência da lise das plaquetas frágeis e senescentes, o que não foi observado neste estudo (Mobarrez *et al.*, 2010; Helmond, Catalfamo e Brooks, 2013).

Ao comparar soluções aditivas Tynngård *et al* (2012) não observaram mudanças no MPV até o 5º dia de estoque, sugerindo que a mudança de formato ocorre independente da SAP utilizada. Observa-se que o PDW do grupo controle tem aumento significativo no 13º dia de estoque, refletindo que a fragmentação plaquetária está mais presente neste grupo. Estes achados sugerem que há deterioração das plaquetas a partir do 5º dia de estoque, mas esta é mais expressiva no CP armazenado em 100% plasma.

Marcadores de superfície e função plaquetária

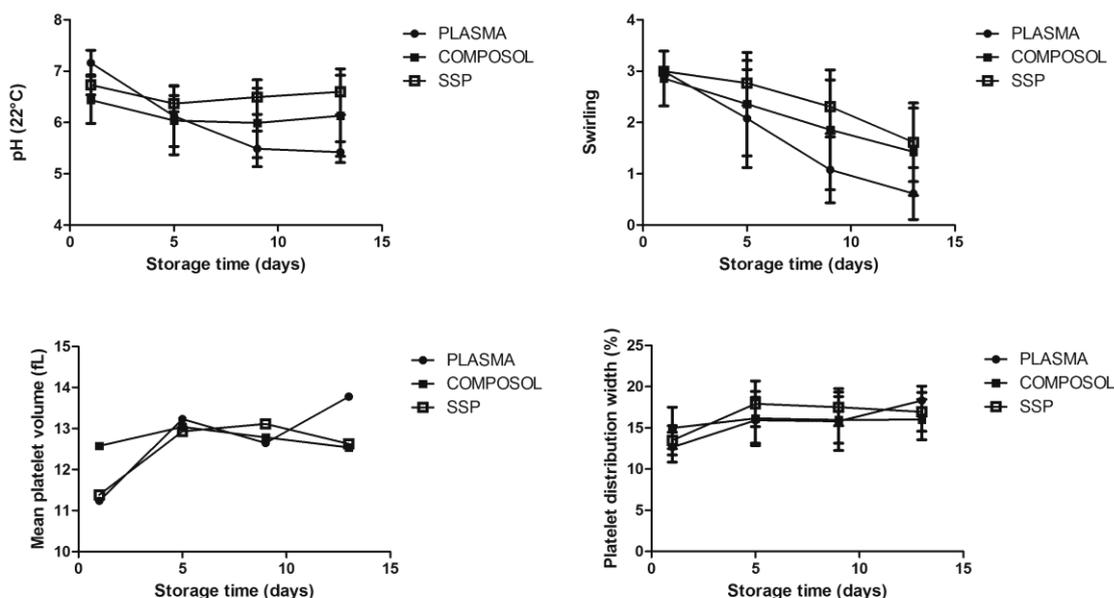
Conforme esperado, não houve diferença significativa em relação à contagem de plaquetas e marcação com anticorpo monoclonal CD61 ao longo do tempo ($p= 0,646$) ou entre os tratamentos de estudo ($p= 0,633$), a marcação manteve-se acima de 85% (Tabela 5, Figura 9). Estes parâmetros demonstraram homogeneidade dos grupos que foram comparados. Estes resultados estão de acordo com outros estudos onde o percentual se manteve independente da SAP utilizada (Vassallo *et al.*, 2010; Tynngård, Nahreen, Trinks, Marie e Berlin, Gösta, 2012).

Como marcador de ativação plaquetária utilizou-se a marcação da expressão de superfície da p-selectina (CD62P), amplamente utilizado em pesquisas relacionadas a avaliação de CP (Zhang *et al.*, 2008; Cid *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2015). CD62P é um marcador dos grânulos alfa, e se desloca para a superfície da membrana plaquetária quando há ativação. Pode-se observar maior percentual de marcação no grupo controle, se comparado as SAP ($p= 0,001$), não havendo diferença entre as SAP. Também, nota-se um maior percentual de ativação nos dias 1 e 13 de armazenamento ($p= 0,014$) (Figura 8 e 9). Experimentos em CP humano associam a ativação do dia 1 à intensa manipulação da bolsa de sangue no momento da preparação. No dia 13, pode estar correlacionado com perda de função plaquetária (Vassallo *et al.*, 2010). Infelizmente, muitos estudos observam resultados inconsistentes ao correlacionar o aumento da expressão de CD62P com o incremento pós-transfusional (Dijkstra-Tiekstra, Pietersz e Huijgens, 2004; Tong *et al.*, 2015). Na correlação de Pearson verificou-se correlação positiva em relação ao lactato ($r= 0,201$; $p< 0,05$); e correlação negativa em relação ao pH ($r= - 0,161$; $p< 0,05$). A ativação plaquetária está associada ao aumento da produção de lactato e decréscimo do pH, ou seja, incremento do metabolismo anaeróbico; que irá ocorrer quando houver alta disponibilidade de glicose ou diminuição do $\Delta\Psi_m$ associado ao mecanismo apoptótico (Tabela 9) (Leytin *et al.*, 2008; Cookson *et al.*, 2010).

Tabela 9. Correlação de Pearson entre as características metabólicas dos concentrados de plaquetas armazenados em plasma e solução aditiva por 13 dias.

Correlações	Glicose	Lactato	pH	HCO ₃	ATP	pO ₂	pCO ₂	MPV	PDW	$\Delta\Psi_m$ (JC-1)	LDH
Glicose	-	-0,220*	,468**	,667**	,246*	0,093	,338**	-,283*	-,321**	,284**	-,226*
Lactato	-,220*	-	-,663**	-,590**	-,285**	,596**	-,659**	,477**	,500**	-,800**	,463**
pH	,468**	-,663**	-	,706**	,253**	-,525**	,542**	-,549**	-,455**	,660**	-,227**
HCO ₃	,667**	-,590**	,706**	-	,397**	-,366**	,695**	-,507**	-,526**	,604**	-,073
ATP	,246*	-,285**	,253**	,397**	-	-,169*	,262**	-,160	-,128	,350**	-,099
pO ₂	0,093	,596**	-,525**	-,366**	-,169*	-	-,736**	,256**	,257**	-,602**	,179*
pCO ₂	,338**	-,659**	,542**	,695**	,262**	-,736**	-	-,314**	-,389**	,708**	-,336**
MPV	-,283*	,447**	-,549**	-,507**	-,160	,256**	-,314**	-	,855**	-,440**	0,017
PDW	-,321**	,500**	-,455**	-,526**	-,128	,257**	-,389**	,855**	-	-,550**	0,102
$\Delta\Psi_m$ (JC-1)	,284**	-,800**	-,660**	,604**	,350**	-,602**	,708**	-,440**	-,550**	-	-,392**
LDH	-,226*	,463**	-,277**	-,073	-,099	,179*	-,336**	0,017	0,102	-,392**	-

* Correlação com nível de significância $p < 0,05$; ** Correlação com nível de significância $p < 0,01$.



(Continua)

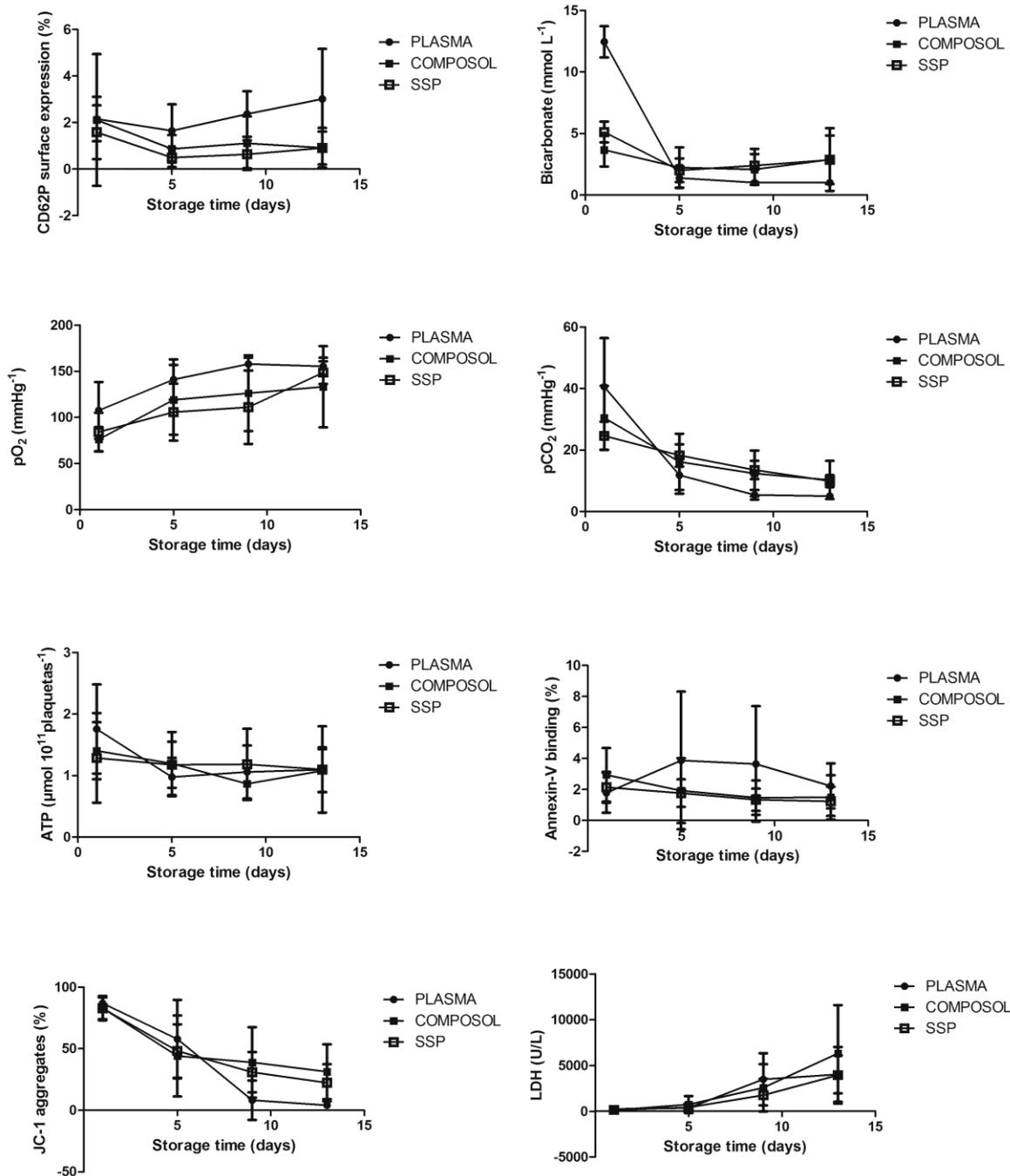


Figura 8. Gráficos de regressão linear dos parâmetros *in vitro* dos concentrados de plaquetas em plasma e solução aditiva, estocados por 13 dias.

