

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS SOBRE A FUNÇÃO
PLAQUETÁRIA E A EXPRESSÃO DA GPIIbIIIa EM CONCENTRADOS DE
PLAQUETAS CANINOS ESTOCADOS**

CARLA CRISTINA MACHADO RIANI COSTA

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^a Adj. Regina Kiomi Takahira

Nome do Autor: Carla Cristina Machado Riani Costa

Título: INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS SOBRE A FUNÇÃO PLAQUETÁRIA E A EXPRESSÃO DA GPIIbIIIa EM CONCENTRADOS DE PLAQUETAS CANINOS ESTOCADOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Adjunta Regina Kiomi Takahira

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professor Adjunto Raimundo de Sousa Lopes

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Professora Adjunta Patrícia Mendes Pereira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

Universidade Federal de Londrina - UEL

Data da Defesa: 17 de março de 2011.

Dedicatória**A Deus,**

Pela minha vida, minha profissão, minha saúde.
Obrigada por ter colocado na minha vida pessoas tão especiais.

Ao meu querido Hugo,

Meu eterno amor, confidente e amigo.
Obrigada por todo o carinho, companheirismo e ajuda, sempre!
Você também é a minha vida, minha felicidade.
Te amo!

Aos meus queridos pais, Leonor e Jesus,

Obrigada por tudo, por serem meus exemplos de vida e inspiração.
Saudades eterna...
Amo vocês!

Aos queridos José Luiz, Amarilis, Melissa,**Larissa, Luiz Augusto e José Felipe,**

Agradeço a Deus por ter me presenteado com pessoas tão maravilhosas! Obrigada por
estarem sempre presentes!
Adoro vocês!

À querida Regina,

Minha professora, mentora, madrinha e amiga.
Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos e palavras carinhosas.
Sem você não teria realizado importantes etapas da minha vida.
Obrigada por tudo!

Agradecimentos

Ao meu marido Hugo e à nossa família, Amarilis, José Luiz, Melissa, Larissa, Luiz Augusto e José Felipe.

À minha orientadora, Prof^a Adj. Regina Kiomi Takahira, por me apoiar sempre e ajudar em todos os momentos desta jornada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto de mestrado e auxílio.

Ao Prof^o Adj. Raimundo de Souza Lopes, pelos ensinamentos, apoio, amizade e por fazer parte da minha banca de mestrado.

À Prof^a Dr^a Patrícia Mendes, pelos ensinamentos e por fazer parte da minha banca de mestrado.

Aos professores da FMVZ – UNESP - Botucatu, em especial Michiko Sakate, Luiz Henrique Machado, Renée Laufer Amorim e Hélio Langoni.

Aos meus grandes amigos, em especial Marta, Carlos, Natache, Ariane, Camila, Felipe, Luis Fernando.

Aos residentes do Laboratório Clínico, Renata, Ana Lúcia, Thiago, Cláudia, Marina e Camila, por me ajudarem e apoiarem durante todo o meu mestrado.

Aos residentes da Clínica Médica de Pequenos Animais, Paulo, Luis Felipe, Kelly, Josyanne, Mateus, Alan, Mariana e Ana Rita, muito obrigada pela ajuda e compreensão.

Aos meus amigos pós-graduandos, em especial Lívia, Tatiana, Letícia, Yudney, Felipe.

Aos funcionários do Laboratório Clínico Veterinário, Márcio, Matiazi, Ison, e Solange.

Aos funcionários do setor de Pós-Graduação.

Ao Prof. Adj. Márcio Garcia Ribeiro e ao funcionário Fernando, pela realização dos exames microbiológicos.

À Marjorie A. Golim e a técnica Léia do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, que me ensinaram e auxiliaram nas análises da citometria de fluxo.

À Gislene e equipe do Hemocentro da FMB, que me ensinaram todas as técnicas necessárias para montar o banco de sangue veterinário e tornar este projeto possível.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Botucatu.

Agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente à execução deste trabalho.