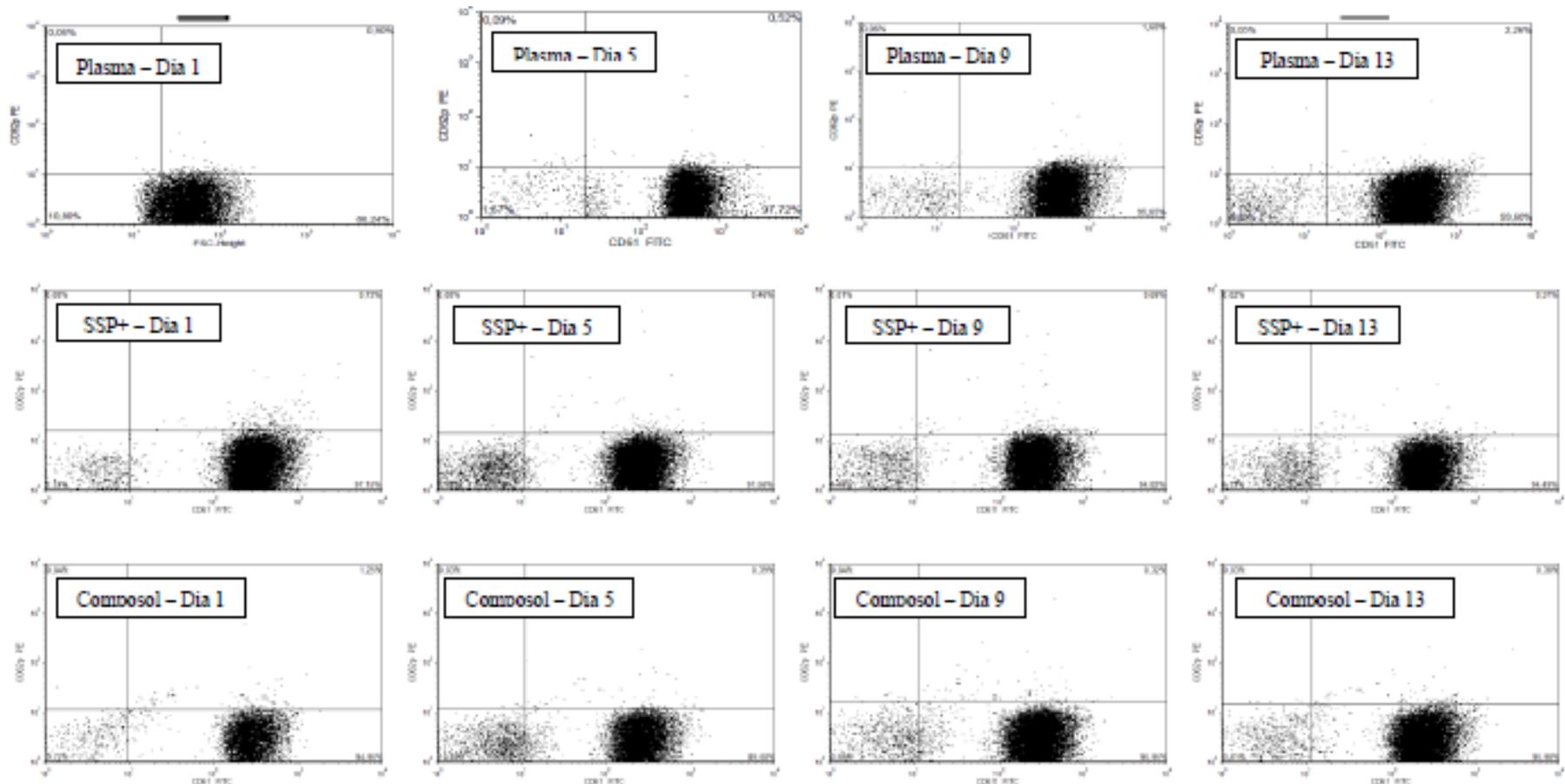


Figura 9. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, demonstrando a marcação com os anticorpos monoclonais CD61 e CD62P ao longo dos 13 dias de armazenamento. Observar a marcação de CD61 no quadrante inferior direito, onde esta é sempre superior a 85%. A porcentagem de CD62P é observada nos quadrantes superiores direito e esquerdo, sendo que a análise estatística dos tratamentos evidenciou maior marcação nos dias 1 e 13, e maior marcação no grupo controle (100% plasma) em relação as soluções aditivas (SSP+ e Comsolol).

Ainda como forma de atestar a viabilidade do concentrado de plaquetas dos diferentes tratamentos experimentais, optou-se por realizar teste de agregometria. Juntamente com a contagem de plaquetas e determinação do pH, os ensaios de agregação são comumente utilizados na avaliação de CPs. A capacidade das plaquetas responderem aos agonistas é um teste de funcionalidade, e a falta de agregação sugere diminuição/perda de função (Miyajiet, 2004). Pode-se observar que não houve diferença significativa entre a capacidade de agregação do grupo controle e dos CPs em solução aditiva: colágeno (p= 0,841), ácido araquidônico (p= 0,141) e ADP (p= 0,133) (Tabela 10). Ao comparar CPs caninos obtidos pelos métodos de PRP e BC, Hoareau *et al* (2014) observaram uma baixa amplitude de agregação. No entanto, os resultados negativos não se refletem *in vivo*. Dados comparativos mostram que há capacidade de agregação *in vivo* mesmo quando os resultados da agregometria *in vitro* parecem insatisfatórios (Miyaji *et al.*, 2004; Cardigan, Turner e Harrison, 2005; Jackson, 2007).

Tabela 10. Resultados da agregometria realizados no dia experimental 1.

	Dia 1		
	Plasma CPD	SSP+	Composol
ADP	9,3 ± 4,66	5,23 ± 5,96	6,6 ± 4,66
Colágeno	11,07 ± 3,72	12,15 ± 6,0	11,0 ± 6,5
Ac. aracdônico	11,46 ± 4,99	7,46 ± 6,17	8,07 ± 5,04

Resultados reportados como média±desvio padrão.

Análise de gases e variáveis metabólicas

No dia 1 os CP 100% plasma apresentaram os maiores valores de pH em relação aos tratamentos com solução aditiva SSP+ (p= 0,006) e Composol (p= 0,001) (Tabela 6, Figura 8). O aumento do tempo de estoque revelou que o pH nos CP 100% plasma se manteve aceitável até o 5º dia (6,3 ± 0,63), entretanto há um decréscimo significativo nos dias 9 e 13 (Dia 9: 5,49 ± 0,34; Dia 13: 5,42 ± 0,20). A solução Composol teve comportamento semelhante, havendo decréscimo nos dias 9 e 13 (Dia 9: 5,99 ± 0,67; Dia 13: 6,13 ± 0,78). Embora o decréscimo do pH não tenha sido tão acentuado, estudos realizados em plaquetas humanas relatam pH acima de 7,0 até o 12º dia de estoque com esta mesma solução (Van Der Meer, Pietersz e Reesink, 2001; Cookson *et al.*, 2010). Interessantemente, não houve diferença significativa para o pH entre as duas soluções aditivas no dia 13, entretanto, aquelas mantidas em Composol apresentaram um valor médio de pH (6,13 ± 0,78) abaixo do limite aceitável para o procedimento de

transfusão. A solução SSP+ mostrou maior eficácia na manutenção do pH durante os 13 dias de estoque (Dia 9: $6,49 \pm 0,33$; Dia 13: $6,6 \pm 0,44$). Em outros estudos, esta solução obteve pH acima de 7,0 no 7º dia de armazenamento, sendo utilizada quantidade semelhante de plasma residual (30%) (Diedrich et al., 2008; Gravemann et al., 2015). De acordo com van der Meer (2010) ao avaliar SSP+ e Composol com 35% de plasma residual observou manutenção de pH ($> 6,6$) até o 8º dia de estoque (Tabela 8). Nota-se então que o pH diminuiu em todos os CPs com o passar do tempo, porém se manteve dentro dos limites aceitáveis ($> 6,2$) até o dia 13 apenas nas amostras mantidas em SSP+. Ao comparar resultados deve-se considerar que nos bancos de sangue humanos os métodos de produção de CP são por meio de BC ou aférese, podendo incorrer em discretas mudanças no metabolismo.

Em relação à concentração de ATP, observa-se diminuição na sua concentração, sendo esta mais significativa entre os dias 1 e 9 ($p= 0,001$) e 1 e 13 ($p= 0,003$), mas não há diferença entre os tratamentos ($p= 0,723$) (Tabela 6, Figura 8). Na correlação de Pearson há uma correlação negativa em relação ao lactato e pO_2 e correlação positiva em relação a glicose, pH, HCO_3 , pCO_2 e JC-1 ($\Delta\Psi_m$) (Tabela 9).

A plaqueta metabolicamente ativa possui mitocôndria e produz ATP não somente através da glicólise anaeróbica, como também pela oxidação aeróbica que ocorre através do TCA. Como nas outras células, oxidação de glicose a piruvato ocorre no citosol, e posteriormente há oxidação do piruvato na mitocôndria. Como a glicólise e a fosforilação oxidativa são processos contínuos, o produto de uma via serve como substrato para a outra. Como discutido anteriormente, a plaqueta possui efeito Warburg e Pasteur, mantendo sua energia através do metabolismo aeróbico e anaeróbico. Estudos recentes mostram que a plaqueta ativada consome glicose; então a maioria da energia metabólica, neste estado, é proveniente da glicólise (Amorini *et al.*, 2007; Van Der Meer, 2007).

Em relação à glicose dos CP caninos avaliados, observa-se que há uma diminuição significativa da sua concentração ao longo do tempo ($p < 0,001$), entretanto não há variação entre os dias 9 e 13 de armazenamento. Também, nota-se que os CPs armazenados em Composol e SSP+ possuem valores significativamente diferentes ($p = 0,001$) deste metabólito quando comparado com o grupo controle (Tabela 6). As amostras do grupo controle apresentam uma queda brusca da concentração da glicose entre os dias 1 e 9 de armazenamento (Figura 10). Ressalta-se que, conforme a Tabela 3, as SAP possuem baixa quantidade de glicose com intuito de reduzir a taxa de glicólise anaeróbica, o que pode claramente ser evidenciado nestes resultados. Ao realizar análise de correlação de Pearson, pode-se observar uma correlação negativa deste metabólito em relação ao lactato, MPV, PDW e LDH, enquanto há uma correlação positiva em relação ao JC-1 ($\Delta\Psi_m$), pCO_2 , ATP, HCO_3 e pH (Tabela 9).

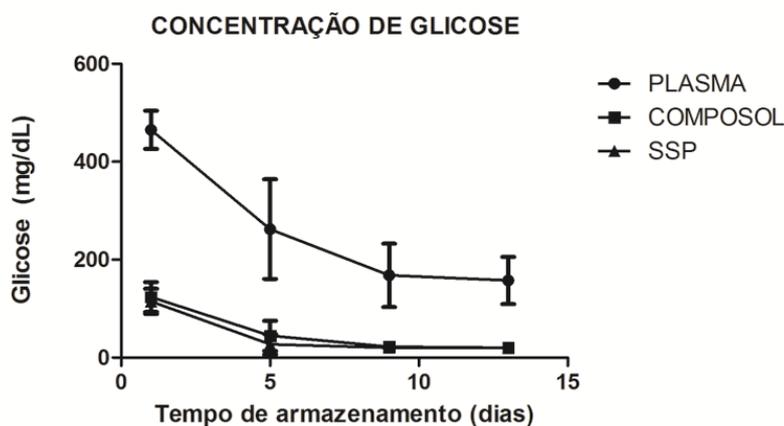


Figura 10. Gráfico de regressão linear referentes à dosagem média de glicose ao longo dos 13 dias de armazenamento no grupo controle (100% plasma). Observar a diminuição da concentração de glicose ao longo do período de armazenamento.

Houve aumento na concentração de lactato de todas as amostras ($p = 0,001$) (Figura 11), porém a partir dos dias 9 e 13 a concentração se mantém. Observa-se que a concentração no grupo controle é superior das SAP ($p = 0,001$). No que diz respeito às soluções aditivas, não houve diferença entre elas. A menor variação na concentração do lactato nas SAP ocorre, pois estas privilegiam a oxidação aeróbica. As SAP avaliadas demonstraram valores inferiores de lactato e glicose ao longo do armazenamento. Ao realizar análise de correlação de Pearson, pode-se observar uma correlação negativa

deste metabólico em relação a glicose, JC-1 ($\Delta\Psi_m$), pCO_2 , ATP, HCO_3 e pH, enquanto há uma correlação positiva em relação a pO_2 , MPV, PDW e LDH (Tabela 9).

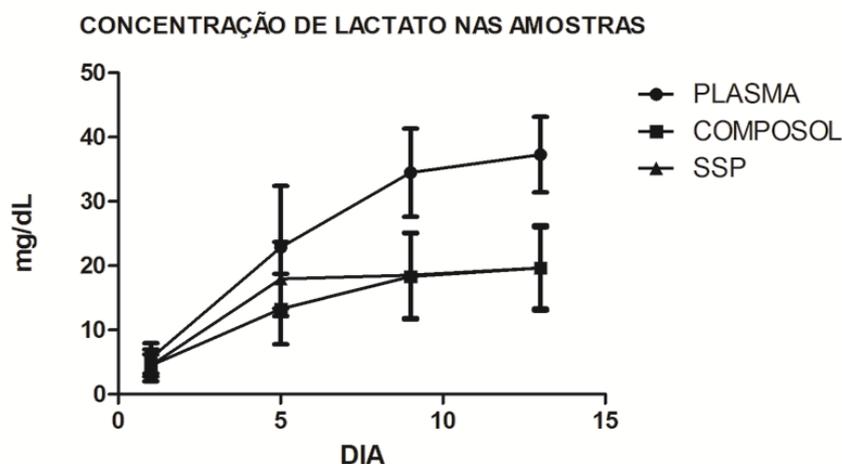


Figura 11. Gráfico de regressão linear referentes à dosagem média de lactato ao longo dos 13 dias de armazenamento nas soluções aditivas (Composol e SSP+) e grupo controle (plasma). Observar o aumento da concentração de lactato ao longo do período de armazenamento.

As taxas de produção de lactato e consumo de glicose são necessárias para avaliar a lesão de estoque plaquetário e viabilidade *in vitro* (Guppy *et al.*, 1995; Amorini *et al.*, 2007). Ao avaliar o consumo de glicose ao longo do tempo observa-se uma queda no consumo ao longo do tempo ($p= 0,001$), e o consumo médio é mais expressivo nos CP 100% plasma em relação as SAP ($p=0,001$) (Tabela 11, Figura 12). A produção de lactato se espelha ao consumo de glicose, e cessa em consequência da depleção dos estoques de glicose (Tabela 12, Figura 13). Neste estudo os resultados das taxas remetem ao mesmo comportamento dos CPs humanos avaliados em plasma ou SAP (Hayashi *et al.*, 2011; Saunders *et al.*, 2011). As formulações de SAP não contém glicose e o plasma residual é a única fonte de glicose como observado na Tabela 1. Este é o primeiro estudo que avaliou as taxas de produção de lactato e consumo de glicose em CP caninos. Pesquisas anteriores observaram comportamento metabólico e valores semelhantes aos relatados em humanos, mas somente quantificaram as concentrações de glicose e lactato (Sink, 2002; Costa, 2011).

Tabela 11. Consumo de glicose dos concentrados de plaquetas em plasma e solução aditiva, estocados por 13 dias.

Período avaliado	Consumo de glicose ($\mu\text{mol}/10^{10}$ plaq/dia)			
	100% Plasma (n= 13)	SSP+ (n= 13)	Composol (n= 14)	Consumo médio/dia
Dia 1-5	24,48 \pm 12,82	11,12 \pm 5	10,6 \pm 5,13	15,93 \pm 11,05 §
Dia 5-9	14,55 \pm 8,71	1,04 \pm 2,97	3,07 \pm 3,69	6,14 \pm 8,14 ¥
Dia 9-13	2,9 \pm 3,71	-0,13 \pm 0,18	0,25 \pm 1	0,99 \pm 2,54 £
Consumo médio/dia/grupo	14,65 \pm 13,24 a	4,01 \pm 6,07 b	4,64 \pm 5,7 b	

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Símbolos diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dias de avaliação (ao longo do tempo). Resultados reportados como média \pm desvio padrão.

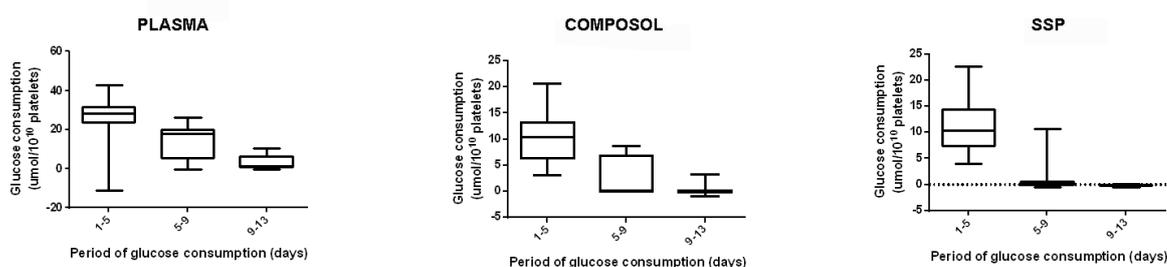


Figura 12. Taxas de consumo de glicose dos concentrados de plaquetas estocados em plasma e solução aditiva estocados por 13 dias.

Tabela 12. Produção de lactato dos concentrados de plaquetas em plasma e solução aditiva, estocados por 13 dias.

Período avaliado	Produção de lactato ($\mu\text{mol}/10^{10}$ plaq/dia)			
	100% Plasma (n= 13)	SSP+ (n= 13)	Composol (n= 14)	Produção média/dia
Dia 1-5	4,5 \pm 1,41	3,16 \pm 1,75	2,27 \pm 1,62	3,28 \pm 1,81 §
Dia 5-9	3,66 \pm 2,78	0,26 \pm 1,31	1,11 \pm 1,23	1,70 \pm 2,36 ¥
Dia 9-13	0,4 \pm 1,27	0,54 \pm 0,84	0,42 \pm 0,67	0,45 \pm 0,93 £
Produção média/dia/ grupo	2,85 \pm 2,6 a	1,37 \pm 1,89 b	1,26 \pm 1,43 b	

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Símbolos diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dias de avaliação (ao longo do tempo).

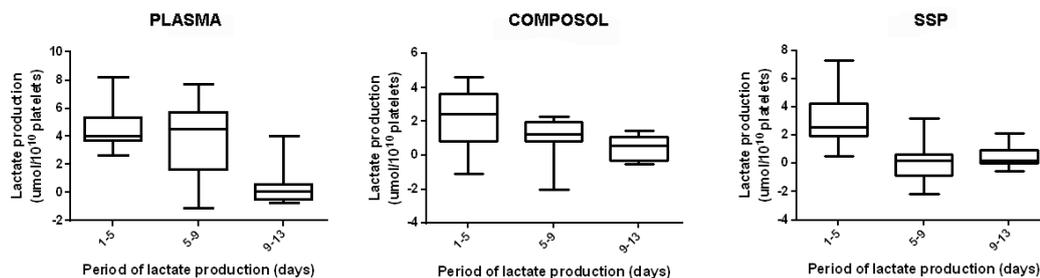


Figura 13. Taxas de produção de lactato dos concentrados de plaquetas estocados em plasma e solução aditiva estocados por 13 dias.

Um dos grandes objetivos da SAP é reduzir a taxa de glicólise anaeróbica, fornecendo substrato para oxidação aeróbica. Desta forma, é possível diminuir a produção de lactato mantendo a viabilidade plaquetária por mais tempo. Os resultados obtidos demonstram uma diferença metabólica entre o grupo controle (alta concentração de glicose plasmática) em relação as SAP comerciais (Gulliksson, 2003; Amorini *et al.*, 2007; Gyongyossy-Issa, 2011). O acetato foi adicionado ao Composol e SSP+ por ser um combustível oxidável, e sua presença ter efeito na redução do metabolismo anaeróbico e aumento no consumo de oxigênio (Gulliksson, 2014). E, em relação ao fosfato, testes *in vitro* comparando uso de SAP com (SSP+) e sem fosfato (SAPII) mostram que nas primeiras há uma redução da glicólise e estabilização do pH. O Composol, contém gluconato ao invés de fosfato com objetivo de manter a capacidade tamponante sem aumentar a produção de lactato (Gulliksson, 2003; Gulliksson, 2014).

A glicose é um importante componente energético plaquetário, pois as plaquetas armazenam o glicogênio como fonte de glicose endógena. A degradação do glicogênio plaquetário gera moléculas de glicose que podem ser desviadas para a produção de lactato. O aumento nos níveis de lactato pode ocorrer em consequência de restrição da oxigenação ou diminuição da função mitocondrial (Gyongyossy-Issa, 2011; Gulliksson, 2014).

Ao avaliar as amostras de CP canino dos três tratamentos, observou-se em relação ao sódio, um aumento na sua concentração ao longo do tempo, sendo esta mais expressiva nos dias 9 e 13 de armazenamento ($p= 0,001$). Entre os três tratamentos

também houve diferença estatística significativa ($p= 0,001$). As concentrações de potássio aumentaram a partir do 5º dia de armazenamento ($p= 0,001$) e foram significativamente diferentes estatisticamente entre os três tratamentos ($p= 0,001$). Dentre as SAP, a SSP+ possui concentração superior de sódio, e as duas possuem a mesma concentração de potássio em sua formulação (Tabela 1). O potássio foi adicionado às SAP que continham fosfato (SAPs de terceira geração), pois esse eletrólito desempenha um papel fundamental na manutenção do potencial de membrana, inibindo a liberação de citocromo c. Estudos em CP humano demonstraram que SAP com magnésio e potássio parecem ter menores porcentagens de expressão de CD62P, além de melhor manutenção do pH (Gulliksson *et al.*, 2003). As observações estão de acordo com os achados deste experimento. As SAPs de terceira geração têm se mostrado as mais eficientes ao avaliar manutenção do metabolismo energético, viabilidade plaquetária e, conseqüente, aumento de vida de prateleira (Gulliksson *et al.*, 2003; Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006).