Agradeço aos cães doadores de sangue e aos seus proprietários, por este gesto tão sublime de ajuda ao próximo.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Valores individuais do pH mensurados no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do grupo I.....	66
Quadro 2	Valores individuais do pH mensurados no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do grupo II.....	67
Quadro 3	Valores individuais e médias da glicose (mg/dL) no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do grupo I.....	68
Quadro 4	Valores individuais e médias da glicose (mg/dL) no momento controle (M0) e 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do grupo II.....	68
Quadro 5	Valores individuais e médias do <i>swirling</i> no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do grupo I (escala 0 a 3).....	69
Quadro 6	Valores individuais e médias do <i>swirling</i> no momento controle (M0) e 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do grupo II (escala 0 a 3).....	69
Quadro 7	Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD61, avaliadas no momento controle (M0) e 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do grupo I.....	70

Quadro 8	Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD61, avaliadas no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do grupo II.....	70
Quadro 9	Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD41, avaliadas no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do grupo I.....	71
Quadro 10	Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD41, avaliadas no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do grupo II.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação dos parâmetros de qualidade em concentrados de plaquetas caninos (média \pm D.P.) por meio de contagens celulares e mensurações de glicose, pH (fita MercK®) e <i>swirling</i> , no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem.....	32
Tabela 2	Avaliação dos parâmetros de qualidade em concentrados de plaquetas caninos (média \pm D.P.) por meio de contagens celulares e mensurações de glicose, pH (fita MercK®) e <i>swirling</i> , no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem.....	32
Tabela 5	Intervalo das médias de intensidade de fluorescência (MIF) dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61, avaliados no momento controle (M0) e no último dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos, do grupo I.....	72
Tabela 6	Intervalo das médias de intensidade de fluorescência (MIF) dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61, avaliados no momento controle (M0) e no último dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos, do grupo II.....	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Médias da agregação plaquetária (%) dos concentrados de plaquetas caninos, avaliados no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem, pela adição dos agonistas ADP e epinefrina..... 73
- Figura 2** Médias da agregação plaquetária (%) dos concentrados de plaquetas caninos, avaliados no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem, pela adição dos agonistas ADP e epinefrina..... 73
- Figura 3** A) Histograma da população de plaquetas selecionada (“gate”), em gráfico de tamanho (FSC-Height) e granulosidade (SSC-Height), obtido a partir do concentrado de plaquetas canino. B) Histograma representando a autofluorescência da população plaquetária, obtido a partir do concentrado de plaquetas canino..... 74
- Figura 4** Histogramas representando a população plaquetária positiva para a marcação dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61, obtidos a partir do concentrado de plaquetas canino dos grupos I e II, no momento controle (A - CD41; B - CD61), no 5º dia (C - CD41; D - CD61) e 7º dia de estocagem (E - CD41; F - CD61)..... 75

ABREVIACÕES

% - por cento

°C – graus Celsius

CD – denominação de grupamento

CF – citometria de fluxo

cm – centímetros

CO₂ – dióxido de carbono

CP – concentrados de plaquetas

dL - decilitro

D.P. – desvio padrão

et al. – e colaboradores

FITC – isotiocionato de fluoroceína

“g” – unidade da força centrífuga relativa

g/dL – gramas por decilitro

GP – glicoproteína

h – hora

kg – quilograma

MIF – média de intensidade de fluorescência

mL – mililitros

μL – microlitro

μM – micromolar

PAF – fator ativador de plaquetas

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PPP – plasma pobre em plaquetas

PRP – plasma rico em plaquetas

SCA – sistema canicular aberto

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1.....	3
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO DE LITERATURA	6
OBJETIVOS.....	15
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico	16
Resumo	17
Introdução	18
Material e Metodos	20
Resultados	23
Discussão	24
Conclusão	27
Referencias	28
Apêndice.....	32
CAPÍTULO 3 – Trabalho Científico	33
Resumo	34
Introdução	35
Material e Metodos	39
Resultados	42
Discussão	43
Referencias	48
CAPÍTULO 4.....	54
DISCUSSÃO GERAL	55
CONCLUSÃO GERAL	58
REFERENCIAS	59
ANEXOS	65
NORMAS REVISTAS.....	76

RIANI COSTA, C.C.M. **Influência das alterações físicas e químicas sobre a função plaquetária e a expressão da GPIIb/IIIa em concentrados de plaquetas caninos estocados**. Botucatu, 2011. 81p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

RESUMO

O concentrado de plaquetas é um hemocomponente importante para a transfusão de grandes quantidades de plaquetas. Durante a estocagem, as plaquetas sofrem lesões que devem ser analisadas por meio de testes laboratoriais. O objetivo do presente estudo foi avaliar as qualidades físicas, químicas, microbiológicas, estruturais e funcionais plaquetárias em concentrados de plaquetas caninos estocados durante 5 e 7 dias. Foram realizadas contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias por unidade, mensuração do pH, glicose, avaliação do *swirling*, análise microbiológica, avaliação da agregação plaquetária e da expressão da GPIIb/IIIa pela citometria de fluxo. As análises foram realizadas logo após a centrifugação, e no quinto (grupo I) e sétimo (grupo II) dias de estocagem dos concentrados de plaquetas obtidos de 22 cães hígidos. Todas as bolsas foram negativas para o isolamento de microorganismos. Houve diminuição significativa nas contagens de plaquetas e leucócitos, pH, glicose e *swirling* nos dois grupos. Ocorreu diminuição na resposta agregatória nos dois grupos, com o uso isolado e associado de ADP e epinefrina. Os anticorpos CD41 e CD61 apresentaram alta porcentagem de fluorescência em todos os momentos, e não houve variação significativa na média de intensidade de fluorescência das plaquetas durante a estocagem. Conclui-se que, mantida a esterilidade microbiológica, os concentrados de plaquetas caninas podem ser estocados por até 7 dias, no entanto, há uma maior perda da viabilidade plaquetária e qualidade dos concentrados quando comparados ao grupo armazenado durante 5 dias. Houve perda funcional das plaquetas durante a estocagem pela redução da agregação plaquetária. Os anticorpos CD41 e CD61 podem ser utilizados na avaliação da GPIIb/IIIa de plaquetas caninas estocadas durante os períodos avaliados.

Palavras-chave: cão, concentrado de plaquetas, controle de qualidade, citometria de fluxo, agregação plaquetária.

RIANI COSTA, C.C.M. **Influence of physical and chemical alterations on platelet function and the expression of GPIIbIIIa in stored canine platelet concentrates.** Botucatu, 2011. 81p. Master's Dissertation in Veterinary Medicine – School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry. São Paulo State University, Botucatu.

ABSTRACT

Platelet concentrate is an important blood component for platelet transfusion. During storage, platelets undergo lesions that should be evaluated by laboratory assays. The aim of this study was to evaluate the physical, chemical, microbiological, structural and functional platelet qualities in canine platelet concentrate stored for 5 and 7 days. Platelet, leukocytes and erythrocytes concentrations per unit, pH and glucose measurements, *swirling* observation, microbiological analysis, assessment of platelet aggregation and expression of GPIIbIIIa by flow cytometry were performed. Analyses were performed after centrifugation, and the fifth (group I) and seventh (group II) days of platelet concentrate storage obtained from 22 healthy dogs. All platelet concentrate bags were negative for microorganisms isolation. Platelet and leukocytes concentrations, pH, glucose, and *swirling* decreased significantly during storage, in both groups. A significant reduction in aggregatory response was detected in both groups, in the presence of ADP, epinephrine or both simultaneously. CD41 and CD61 antibodies showed high fluorescence at all times, and no significant variation in mean fluorescence intensity during storage. In conclusion, canine platelet concentrates should be stored for 5 days, however, can be stored for up to 7 days with greater loss of viability and quality of bags during this period. There was functional loss observed by the reduction of platelet aggregation during storage in both groups. CD41 and CD61 antibodies can be used to assess GPIIbIIIa in canine platelets stored during the evaluated period.

Key-words: dog, platelet concentrate, quality control, flow cytometry, platelet aggregation.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea é definida como uma terapia intravenosa realizada com sangue total ou seus componentes. Nas últimas décadas, tem ocorrido na Medicina Veterinária um aumento na utilização de hemocomponentes em relação à transfusão de sangue total. Esse aumento se deve às vantagens do fracionamento do sangue, que possibilita uma reposição específica para a necessidade de cada paciente, minimiza a ocorrência de reações transfusionais devido à menor exposição a antígenos e componentes desnecessários, diminui o risco da transmissão de agentes infecciosos e ainda possibilita a utilização de uma bolsa de sangue para vários pacientes (SCHNEIDER, 1995; ABRAMS-OGG, 2000; KRISTENSEN & FELDMAN, 2004).

A partir do sangue total, podem ser obtidos o concentrado de hemácias, plasma fresco congelado, plasma congelado, crioprecipitado, plasma criopobre, plasma rico em plaquetas e concentrado de plaquetas (PEREIRA & RAMALHO, 2001). Os componentes do sangue que possuem uma maior concentração plaquetária são o plasma rico em plaquetas (PRP) e o concentrado de plaquetas (CP). O primeiro é obtido pela centrifugação lenta do sangue fresco total, enquanto o CP é obtido por uma segunda centrifugação mais rápida do PRP ou por aférese (ABRAMS-OGG, 2003; KRISTENSEN & FELDMAN, 2004).