A concentração de bicarbonato também é influenciada pela composição da SAP. Observa-se que há uma diminuição na sua concentração ao longo do tempo de armazenamento ($p< 0,001$), sendo esta alteração não significativa somente entre os dias 5 e 9. A concentração inicial de bicarbonato é superior no grupo controle ($p< 0,001$), conseqüentemente a queda da sua concentração é mais significativa neste grupo quando comparado as SAP. Ao final dos 13 dias de armazenamento sua concentração é superior nos grupos que utilizam SAP em relação ao grupo controle (Tabela 6, Figura 8). Observa-se também que a concentração de bicarbonato é mais estável no SSP+, padrão que reflete os valores mais estáveis de pH nestes CPs. O mesmo comportamento foi observado por Saunders *et. al.* (2011) ao comparar CP 100% plasma com 70% SSP+ por 14 dias. Através da análise de correlação de Pearson, pode-se observar uma correlação negativa do bicarbonato em relação ao lactato, pO_2 , MPV e PDW, enquanto há uma correlação positiva em relação a glicose, pH, ATP, pCO_2 e JC-1 ($\Delta\Psi_m$) (Tabela 9). A presença de bicarbonato no plasma tem um efeito tamponante, com a conversão do íon H^+ produzido pela glicólise em CO_2 e H_2O (Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006). Para compensar a ausência deste componente, adicionou-se acetato as SAP. No TCA, o acetato é metabolizado a acetil-CoA, consumindo H^+ e, posteriormente, é oxidado em CO_2 e H_2O , agindo de forma tamponante contra a redução de pH provocada pela glicólise (Ringwald, Zimmermann e Eckstein, 2006; Tynngård, 2009).

A redução na pCO₂ é observada ao longo do tempo de armazenamento e se torna mais expressiva até o 5º dia (p= 0,001), mantendo as concentrações nos dias 9 e 13. Há uma maior concentração de pCO₂ no grupo controle no dia 1, mas ao final do estoque a concentração é mais elevada nas SAP (p= 0,001). A pO₂ comporta-se de maneira inversa, ocorrendo um aumento ao longo do tempo de armazenamento, sendo este mais expressivo até o 5º dia (p= 0,001). A pO₂ tem uma concentração significativamente superior no grupo controle quando comparado com as SAP (p= 0,001) (Tabela 6, Figura 8). A redução da pCO₂ e aumento da pO₂ estão correlacionadas com a manutenção, e aumento do pH, não havendo diferença entre as SAP. Em relação a pCO₂, pode-se observar uma correlação negativa deste parâmetro com lactato, pO₂, MPV, PDW e LDH, enquanto há uma correlação positiva em relação a glicose, pH, bicarbonato, ATP e JC-1 ($\Delta\Psi_m$). Na pO₂, há uma correlação contraposta aos parâmetros de pCO₂. (Tabela 9). Estudos em CP humanos relatam uma relação inversa entre a pO₂ e a pCO₂ associada ao declínio do metabolismo oxidativo (Prowse, De Korte, Hess, Van Der Meer, *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram descritos comparando CP plasma com SAP em humanos (Vassallo *et al.*, 2010; Tynngård, Nahreen, Trinks, Marie e Berlin, Gösta, 2012).

Marcadores de apoptose

Seguindo as recomendações da AABB também foram realizados testes para identificação de morte celular, ou exposição de PS, através da marcação com Anexina V. A PS é considerada um marcador de ativação e atividade pró-coagulante, e também indicador de apoptose (Dasgupta *et al.*, 2010). Neste estudo não foram observadas mudanças ao longo do tempo de armazenamento (p= 0,285), entretanto há uma maior marcação no grupo controle se comparado as SSP+ (p= 0,007) e Composol (p= 0,050) (Tabela 7, Figuras 8 e 14). Esses resultados corroboram outras evidências de prejuízo do metabolismo plaquetário como: baixa concentração de glicose, alta concentração de lactato, redução brusca do pH e diminuição do potencial mitocondrial. Na maioria dos estudos a porcentagem de marcação aumenta ao longo do tempo (Van Der Meer *et al.*, 2010). Portanto, neste estudo pode ter ocorrido uma limitação em relação à técnica utilizada. Estudos em caninos já foram realizados, mas nunca avaliando este marcador por período prolongado (Pereira, 2002, dogs;Kingston Jk Fau - Bayly, 200)}. Um estudo comparando CP humano 100% plasma

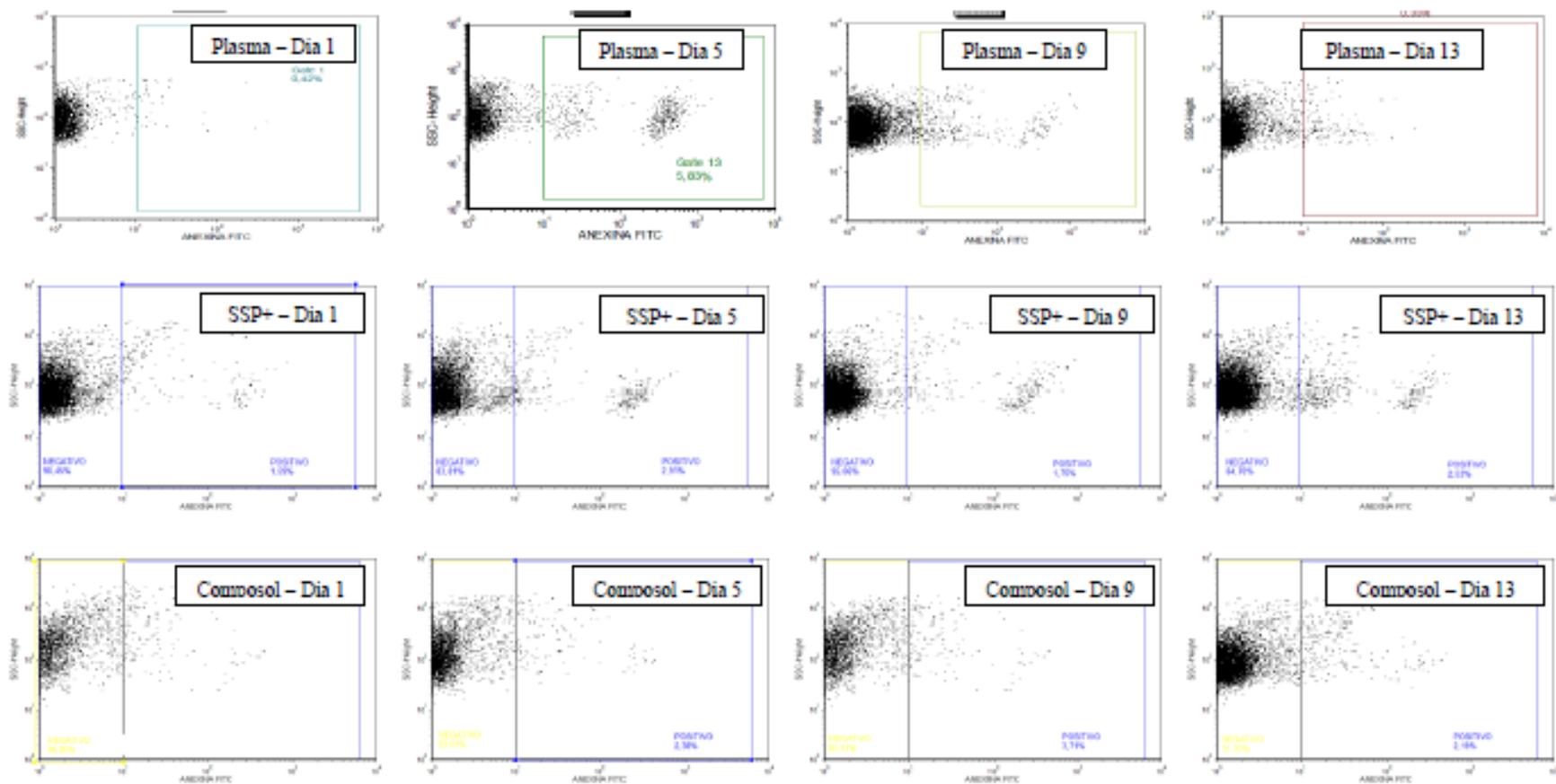


Figura 14. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, da exposição de fosfatidilserina (PS) avaliado pelo marcador Anexina V FITC. Observar que não há diferença na marcação ao longo dos 13 dias de estoque, mas há maior marcação no grupo controle (100% plasma), quando comparado com as soluções aditivas SSP+ e Composol.

com SSP+ observou comportamento semelhante em relação ao maior percentual de marcação no plasma (Saunders *et al.*, 2011).

A concentração de LDH aumentou com o passar do tempo em todos os tratamentos, e não houve diferença significativa entre eles ($p= 0,149$). Em relação ao período de estoque observou-se um aumento significativo da atividade enzimática a partir do 9º dia de armazenamento ($p= 0,001$) (Tabela 7, Figura 8). Pode-se observar correlação positiva entre LDH e lactato e pO_2 , e uma correlação negativa entre LDH e glicose, pH, pCO_2 e JC-1 ($\Delta\Psi_m$) (Tabela 9). Nas plaquetas que possuem mitocôndrias abundantes, a fosforilação oxidativa procede a glicólise, e o piruvato é convertido a acetilCoA. Este processo ocorre no interior da plaqueta de forma limitada, principalmente ao longo do tempo de estoque quando há perda do $\Delta\Psi_m$. Alternativamente no citosol, o piruvato pode ser reduzido a lactato pela enzima LDH e difundido ao citoplasma plaquetário. Este mecanismo reflete os resultados de correlação positiva com lactato, e negativa com pH e $\Delta\Psi_m$ (Cookson *et al.*, 2010; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012). Com a senescência, ocorre lise plaquetária e liberação de componentes citosólicos, incluindo o LDH. Por este motivo o LDH é um marcador de morte celular mais utilizado em pesquisa com modelos celulares. Estudos em CP plasma e CPs com SAP em caninos e humanos demonstram resultados que estão de acordo com os observados neste experimento (Sink, 2002; Vassallo *et al.*, 2010; Hoareau *et al.*, 2014).

Em relação ao JC-1, há um aumento do deslocamento de fluorescência para FL1 ao longo do tempo de armazenamento ($p= 0,001$), sem diferença significativa entre os dias 9 e 13 ($p= 0,446$). Por outro lado, nos últimos dois dias de avaliação há uma brusca redução do percentual de marcação do CP 100% plasma em comparação as SAP, sendo este mais significativo entre o plasma e Composol ($p= 0,047$) (Tabela 7, Figura 8, 15 e 16). Não houve diferença entre as soluções. Observa-se correlação positiva entre o JC-1 e glicose, pH, bicarbonato, ATP, pCO_2 ; e correlação negativa com lactato, pO_2 , MPV, PDW, LDH (Tabela 9).