A bolsa de CP apresenta um volume reduzido (50 a 70mL), com maior concentração de plaquetas e menor de plasma, possibilitando maiores benefícios para o paciente transfundido. O uso do CP permite transfusões de grandes quantidades de plaquetas, promove um incremento plaquetário maior no paciente, e também reduz possíveis complicações como hipervolemia, hiperproteïnemia e outras reações transfusionais (ABRAMS-OGG, 2003; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006).

A transfusão de plaquetas é uma terapia que visa controlar episódios de sangramento ativo em animais que apresentam diminuição do número de plaquetas na circulação (trombocitopenia) ou que apresentem disfunções plaquetárias qualitativas (trombocitopatia) (DE COPEGUI & FELDMAN, 1995). Também pode ser utilizado profilaticamente, na prevenção de um possível sangramento causado por procedimentos

cirúrgicos em animais trombocitopênicos (ABRAMS-OGG, 2003; KRISTENSEN & FELDMAN, 2004).

Apesar de ainda pouco comum na Medicina Veterinária, a utilização de componentes ricos em plaquetas vem sendo estudada e estimulada ao longo dos últimos anos (ABRAMS-OGG et al., 1993; ALLYSON et al., 1997; KLEIN et al., 1999; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006).

Entretanto, para a realização da transfusão de CP é necessário que se garanta a qualidade deste material. Sabe-se que durante a estocagem, as plaquetas sofrem alterações estruturais e bioquímicas denominadas “lesões plaquetárias de estocagem” (WANG et al., 1999; DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004; SHANWELL et al., 2006) que podem levar a redução da sua função e viabilidade (SLICHTER, 2004).

Portanto, durante a estocagem, as plaquetas devem ser avaliadas por meio de testes *in vitro* que analisem sua viabilidade e função. Além disso, a avaliação da esterilidade microbiológica é muito importante, já que é um fator limitante para o tempo de estocagem e um fator de risco ao receptor. Estudos na área de hemoterapia veterinária que avaliaram CP caninos são escassos. Desta forma, é importante o estabelecimento de protocolos de estocagem, de aferição da qualidade das bolsas durante o armazenamento e a avaliação das plaquetas por meio de técnicas específicas como a agregação plaquetária e a citometria de fluxo.

REVISÃO DE LITERATURA

As plaquetas

As plaquetas são células anucleadas, originadas da constrição citoplasmática dos megacariócitos, células poliplóides presentes na medula óssea (PRATER & TVEDTEN, 2004). O tamanho e a densidade das plaquetas formadas são controlados pelo megacariócito (CRAMER & FONTENAY, 2006), sendo que a vida média das plaquetas caninas varia de 5 a 7 dias e a contagem normal dessas células na circulação é de 160.000 a 430.000/ μ L (MEYER & HARVEY, 2004).

Essas células possuem um papel fundamental na hemostasia, atuando principalmente na regulação da hemostasia primária. Os mecanismos envolvidos nessa regulação incluem: adesão, agregação, secreção e contração do citoplasma plaquetário (ESCOLAR & WHITE, 2000; BROOKS et al., 2009). A injúria vascular desencadeia uma série de reações plaquetárias, promovendo a formação do tampão hemostático de plaquetas no local lesionado (BROOKS et al., 2009).

A estrutura plaquetária pode ser dividida em três regiões distintas: região periférica, composta por membrana plasmática, glicocálix e sistema canicular aberto; região do citoesqueleto; e região citoplasmática, que contém as organelas e grânulos (HARMENING & LEMERY, 1997).

O sistema canicular aberto (SCA) é composto por invaginações da membrana plasmática para o interior da plaqueta, formando um sistema de canais e canalículos por entre o citoplasma, como uma rede (HARMENING & LEMERY, 1997; CRAMER & FONTENAY, 2006). O SCA pode promover uma grande extensão da membrana e a área da superfície plaquetária pode aumentar em até 400% quando há externalização deste sistema (ESCOLAR & WHITE, 2000).

O glicocálix é um importante componente da membrana plasmática, formado por oligossacarídeos e polissacarídeos. Nesta porção, estão inseridos receptores e enzimas que promovem o potencial adesivo plaquetário e a transmissão dos estímulos por toda a célula. Ele é responsável pela manutenção da carga negativa na superfície plaquetária, evitando interações indesejadas com outros elementos da parede vascular e do sangue quando a

plaqueta se encontra em repouso (HARMENING & LEMERY, 1997; CRAMER & FONTENAY, 2006).

Na membrana estão localizados os principais receptores plaquetários, denominados glicoproteínas (GP). As GP são heterodímeros que possuem diversas funções nos mecanismos de adesão e agregação plaquetários. São também denominadas integrinas, pois fazem a comunicação do meio extracelular com o intracelular. Elas estão presentes na membrana plasmática e em alguns grânulos plaquetários (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1998; RAND et al., 2003).