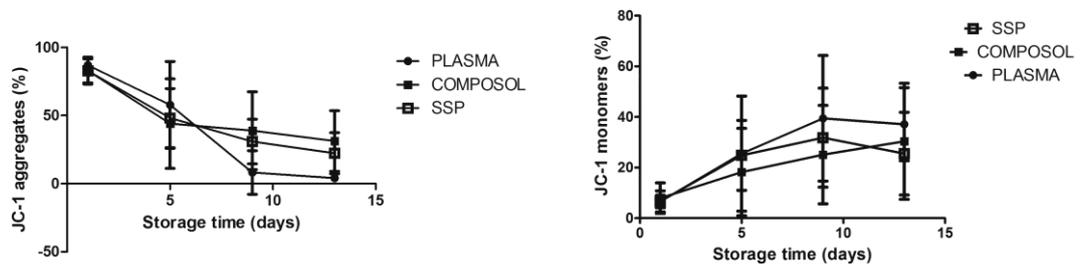


Figura 15. Gráfico de regressão linear demonstrando a redução da marcação de JC-1 agregados (FL2) e aumento da marcação para JC-1 monômeros (FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Composol) e no grupo controle (100% plasma).

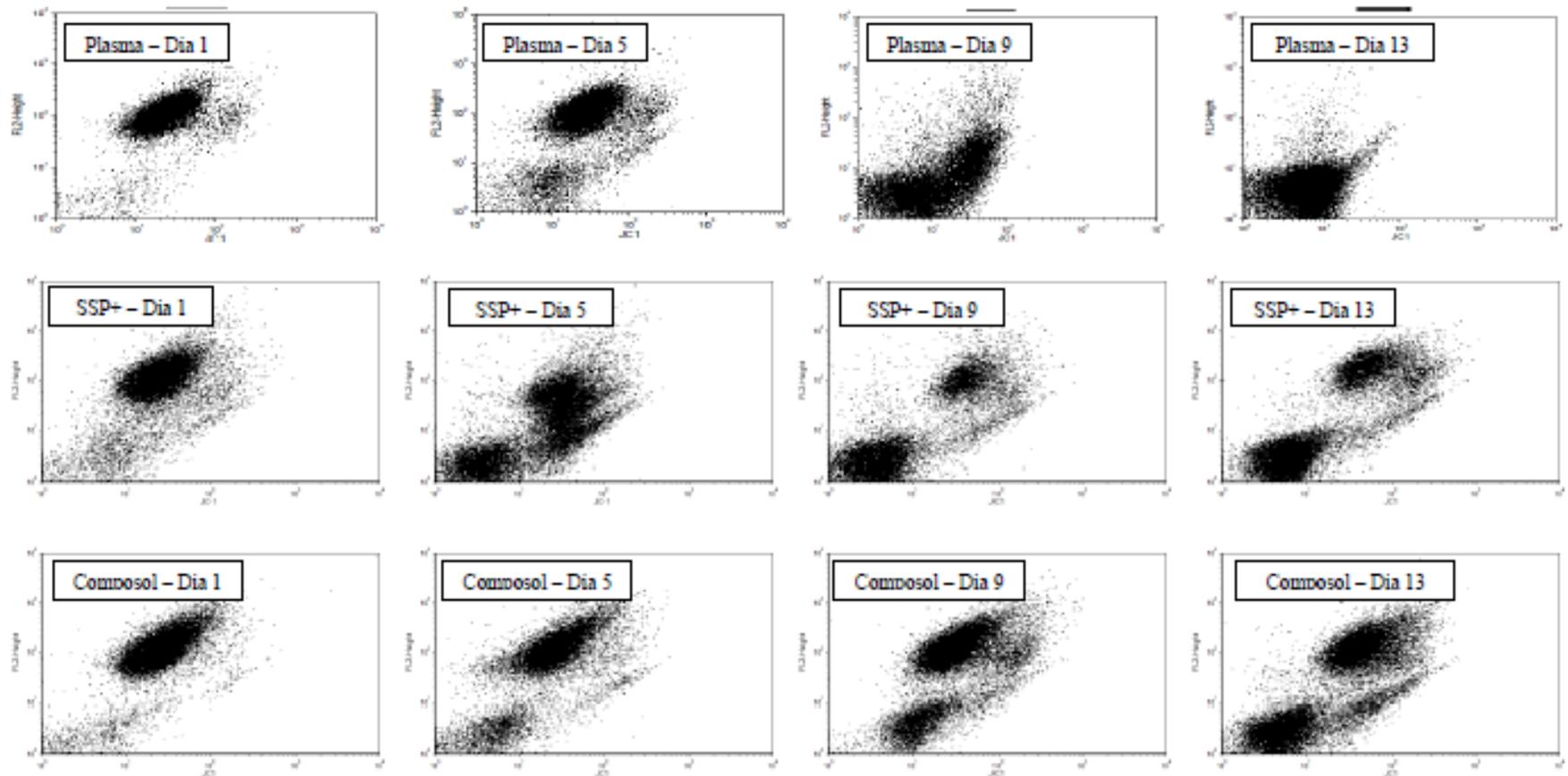


Figura 16. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, demonstrando a redução da marcação de JC-1 agregados (FL2) e aumento da marcação para JC-1 monômeros (FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Comsol) e no grupo controle (100% plasma). Observar o aumento de células não marcadas ao longo do tempo na região 10^1 .

Avaliação do potencial mitocondrial nas soluções aditivas utilizando duas técnicas (JC-1 vs. Mitotracker)

Optou-se por avaliar o potencial de membrana mitocondrial utilizando técnicas com as sondas fluorescentes JC1 e Mitotracker. A sonda fluorescente JC-1, é capaz de se acumular como agregados na membrana mitocondrial de plaquetas viáveis emitindo fluorescência vermelha (FL2). Em plaquetas danificadas e com baixo potencial de membrana mitocondrial, o JC1 permanece na forma de monômeros emitindo fluorescência verde (FL1). O MitoTracker, é uma sonda fluorescente que avalia o potencial de membrana e a massa mitocondrial. Plaquetas danificadas diminuem o potencial de membrana mitocondrial (diminuição da fluorescência vermelha – FL2) e aumentam o tamanho das mitocôndrias por edema ou *swelling* (aumento da fluorescência verde – FL1). Muitos estudos indicam que o estresse oxidativo induz a disfunção mitocondrial liberando espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, e que causam apoptose celular. Por isso, considera-se que a disfunção mitocondrial é um mecanismo importante relacionado com a lesão de estoque plaquetário (Dekkers et al., 2007; Devine e Serrano, 2010; Eder e Moroff, 2010; Hayashi et al., 2011).

Nenhum outro estudo avaliou JC-1 em CP canino, entretanto, os resultados aqui apresentados estão em conformidade com as pesquisas realizadas com SSP+ em CP humanos (Saunders *et al.*, 2011). Cookson et al (2010) avaliou Composol em CP humanos, observando marcadores de apoptose por 12 dias de estoque. Os resultados demonstraram aumento do deslocamento de fluorescência para FL1 (JC-1 monômero), ou diminuição da marcação de FL2 (JC-1 agregados) a partir do 9º dia, sendo esta mais expressiva no CP 100% plasma e estão de acordo com os resultados deste trabalho. Além destes dois estudos relatados em humanos, a avaliação de potencial mitocondrial é mais utilizada quando objetiva-se avaliar mecanismos apoptóticos, interferência da mitocôndria no tempo de estoque ou em períodos onde o CP não é mantido em agitação constante. Existem poucos estudos, no mesmo modelo deste experimento, que relacionam a função mitocondrial e a viabilidade com uso de SAP (Skripchenko *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011).

Ao avaliar o JC-1 monômero (FL1); que representa mitocôndrias sem potencial de membrana, ou aquelas que possivelmente estão em processo apoptótico; notou-se um aumento do percentual de marcação ao longo do tempo de armazenamento (p= 0,001),

mas a diferença não é significativa entre os dias 5, 9 e 13, e também não há diferença entre os tratamentos ($p= 0,110$) (Tabela 7, Figura 8, 15 e 16). Observa-se correlação positiva com lactato, pO_2 , MPV, PDW, LDH; e correlação negativa com pH, HCO_3 , ATP, pCO_2 , JC-1 e Mitotracker Red (Tabela 13).

Tabela 13. Correlação de Pearson entre as principais características metabólicas dos concentrados de plaquetas armazenados em plasma e solução aditiva por 13 dias em relação aos testes de viabilidade mitocondrial JC-1 e Mitotracker.

Correlações	JC-1 agregado (FL2)	JC-1 monômero (FL1)	Mito Red (FL3)	Mito Green (FL1)
Glicose	,284**	-,183	,334**	-,309**
Lactato	-,800**	,553**	-,703**	,690**
pH	,660**	-,429**	,626**	-,526**
HCO_3	,604**	-,398**	,537**	-,486**
ATP	,350**	-,185**	,301**	-,208**
pO_2	-,602**	,317**	-,534**	,436**
pCO_2	,708**	-,432**	,620**	-,547**
MPV	-,440**	,273**	-,414**	,459**
PDW	-,550**	,353**	-,487**	,546**
JC-1 agregado (FL2)	-	-,581**	,846**	-,774**
JC-1 monômero (FL1)	-,581**	-	-,461**	,497**
Cels não marcadas (JC-1)	-,808**	-,011	-,705**	,591**
Mito Red (FL3)	,846**	-,461**	-	-,864**
Mito Green (FL1)	-,774**	,497**	-,864**	-
Cels não marcadas (Mito)	-,346**	0,06	-,497**	-,007
LDH	-,392**	,224**	-,443**	,399**

* Correlação com nível de significância $p < 0,05$; ** Correlação com nível de significância $p < 0,01$.

Em relação a avaliação das sondas Mitotracker, o Mitotracker Red demonstrou um deslocamento de fluorescência para FL1 (Mitotracker Green), ou redução da marcação de Mitotracker Red, ao longo do tempo de armazenamento ($p= 0,001$), sem diferença significativa entre os dias 9 e 13 ($p= 0,278$). No último dia de avaliação há uma brusca redução do percentual de marcação do CP 100% plasma, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p= 0,800$) (Tabela 7, Figura 14). Observou-se correlação positiva com glicose, pH, HCO_3 , ATP, pCO_2 e JC-1 agregado (FL2); e correlação negativa com lactato, pO_2 , MPV, PDW, LDH, Mitotacker Green e JC-1 monômero (FL1). As correlações se espelham as de JC-1 agregado (FL2), demonstrando concordâncias entre as técnicas (Tabela 13).

Em relação ao Mitotracker Green, que representa massa ou volume mitocondrial, há um aumento do percentual de marcação ao longo do tempo de armazenamento ($p= 0,001$), sem diferença significativa entre os dias 9 e 13 ($p=0,919$). Também não houve diferença entre as SAP ($p= 0,733$) (Figura 17 e 18). As correlações se espelham as de JC-1 monômero (FL1), havendo também correlação negativa com os valores de glicose (Tabela 13).

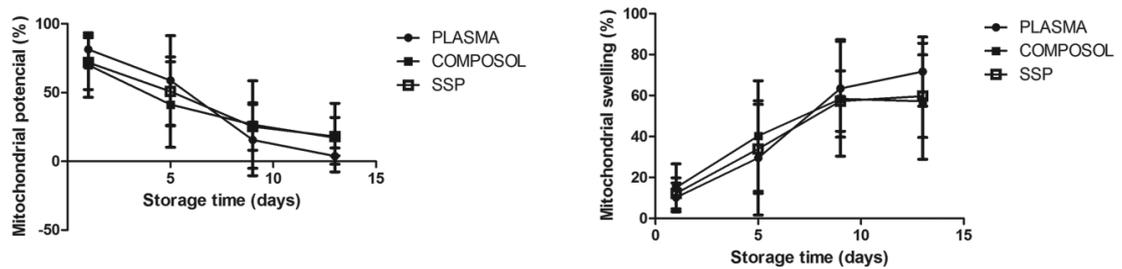


Figura 17. Gráfico de regressão linear demonstrando a redução da marcação de Mitotracker Red (Potencial mitocondrial, FL3) e aumento da marcação de Mitotracker Green (Swelling mitocondrial, FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Composol) e no grupo controle (100% plasma).

Em relação ao percentual de marcação, as técnicas divergem entre si. O Mitotracker Green marca um volume/percentual superior de organelas em comparação as marcadas pelo JC-1 monômero (JC-1 FL1). A técnica Mitotracker Green representa uma população mitocôndrias em que há perda de potencial, mas a massa se mantém, mesmo que não sejam totalmente funcionais (presença de *swelling* mitocondrial), ainda não ocorreu mitofagia ou apoptose (Puleston, 2015). Essas mitocôndrias em *swelling* exercem influência sobre o metabolismo *in vitro*, e colaboram com a manutenção da viabilidade. Este fato corrobora outros dados obtidos sobre o metabolismo, que atestam que nas SAP há viabilidade até o nono dia de armazenamento.

Destaca-se que houve um aumento do percentual de células não marcadas ao longo do tempo de estoque: Dia 1: 8,45%, Dia 5: 27,38% e Dia 13: 48,48% na técnica JC-1; Dia 1: 13,06%, Dia 5: 15,17% e Dia 13: 24,13% na técnica Mitotracker. Esta população de células refere-se a possíveis micropartículas e/ou fragmentos celulares, que devido ao tamanho reduzido não são marcadas pelos corantes. Houve uma correlação positiva entre as células não marcadas na técnica de JC-1 com PDW ($r=$

0,424; $p < 0,05$) e MPV ($r = 0,346$; $p < 0,05$) reforçando os achados descritos anteriormente onde o comportamento destes últimos parâmetros está associado com dupla população plaquetária.

Os resultados permitem sugerir o uso do Mitotracker para avaliação de SAP, pois a técnica parece trazer mais informações e correlaciona-se melhor com os parâmetros tradicionalmente utilizados para avaliar lesão de estoque plaquetário.

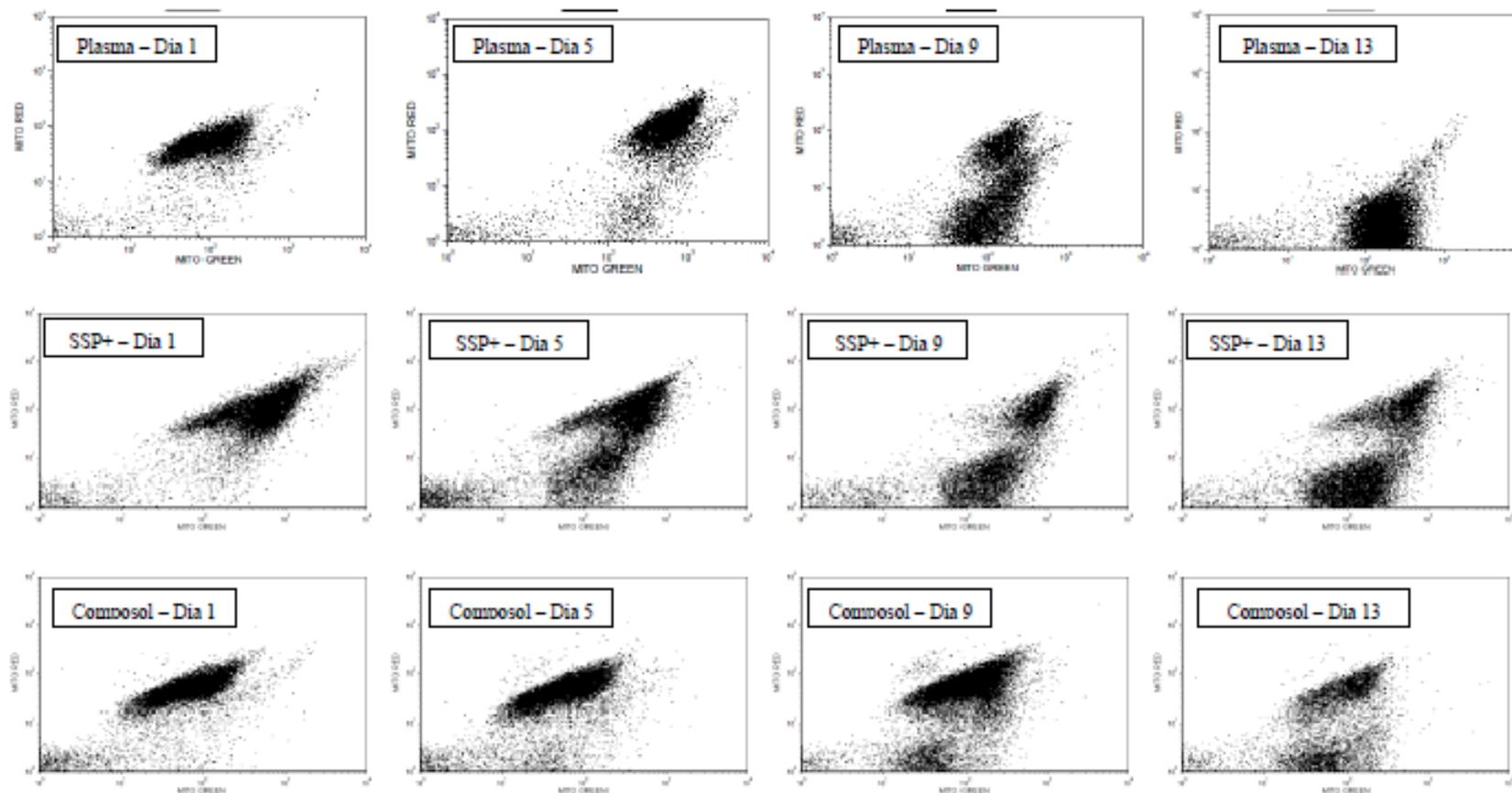


Figura 18. Gráfico de dispersão, de uma amostra de cada tratamento, demonstrando a redução da marcação de Mitoracker Red (FL3) e aumento da marcação de Mitotracker Green (FL1) ao longo dos 13 dias de estoque nas duas SAP (SSP+ e Comsol) e no grupo controle (100% plasma)

5. CONCLUSÃO

Em relação às soluções aditivas avaliadas, os resultados deste estudo sugerem que o metabolismo plaquetário se mantém adequado por período mais prolongado quando há armazenamento em solução aditiva. Pode-se recomendar o uso de CP em SSP+ por até 13 dias de armazenamento e de Composol por até 9 dias de armazenamento. Essa última não manteve o pH dentro dos valores recomendados no dia 13, portanto pode não ser adequada para transfusão se mantida por mais de 9 dias armazenada. Os resultados de lactato, LDH e glicose das bolsas armazenadas em plasma enfatizam o metabolismo anaeróbico acentuado resultando em acidose do meio e lesão de estoque plaquetário. A exaustão da glicose nas bolsas do grupo controle, pode levar a aceleração da deterioração da viabilidade plaquetária, que reflete na redução do pH e *swirling*. Ainda, o aumento da expressão de fosfatidilserina associado à redução do potencial mitocondrial remetem a apoptose.

As bolsas armazenadas em plasma apresentaram pH abaixo do desejável no dia 5 de armazenamento. Estes dados estão de acordo com os reportados na literatura para CPs humanos armazenados em solução aditiva.

Este é o primeiro estudo que avalia a viabilidade em CP com SAP obtidos pelo método de PRP. Quando estes mesmos testes são realizados em CP humanos obtidos pelas técnicas de BC e aférese os resultados seguem o mesmo padrão, sugerindo que o CP canino pode ser usado como modelo para estudos de lesão plaquetária de estoque.

Considerações futuras

Estudos *in vivo* devem ser realizados a fim de avaliar a viabilidade e manutenção do metabolismo plaquetário, antes que estas soluções sejam utilizadas em bancos de sangue veterinários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS-OGG, A. C. Triggers for prophylactic use of platelet transfusions and optimal platelet dosing in thrombocytopenic dogs and cats. n. 0195-5616 (Print), 20031210 DCOM-20040113
- 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).
- ALHUMAIDAN, H.; SWEENEY, J. Current status of additive solutions for platelets. **Journal of Clinical Apheresis**, v. 27, n. 2, p. 93-98, 2012. ISSN 1098-1101. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jca.21207> >.
- ALLYSON, K.; ABRAMS-OGG, A. C.; JOHNSTONE, I. B. Room temperature storage and cryopreservation of canine platelet concentrates. **Am J Vet Res**, v. 58, n. 11, p. 1338-47, Nov 1997. ISSN 0002-9645 (Print)0002-9645.
- 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> >.
- 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 Nº 34**. ANVISA. Diário Oficial da União, 11 DE JUNHO DE 2014: Brasil. RDC Nº 34: 39 p. 2014a.
- _____. **Ensaio para bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano e seus componentes. RDC Nº 35**. ANVISA. Diário Oficial da União, 12 de Junho de 2014: Brasil. RDC Nº 35: 22 p. 2014b.
- APPLEMAN, E. H. et al. Cryopreservation of canine platelets. **J Vet Intern Med**, v. 23, n. 1, p. 138-45, 2009 Jan-Feb 2009. ISSN 0891-6640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175732> >.
- AUBUCHON, J. P. Evolution to the 21st Century. In: HILLYER, C. D.; SILBERSTEIN, L. E., et al (Ed.). **Blood Banking and Transfusion Medicine**. 1ª. E.U.A.: Churchill Livingstone (Elsevier Science), v.1, 2003. cap. 1, p.3-7.
- AUBUCHON, J. P.; CUSTER, B.; SHER, G. A comparison of health care and blood supply system structures. **Vox Sanguinis**, v. 100, n. 1, p. 22-35, 2011. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01425.x> >.
- BALOG, K. et al. A prospective randomized clinical trial of vincristine versus human intravenous immunoglobulin for acute adjunctive management of presumptive primary immune-mediated thrombocytopenia in dogs. **J Vet Intern Med**, v. 27, n. 3, p. 536-41, 2013 May-Jun 2013. ISSN 1939-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527952> >.
- BAUMGARTEN, A. et al. Changes of platelet function and blood coagulation during short-term storage of CPDA-1-stabilised ovine blood. **Res Vet Sci**, v. 91, n. 1, p. 150-8, Aug 2011. ISSN 1532-2661. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888020> >.

BLAJCHMAN, M. A. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. n. 1538-7933 (Print), 20030721 DCOM- 20030926

_____. Novel platelet products, substitutes and alternatives. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 8, n. 3, p. 267-271, 6// 2001. ISSN 1246-7820. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1246782001001276> >.