Dentre as GP mais importantes estão: os receptores de adesão formados por um complexo de três GP, a GPIb, GPIX e GPV, responsáveis pela ligação ao fator de von Willebrand (fvW) e a trombina; a GPVI que é um receptor de ativação para o colágeno; a GPIIbIIIa que é o principal e mais representativo receptor da agregação plaquetária, responsável pela ligação ao fibrinogênio, fibronectina e ao fvW, promovendo uma forte ligação entre as plaquetas; e a GPIV que está envolvida nas funções de adesão e agregação, ligando-se ao colágeno e a trombospondina (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1998; ESCOLAR & WHITE, 2000; CRAMER & FONTENAY, 2006).

A região das organelas plaquetárias é responsável por toda a atividade metabólica da célula (HARMENING & LEMERY, 1997). As plaquetas possuem grânulos citoplasmáticos, classificados de acordo com sua ultraestrutura, densidade e conteúdo, chamados de alfa (α) grânulos, grânulos densos, lisossomos e peroxissomos (PRATER & TVEDTEN, 2004; CRAMER & FONTENAY, 2006).

Os α grânulos são os mais numerosos e seu conteúdo é variado, sendo composto por proteínas adesivas, GP, fatores de coagulação, fatores de crescimento, imunoglobulinas e inibidores de proteases. Alguns exemplos desses componentes são: fibrinogênio, fator V, fator de crescimento vascular e endotelial, plasminogênio, P-selectina (componente granular específico) e 30% da quantidade total da GPIIbIIIa plaquetária (HARMENING & LEMERY, 1997; PRATER & TVEDTEN, 2004; CRAMER & FONTENAY, 2006).

Os grânulos densos estão em menor quantidade nas plaquetas. Seu conteúdo é composto principalmente pela serotonina, catecolaminas, Ca^{+2} , Mg^{+2} , ATP e ADP (HARMENING & LEMERY, 1997; PRATER & TVEDTEN, 2004; MEYER & HARVEY, 2004; CRAMER & FONTENAY, 2006).

Os lisossomos, pequenos grânulos homogêneos, e os peroxissomos, estão em pequena quantidade no citoplasma plaquetário. A função dos lisossomos não está bem esclarecida, mas eles podem ser importantes na interação com a parede vascular e na degradação de proteínas intracelulares (PRATER & TVEDTEN, 2004; CRAMER & FONTENAY, 2006).

O citoplasma das plaquetas é organizado por uma rede de proteínas estruturais chamada de citoesqueleto, composto por moléculas de tubulina, polímeros de actina, e por microtúbulos localizados próximos à membrana citoplasmática. Estas estruturas são responsáveis pela manutenção do formato discóide nas plaquetas quando em repouso, e após a ativação são responsáveis por mudanças estruturais dinâmicas e sua sustentação. Essas mudanças incluem a modificação do formato discóide para o esférico (ou ativado) e a formação de prolongamentos citoplasmáticos e pseudópodes, possibilitando que a plaqueta se espalhe por uma superfície (HARMENING & LEMERY, 1997; MEYER & HARVEY, 2004; CRAMER & FONTENAY, 2006).

Os microtúbulos atuam na organização, centralização e secreção dos grânulos citoplasmáticos durante a ativação plaquetária. Eles também são responsáveis pela contração do citoesqueleto plaquetário levando a retração final do coágulo (HARMENING & LEMERY, 1997; CRAMER & FONTENAY, 2006).

Atuação das plaquetas na hemostasia primária

Após injúria da parede vascular, a matriz do endotélio expõe o fator de von Willebrand (fvW), o colágeno e a fibronectina. Com a exposição dessas proteínas, as plaquetas circulantes apresentam uma série de mudanças bioquímicas e conformacionais, iniciando o processo de adesão e ativação plaquetários (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1998; RAND et al., 2003; MEYER & HARVEY, 2004).

Após a mudança do formato discóide (repouso) para o esférico (ativado), as plaquetas ligam-se ao fvW pela interação com o complexo receptor GPIb/IX/V, estabelecendo a adesão plaquetária com o endotélio vascular de forma passiva, formando-se o tampão plaquetário inicial (RAND et al., 2003; MEYER & HARVEY, 2004). Após a adesão, as plaquetas passam por diversas alterações morfológicas com a emissão de

prolongamentos, pseudópodes e modificações de sua superfície (ESCOLAR & WHITE, 2000; CRAMER & FONTENAY, 2006).