BOUDREAUX, M. K. Inherited intrinsic platelet disorders. In: WEISS, D. J. e WARDROP, K. J. (Ed.). **Shalm's: Veterinary Hematology**. 6ª. 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**. 6ª. 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**. 6ª. Iowa:EUA: Blackwell Publishing Ltd, 2010. cap. 76, p.569 - 575. (Platelets).

BREWER, D. B. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. **Br J Haematol**, v. 133, n. 3, p. 251-8, May 2006. ISSN 0007-1048. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16643426> >.

BUCKLEY, G. J.; AKTAY, S. A.; ROZANSKI, E. A. Massive transfusion and surgical management of iatrogenic aortic laceration associated with cystocentesis in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 235, n. 3, p. 288-91, Aug 2009. ISSN 0003-1488. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19650700> >.

BÜCHELER, J.; COTTER, S. M. Outpatient blood donor program. **Probl Vet Med**, v. 4, n. 4, p. 572-81, Dec 1992. ISSN 1041-0228. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1472768> >.

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> >.

CALLAN, M. B. et al. Clinical and clinicopathologic effects of plateletpheresis on healthy donor dogs. **Transfusion**, v. 48, n. 10, p. 2214-21, Oct 2008. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18564392> >.

CAPOCELLI, K. E.; DUMONT, L. J. Novel platelet storage conditions: additive solutions, gas, and cold. **Curr Opin Hematol**, v. 21, n. 6, p. 491-6, Nov 2014. ISSN 1531-7048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144411> >.

CARDIGAN, R.; TURNER, C.; HARRISON, P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. **Vox Sang**, v. 88, n. 3, p. 153-63, Apr 2005. ISSN 0042-9007 (Print)0042-9007.

CARMEN, R. The selection of plastic materials for blood bags. **Transfus Med Rev**, v. 7, n. 1, p. 1-10, Jan 1993. ISSN 0887-7963. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8431654> >.

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

CHANG, Y. et al. From hematopoietic stem cells to platelets. **J Thromb Haemost**, v. 5 Suppl 1, p. 318-27, Jul 2007. ISSN 1538-7933. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635743> >.

CHRISTOPHERSON, P. W.; SPANGLER, E. A.; BOUDREAUX, M. K. Evaluation and Clinical Application of Platelet Function Testing in Small Animal Practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 173-188, 1// 2012. ISSN 0195-5616. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561611001732> >.

- CIARAMELLA, P. et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet J**, v. 169, n. 3, p. 465-7, May 2005. ISSN 1090-0233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848791> >.
- CID, J. et al. Automated preparation of whole blood-derived platelets suspended in two different platelet additive solutions and stored for 7 days. **Transfusion**, v. 54, n. 2, p. 426-33, Feb 2014. ISSN 0041-1132.
- COLLER, B. S. Bizzozero and the discovery of the blood platelet. **Lancet**, v. 1, n. 8380, p. 804, Apr 1984. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6143133> >.
- COLLINS, G.; MURPHY, M. F.; STANWORTH, S. J. Current controversies about the indications for platelet transfusion with a focus on patients with hematological malignancies. **Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine**, v. 8, n. 2, p. 86-94, 2006. ISSN 1778-428X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1778-428X.2006.2006.00016.x> >.
- 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> >.
- 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.
- CRAWFORD, K. et al. Infectious agent screening in canine blood donors in the United Kingdom. **J Small Anim Pract**, v. 54, n. 8, p. 414-7, Aug 2013. ISSN 1748-5827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23879829> >.
- 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)0041-1132.
- 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> >.
- DE A LUCIDI, C. et al. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. **Vet Clin Pathol**, v. 40, n. 4, p. 435-43, Dec 2011. ISSN 1939-165X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136477> >.
- 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> >.
- DIEDRICH, B. et al. In vitro and in vivo effects of potassium and magnesium on storage up to 7 days of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution. **Vox Sanguinis**, v. 94, n. 2,

p. 96-102, 2008. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.01002.x> >.

DIJKSTRA-TIEKSTRA, M. J.; PIETERSZ, R. N.; HUIJGENS, P. C. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and in vitro and in vivo parameters. **Vox Sang**, v. 87, n. 4, p. 257-63, Nov 2004. ISSN 0042-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585021> >.

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)1660-3796.

DUMONT, L. J. et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. **Transfusion**, v. 42, n. 7, p. 847-54, Jul 2002. ISSN 0041-1132 (Print)0041-1132.

_____. In vitro and in vivo quality of leukoreduced apheresis platelets stored in a new platelet additive solution. **Transfusion**, v. 53, n. 5, p. 972-80, May 2013. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882530> >.

_____. 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)0041-1132.

DUMONT, L. J.; VANDENBROEKE, T. Seven-day storage of apheresis platelets: report of an in vitro study. **Transfusion**, v. 43, n. 2, p. 143-150, 2003. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00286.x> >.

EDER, A. F.; MOROFF, G. Platelet storage and adverse transfusion outcomes: old platelets? **Transfusion**, v. 50, n. 11, p. 2288-2291, 2010. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02901.x> >.

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> >.

ENRIGHT, H. et al. Factors influencing moderate to severe reactions to PLT transfusions: experience of the TRAP multicenter clinical trial. **Transfusion**, v. 43, n. 11, p. 1545-52, Nov 2003. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617313> >.

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.

Evaluation of stored platelets. **Vox Sang**, v. 86, n. 3, p. 203-23, Apr 2004. ISSN 0042-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078259> >.

FRANCO, A. T.; CORKEN, A.; WARE, J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. **Blood**, v. 126, n. 5, p. 582-8, Jul 2015. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26109205> >.

GEORGE, J. N. Platelets. **Lancet**, v. 355, n. 9214, p. 1531-9, Apr 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801186> >.

GIBSON, G.; ABRAMS-OGG, A. Canine transfusion medicine. In: DAY, M. J. e KOHN, B. (Ed.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**. 2. Gloucester, Reino Unido: BSAVA, 2012. cap. 34, p.289 - 307. (Transfusion Medicine).

GODIER, A.; SAMAMA, C. M.; SUSEN, S. [Management of massive bleeding in 2013: seven questions and answers]. **Transfus Clin Biol**, v. 20, n. 2, p. 55-8, May 2013. ISSN 1953-8022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23587620> >.

GONÇALVES, S. **Padronização do fracionamento do sangue total em cães - Comunicado**. In: ANCLIVEPA, A. D. X. C. B. D., XXVI Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2005, Salvador - BA.

_____. **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.

GRAVEMANN, U. et al. In vitro variables of buffy coat-derived platelet concentrates with residual plasma of down to 10% are stably maintained in new-generation platelet additive solutions. **Transfusion**, v. 55, n. 7, p. 1700-9, Jul 2015. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677807> >.

GRECO, C. A. et al. Effect of platelet additive solution on bacterial dynamics and their influence on platelet quality in stored platelet concentrates. **Transfusion**, v. 50, n. 11, p. 2344-2352, 2010. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02726.x> >.

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> >.

_____. Platelet storage media. **Vox Sang**, v. 107, n. 3, p. 205-12, Oct 2014. ISSN 0042-9007.

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> >.

GUPPY, M. et al. The Pasteur effect in human platelets: implications for storage and metabolic control. **Br J Haematol**, v. 91, n. 3, p. 752-7, Nov 1995. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555088> >.

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> >.

HARTWIG, J. H. The platelet: form and function. **Semin Hematol**, v. 43, n. 1 Suppl 1, p. S94-100, Jan 2006. ISSN 0037-1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427392> >.

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> >.

HEATON, W. A. Costs and benefits of PAS platelets: a mix of science, quality, and value. **Transfusion**, v. 53, n. 11, p. 2597-602, Nov 2013. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24580646> >.

HELMOND, S. E.; CATALFAMO, J. L.; BROOKS, M. B. Flow cytometric detection and procoagulant activity of circulating canine platelet-derived microparticles. **Am J Vet Res**, v. 74, n. 2, p. 207-15, Feb 2013. ISSN 0002-9645.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048727> >.

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 1939-165X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267468> >.

- 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)0041-1132.
- JACKSON, S. P. The growing complexity of platelet aggregation. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5087-95, Jun 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971.
- JAEGER, R. J.; RUBIN, R. J. Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. **N Engl J Med**, v. 287, n. 22, p. 1114-8, Nov 1972. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5082191> >.
- 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> >.
- 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.
- JUTKOWITZ, L. A. et al. Massive transfusion in dogs: 15 cases (1997-2001). **J Am Vet Med Assoc**, v. 220, n. 11, p. 1664-9, Jun 2002. ISSN 0003-1488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051507> >.
- KAUFMAN, R. M. 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 2015. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383671> >.
- KICKLER, T. S. Platelet biology – an overview. **Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine**, v. 2, p. 79 - 85, 2006.
- KINGSTON JK FAU - BAYLY, W. M. et al. Effects of formaldehyde fixation on equine platelets using flow cytometric methods to evaluate markers of platelet activation. n. 0002-9645 (Print), 20020613 DCOM- 20021211
- _____. Measurement of the activation of equine platelets by use of fluorescent-labeled annexin V, anti-human fibrinogen antibody, and anti-human thrombospondin antibody. n. 0002-9645 (Print), 20020409 DCOM- 20021021
- KISIELEWICZ, C.; SELF, I.; BELL, R. Assessment of Clinical and Laboratory Variables as a Guide to Packed Red Blood Cell Transfusion of Euvoletic Anemic Dogs. **J Vet Intern Med**, Jan 2014. ISSN 1939-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24417587> >.
- KISIELEWICZ, C.; SELF, I. A. Canine and feline blood transfusions: controversies and recent advances in administration practices. **Vet Anaesth Analg**, v. 41, n. 3, p. 233-42, May 2014. ISSN 1467-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24576208> >.
- 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)0005-9366.
- KOHN, B.; CLASSE, G.; WEINGART, C. Clinical evaluation of the QuickVet/RapidVet canine dog erythrocyte antigen 1.1 blood-typing test. **J Vet Diagn Invest**, v. 24, n. 3, p. 539-45, May 2012. ISSN 1943-4936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529121> >.
- KRAILADSIRI, P.; SEGATCHIAN, J.; WILLIAMSON, LORNA M. Platelet storage lesion of WBC-reduced, pooled, buffy coat-derived platelet concentrates prepared in three in-process

filter/storage bag combinations. **Transfusion**, v. 41, n. 2, p. 243-250, 2001. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.2001.41020243.x> >.

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 1939-165X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25135622> >.

_____. 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.

LAGERBERG, J. W. et al. In vitro evaluation of the quality of blood products collected and stored in systems completely free of di(2-ethylhexyl)phthalate-plasticized materials. **Transfusion**, v. 55, n. 3, p. 522-31, Mar 2015. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25331824> >.

LANEVSKI, A.; WARDROP, K. J. Principles of transfusion medicine in small animals. **Can Vet J**, v. 42, n. 6, p. 447-54, Jun 2001. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424576> >.

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)0041-1132.

_____. 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) 0007-1048 (Linking).

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> >.