A glicoproteína GPIIb/IIIa presente na membrana plasmática, modifica sua conformação durante a ativação plaquetária, tornando-se ativada e ligando-se ao fibrinogênio, aumentando ainda mais a interação entre as plaquetas e formando um conciso agregado plaquetário (ESCOLAR & WHITE, 2000; MEYER & HARVEY, 2004; LINDAHL & RAMSTROM, 2009).

Inicialmente, essa ativação é reversível, pois não ocorre a degranulação ou liberação dos componentes citoplasmáticos. Apenas há um rearranjo interno dos grânulos e organelas pelos microtúbulos e microfilamentos, promovendo algumas mudanças conformacionais. Em uma segunda fase da ativação, irreversível e dependente de energia, ocorre a fusão de todos os grânulos plaquetários com a liberação de seus componentes e receptores para o meio externo (MEYER & HARVEY, 2004; CRAMER & FONTENAY, 2006).

Na fase de secreção dos componentes granulares, há uma movimentação das organelas citoplasmáticas para o centro da plaqueta e, a partir da fusão dos grânulos, os componentes são liberados (ESCOLAR & WHITE, 2000). Agonistas plaquetários como o ADP, serotonina, epinefrina, tromboxano (TXA₂), entre outros, também são liberados (MEYER & HARVEY, 2004). Os componentes e substâncias degranulados e receptores expressos ativam ainda mais as plaquetas circulantes, que chegam ao sítio lesionado e são estimuladas a mudarem sua conformação, emitir pseudópodes e formar agregados juntamente com as plaquetas já aderidas (RAND et al., 2003). A agregação plaquetária ocorre quase que concomitantemente com o processo de adesão e secreção dos componentes citoplasmáticos (HARMENING & LEMERY, 1997).

A plaqueta pode se tornar ativada por diferentes mecanismos, como a exposição do colágeno ou do fvW pelo endotélio vascular, pela liberação de seus próprios componentes granulares ou pela trombina, formada na hemostasia secundária (RAND et al., 2003; LINDAHL & RAMSTROM, 2009). Todos são agonistas plaquetários e agem sinergicamente no processo de ativação e agregação plaquetária (RAND et al., 2003).

Após a formação do tampão plaquetário e de sua estabilização pela fibrina, proveniente da hemostasia secundária, as plaquetas incorporadas e agregadas ao tampão passam por um rearranjo e contração do seu citoesqueleto. Ocorre assim a retração do

coágulo, que possui um importante papel fisiológico no restabelecimento da reparação vascular e do fluxo sanguíneo (LINDAHL & RAMSTROM, 2009). Portanto, é pela adesão no endotélio vascular lesionado, agregação e propagação da coagulação, que há o restabelecimento da integridade vascular e do fluxo sanguíneo (SCOTT & STOCKHAM, 2008; LINDAHL & RAMSTROM, 2009).

Transfusão de plaquetas

Na Medicina Veterinária, a terapia transfusional de plaquetas pode ser utilizada para fins terapêuticos ou profiláticos, em animais que apresentam trombocitopenias ou trombocitopatias (ABRAMS-OGG, 2003).

A trombocitopenia, diminuição da contagem plaquetária na circulação, é um dos distúrbios hematológicos mais identificados nos cães. Ela pode ocorrer em diversas doenças e suas causas incluem: consumo, diminuição da produção, destruição e sequestro.

A reposição de plaquetas pode ser indicada em cães que apresentam trombocitopenia decorrente de causas infecciosas, induzidas por drogas ou quimioterápico e decorrente da diminuição na produção plaquetária na medula óssea, observada em casos de leucemia aguda, anemia aplástica ou hipoplasia de medula óssea por causas variadas (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003).

A transfusão terapêutica de plaquetas é indicada principalmente para interromper hemorragias em pacientes trombocitopênicos com contagens plaquetárias abaixo de 20.000/ μ L. A transfusão profilática é indicada nos casos de animais trombocitopênicos acompanhados de risco hemorrágico, como por exemplo, animais que serão submetidos a procedimentos cirúrgicos e apresentam contagens plaquetárias abaixo de 50.000/ μ L (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003). As trombocitopatias, ou distúrbios de função plaquetária, possuem indicação de terapia transfusional somente em casos de hemorragia ativa, condições de risco hemorrágico ou previamente a procedimentos cirúrgicos (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1998).

A transfusão de plaquetas é contra-indicada em casos de aumento da destruição e consumo plaquetário, como observado na trombocitopenia imunomediada, na coagulação intravascular disseminada ou nas vasculites, pois as plaquetas são rapidamente destruídas ou consumidas após a transfusão (ABRAMS-OGG, 2003). Nestes casos, o procedimento

transfusional só deve ser realizado em cães que precisem ser submetidos a algum procedimento cirúrgico, imediatamente antes ou durante a cirurgia (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003). Nos casos de sequestro de plaquetas, como observado nas esplenomegalias, esta terapia também é contra-indicada, visto que a massa de plaquetas total do animal encontra-se normal (DE GOPEGUI & FELDMAN, 1995).

O cálculo para a transfusão de CP é feito adotando-se 1U (uma unidade de CP) para cada 10kg de peso vivo, esperando-se um incremento plaquetário na circulação do receptor de 30.000 a 40.000 plaquetas/ μ L. As plaquetas transfundidas apresentam uma vida média curta, sendo esperado um decréscimo de aproximadamente 30% a cada 24 horas. Desta forma, podem ser recomendadas novas transfusões em 48 ou 72 horas (KRISTENSEN & FELDMAN, 2004; ABRAMS-OGG, 2003).

Controle de qualidade dos concentrados de plaquetas

Na Medicina Veterinária, a avaliação de CP caninos busca seguir especificações de controle de qualidade nos moldes de bancos de sangue humanos e de estudos veterinários prévios. As bolsas de CP devem ser conservadas a temperaturas entre 20 a 24°C e mantidas em constante movimentação. A manutenção de um pH adequado, esterilidade microbiológica e avaliações da viabilidade e função plaquetárias também são necessárias para o controle de qualidade durante o período de estocagem (ALLYSON et al., 1997; ABRAMS-OGG, 2003; ANVISA, 2004; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006).

Estudos médicos têm sido realizados em CP para avaliação da viabilidade, função e ativação das plaquetas durante o armazenamento, possibilitando uma análise criteriosa da qualidade do hemocomponente a ser transfundido (DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004; AKAY et al., 2007; SANDGREN et al., 2007). Na Medicina Veterinária, também têm sido desenvolvidos testes que avaliam a viabilidade e função plaquetárias *in vitro* para CP caninos (ALLYSON et al., 1997; KLEIN et al., 1999; ABRAMS-OGG, 2003; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006).

A avaliação do pH, por exemplo, tem demonstrado ser um fator importante com alta correlação com alterações morfológicas e redução da função e viabilidade plaquetárias (VAN DE MEER et al., 2001; DEKKERS et al., 2007).

Como as plaquetas mantêm seu metabolismo durante a estocagem, as mensurações do pH e da glicose, entre outros elementos, são importantes parâmetros para avaliação do metabolismo celular e qualidade do concentrado estocado (CARDIGAN et al., 2005; KAUFMAN, 2006; DEKKERS et al., 2007).

A obtenção de CP com uma baixa contagem de hemácias e principalmente de leucócitos é necessária para minimizar a incidência de reações transfusionais, aloimunização, refratariedade na transfusão plaquetária e transmissão de agentes infecciosos (DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004; CHABANEL et al., 2008). Assim, a avaliação do número de células deve ser incluída entre os testes de controle de qualidade dos CP caninos (ABRAMS-OGG et al., 1993; ALLYSON et al., 1997).

As modificações morfológicas da plaqueta, que ocorrem durante a fase de ativação, podem ser identificadas por meio da técnica de avaliação visual chamada *swirling*. Nessa técnica, as plaquetas são expostas a uma fonte luminosa e, sob adequada movimentação manual, apresentam refringência da luz quando estão na forma discóide ou não ativada. As plaquetas que sofreram ativação não refringem a luz, ou seja, apresentam diminuição no *swirling*. Este é um método considerado fácil e prático para o controle de qualidade do concentrado de plaquetas (HERVIG et al., 1999; CARDIGAN et al., 2005).

A contaminação bacteriana em componentes sanguíneos é um fator de risco na medicina transfusional, sendo o concentrado de plaquetas um dos componentes mais afetados devido a sua necessidade de estocagem à temperatura ambiente (SLICHTER, 2004; SHANWELL et al., 2006). A contaminação pode ocorrer pela introdução de bactérias da pele do doador durante a flebotomia, por bacteremia assintomática do doador ou por contaminação durante o processo de estocagem. A transfusão de bolsas contaminadas pode ocasionar casos de sepse e óbito em pacientes (KAUFMAN, 2006; PALAVECINO et al., 2010).