LYNCH, A. M.; O'TOOLE, T. E.; HAMILTON, J. Transfusion practices for treatment of dogs undergoing splenectomy for splenic masses: 542 cases (2001-2012). **J Am Vet Med Assoc**, v. 247, n. 6, p. 636-42, Sep 2015. ISSN 1943-569X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331422> >.

MAJOY, S. B. et al. Platelet activation in a population of critically ill dogs as measured with whole blood flow cytometry and thromboelastography. **Am J Vet Res**, v. 76, n. 4, p. 328-37, Apr 2015. ISSN 0002-9645.

MALINI, E. et al. Role of LIMP-2 in the intracellular trafficking of β -glucosidase in different human cellular models. **FASEB J**, v. 29, n. 9, p. 3839-52, Sep 2015. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018676> >.

MARTÍN VILLAR, J. [Efforts achieved in the past (hemotherapy)]. **Sangre (Barc)**, v. 25, n. 5C, p. 930-46, 1980. ISSN 0036-4355. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7013118> >.

MCNICOL, A.; ISRAELS, S. J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. **Thromb Res**, v. 95, n. 1, p. 1-18, Jul 1999. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403682> >.

METZELAAR, M. J.; CLEVERS, H. C. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. **Thromb Haemost**, v. 68, n. 4, p. 378-82, Oct 1992. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1448767> >.

- 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)0041-1132.
- MOBARREZ, F. et al. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. **Thromb Res**, v. 125, n. 3, p. e110-6, Mar 2010. ISSN 0049-3848.
- MORITZ, A.; WALCHECK, B. K.; WEISS, D. J. Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. **Vet Clin Pathol**, v. 32, n. 1, p. 6-12, 2003. ISSN 0275-6382 (Print) 0275-6382.
- MURPHY, M. F. et al. Transfusing blood safely and appropriately. **BMJ**, v. 347, p. f4303, 2013. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861410> >.
- MURPHY, S. Utility of in vitro tests in predicting the in vivo viability of stored PLTs. In: (Ed.). **Transfusion**. United States, v.44, 2004. p.618-9; author reply 619. ISBN 0041-1132 (Print)0041-1132 (Linking).
- 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> >.
- PEREIMA, R. S. et al. [Blood donation: mechanic solidarity versus organic solidarity]. **Rev Bras Enferm**, v. 63, n. 2, p. 322-7, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 0034-7167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20521008> >.
- 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)0041-1132.
- PROWSE, C. V. et al. Commercially available blood storage containers. **Vox Sang**, v. 106, n. 1, p. 1-13, Jan 2014. ISSN 0042-9007.
- 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26330624> >.
- REICHMANN, P.; DEARO, A. C. O. **Blood and blood component transfusion in large animals**. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, Brazil: Universidade Estadual de Londrina. 22: 223-228 p. 2001.
- REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 19, n. 2, p. 68-74, May 2004. ISSN 1096-2867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179926> >.
- RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, v. 12, n. 5, p. 261-73, Aug 2001. ISSN 0953-7104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487378> >.
- RENTKO, V. Blood substitutes. In: DAY, M. J. e KOHN, B. (Ed.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**. 2. Gloucester, Reino Unido: BSAVA, 2012. cap. 36, p.319 - 323. (Transfusion Medicine).
- 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> >.

ROZANSKI, E.; DE LAFORCADE, A. M. Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 19, n. 2, p. 83-7, May 2004. ISSN 1096-2867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179928> >.

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).

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>>.

_____. In vitro storage characteristics of platelet concentrates suspended in 70% SSP+(TM) additive solution versus plasma over a 14-day storage period. **Vox Sang**, v. 101, n. 2, p. 112-21, Aug 2011. ISSN 1423-0410. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21414010>>.

SCHMIDT, P. J. Transfusion Medicine History Illustrated. The hemotherapy of the barber surgeon. **Transfusion**, v. 46, n. 2, p. 165, Feb 2006. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441588> >.

SCHMIDT, P. J.; NESS, P. M. Hemotherapy: from bloodletting magic to transfusion medicine. **Transfusion**, v. 46, n. 2, p. 166-8, Feb 2006. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441589> >.

SCOTT, K. L.; LECAK, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfus Med Rev**, v. 19, n. 2, p. 127-42, Apr 2005. ISSN 0887-7963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15852241> >.

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

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 1563-5279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138397> >.

SILVA, P. S.; NOGUEIRA, V. O. Hemoterapia: as dificuldades encontradas pelos enfermeiros. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 2, p. 329 - 334, 2007.

SIMMCHEN, J.; VENTURA, R.; SEGURA, J. Progress in the Removal of Di-[2-Ethylhexyl]-Phthalate as Plasticizer in Blood Bags. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 26, n. 1, p. 27-37, 1// 2012. ISSN 0887-7963. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796311000563> >.

SINGH, H.; CHAUDHARY, R.; RAY, V. Evaluation of platelet storage lesions in platelet concentrates stored for seven days. **Indian J Med Res**, v. 118, p. 243-6, Dec 2003a. ISSN 0971-5916 (Print)0971-5916.

_____. Platelet indices as quality markers of platelet concentrates during storage. **Clin Lab Haematol**, v. 25, n. 5, p. 307-10, Oct 2003b. ISSN 0141-9854 (Print)0141-9854.

SINGH, R. P. et al. Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. **Asian J Transfus Sci**, v. 3, n. 2, p. 86-94, Jul 2009. ISSN 1998-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808653> >.

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. et al. Exploratory studies of extended storage of apheresis platelets in a platelet additive solution (PAS). **Blood**, v. 123, n. 2, p. 271-80, Jan 2014. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24258816> >.

SOUZA, R. S. et al. **Storage lesions caused during blood conservation in the different species: Review.** *Acta Veterinaria Brasilica*. Brasília: UFRSA. 6: 68-79 p. 2012.

SPURLOCK, N. K.; PRITTIE, J. E. A review of current indications, adverse effects, and administration recommendations for intravenous immunoglobulin. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, v. 21, n. 5, p. 471-83, Oct 2011. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22316195> >.

STRONCEK, D. F.; REBULLA, P. Platelet transfusions. **The Lancet**, v. 370, n. 9585, p. 427-438, // ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607611982> >. Acesso em: 2007/8/10/.

SWEENEY, J. et al. Storage of platelet-rich plasma-derived platelet concentrate pools in plasma and additive solution. **Transfusion**, v. 46, n. 5, p. 835-40, May 2006. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16686852> >.

TAL, M. C. et al. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 8, p. 2770-5, Feb 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196953> >.

THOMOVSKY, E. J.; BACH, J. Incidence of acute lung injury in dogs receiving transfusions. **J Am Vet Med Assoc**, v. 244, n. 2, p. 170-4, Jan 2014. ISSN 1943-569X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378025> >.

TOCCI, L. J.; EWING, P. J. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, v. 19, n. 1, p. 66-73, Feb 2009. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691586> >.

TONG, S. et al. Accumulation of CD62P during storage of apheresis platelet concentrates and the role of CD62P in transfusion-related acute lung injury. **Mol Med Rep**, Sep 22 2015. ISSN 1791-2997.

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> >.

TYNNGÅRD, N.; TRINKS, M.; BERLIN, G. Platelet quality after washing: the effect of storage time before washing. **Transfusion**, v. 50, n. 12, p. 2745-52, Dec 2010. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576018> >.

_____. In vitro properties of platelets stored in three different additive solutions. **Transfusion**, v. 52, n. 5, p. 1003-1009, 2012. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03417.x> >.

ULATA, S. K. Causas mais comuns de perda de bolsa de sangue total e de hemocomponentes encontradas durante a fase de implantação do banco de sangue - HOVET – USP (2003-2004). **In: ANCLIVEPA, A. D. X. C. B. D., XXVI Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2005, Salvador - BA.**

UMEKI, S. et al. Characterization of monoclonal antibodies against canine P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 142, n. 1-2, p. 119-25, Jul 2011. ISSN 1873-2534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600666> >.

- VAN DER MEER, P. F. Platelet additive solutions: A future perspective. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 14, n. 6, p. 522-525, 12// 2007. ISSN 1246-7820. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1246782008000451> >.
- VAN DER MEER, P. F. et al. Volume-reduced platelet concentrates: optimization of production and storage conditions. **Transfusion**, v. 52, n. 4, p. 819-27, Apr 2012. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21981439> >.
- 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.; PIETERSZ, R. N.; REESINK, H. W. Storage of platelets in additive solution for up to 12 days with maintenance of good in-vitro quality. **Transfusion**, v. 44, n. 8, p. 1204-11, Aug 2004. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265125> >.
- VAN DER MEER, P. F.; PIETERSZ, R. N. I.; REESINK, H. W. Comparison of two platelet additive solutions. **Transfusion Medicine**, v. 11, n. 3, p. 193-197, 2001. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00304.x> >.
- _____. Storage of platelets in additive solution for up to 12 days with maintenance of good in-vitro quality. **Transfusion**, v. 44, n. 8, p. 1204-1211, 2004. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.04010.x> >.
- VASSALLO, R. R. et al. In vitro and in vivo evaluation of apheresis platelets stored for 5 days in 65% platelet additive solution/35% plasma. **Transfusion**, v. 50, n. 11, p. 2376-85, Nov 2010. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497516> >.
- VIANA, S. S. **Uso da hemoterapia em cães e relato de quatro casos na cidade de Manaus, AM**. 2011. 33 (Graduação). Curso de Medicina Veterinária, Escola Superior Baptista do Amazonas, Manaus.
- VO, T. D. et al. Platelet washing to prevent recurrent febrile reactions to leucocyte-reduced transfusions. **Transfus Med**, v. 11, n. 1, p. 45-7, Feb 2001. ISSN 0958-7578. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328571> >.
- 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> >.
- WHITE, C.; HOHENHAUS, A. Immune-mediated thrombocytopenia. In: DAY, M. J. e KOHN, B. (Ed.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Transfusion Medicine**. 2. Gloucester, Reino Unido: BSAVA, 2012. cap. 26, p.237 - 245. (Disorders of haemostasis - selected topics).
- 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.
- XIONG, Q. et al. Ehrlichia ewingii infection delays spontaneous neutrophil apoptosis through stabilization of mitochondria. **J Infect Dis**, v. 197, n. 8, p. 1110-8, Apr 2008. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462160> >.

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)0305-0491.

ZAMBELLI, A. B.; LEISEWITZ, A. L. A prospective, randomized comparison of Oxyglobin (HB-200) and packed red blood cell transfusion for canine babesiosis. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, v. 19, n. 1, p. 102-12, Feb 2009. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691591> >.

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> >.

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: _____

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 a água potável fresca. Seu animal deve beber aproximadamente 4 xícaras de água adicionais após a doação. Permita que ele tenha acesso a 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. Esta prática 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.
- Todo doador tem direito a consulta gratuita no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS até 6 meses após a última doação (guarde com cuidado sua carteirinha de doador).

Obrigado por permitir que seu animal participe do nosso projeto.

Eu _____, responsável pelo cão doador _____, estou ciente e concordo com todo o processo que envolve a doação de sangue em cães e o projeto de pesquisa ao qual estou envolvido.

Assinatura: _____

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: _____