Devido ao risco de contaminação bacteriana em CP, o tempo de estocagem atualmente preconizado é de cinco dias (ABRAMS-OGG, 2000; DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004; ANVISA, 2004; KAUFMAN, 2006). No entanto, pesquisadores ainda discutem a possibilidade do uso de bolsas estocadas por até sete dias, pois se mantida a esterilidade bacteriana a viabilidade e função plaquetárias passam a ser os fatores limitantes para a transfusão das bolsas (SHANWELL et al., 2006; KAUFMAN, 2006).

Para avaliação da função das plaquetas nos CP, pode-se utilizar a prova de agregação plaquetária. A agregação plaquetária é um método clássico, que ainda nos dias de hoje, na Medicina e na Medicina Veterinária, é considerado o método “padrão ouro” para a avaliação funcional das plaquetas (HARRISON, 2005; NIELSEN et al., 2007; LINDAHL & RAMSTROM, 2009; ALBANTNER et al., 2009). O método de escolha é o turbidimétrico, que pela adição de um ou mais agonistas à amostra, é possível obter informações sobre os aspectos funcionais e bioquímicos das plaquetas caninas (NIELSEN et al., 2007). Como exemplos desses agentes agonistas têm-se o ADP, epinefrina, colágeno, ácido araquidônico, entre outros (NIELSEN et al., 2007; SOLOVIEV et al., 1999).

Outro método utilizado para avaliação plaquetária em bancos de sangue humano é a citometria de fluxo (CF) (WANG et al., 1999; LANDI et al., 2003; SANDGREN et al., 2007). Por ser uma técnica sensível, de fácil execução e boa reprodutibilidade, esta tem sido utilizada para detectar a expressão de glicoproteínas e grânulos na superfície plaquetária quando esta se encontra em repouso ou ativada. A detecção da ativação plaquetária pela CF pode avaliar precocemente as alterações que irão influir na viabilidade e função das plaquetas durante o período de estocagem (MATSUBAYASHI et al., 1999; LIM & HYUN, 2002; LANDI et al., 2003; CARDIGAN et al., 2005; GOODRICH et al., 2006).

O princípio da CF é medir rapidamente características específicas de um grande número de células individuais em suspensão (MICHELSON, 1996; WEISS, 2002). Após colocar a amostra a ser analisada no citômetro de fluxo, o aparelho faz a leitura das plaquetas que são identificadas pelo seu tamanho, granulosidade e fluorescência (MICHELSON, 1996). As amostras podem ser incubadas com diversos tipos de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, ou incubadas com corantes vitais, que marcam especificamente proteínas, receptores de membrana, grânulos ou lipídios plaquetários (TANAKA, 2006; WILLS et al., 2006; LINDAHL & RAMSTROM, 2009). A população celular selecionada pode ser analisada por histograma de pontos ou intensidade de fluorescência (MORITZ et al., 2003)

A citometria de fluxo (CF) é uma técnica emergente na Medicina Veterinária e possui uma grande aplicação na avaliação plaquetária de cães (WEISS, 2002; MORITZ et

al., 2003; NAKAGE et al., 2005; WILLS et al., 2006), no entanto, até o presente momento, nenhum estudo relata a sua utilização em CP caninos.

OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a manutenção das qualidades físicas, químicas, microbiológicas, estruturais e funcionais plaquetárias em concentrados de plaquetas caninos estocados durante 5 e 7 dias, para a terapia transfusional com plaquetas.

Como objetivos específicos:

1. Padronizar a técnica de fracionamento do sangue total de cães para obtenção de concentrados de plaquetas e implementação do banco de sangue na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, campus de Botucatu;
2. Avaliar as alterações das qualidades físicas, químicas, estruturais e funcionais plaquetárias em concentrados de plaquetas caninos estocados;
3. Determinar a influência das alterações dos testes de controle de qualidade sobre os testes de agregação plaquetária e de detecção da GPIIbIIIa.
4. Desenvolver, padronizar e validar a técnica de detecção da glicoproteína de superfície plaquetária GPIIbIIIa, em concentrado de plaquetas estocados.

Capítulo 2

1 **Influência das alterações físicas e químicas em concentrados de plaquetas caninos**
2 **estocados durante 5 e 7 dias**

3 Influence of physical and chemical alterations in canine platelet concentrates stored during 5
4 and 7 days

5
6 RIANI COSTA, C.C.M.¹; RIBEIRO, M.G.²; TAKAHIRA, R.K.^{1*}

7 ¹Departamento de Clínica Veterinária - Laboratório Clínico Veterinário; ²Departamento de
8 Higiene e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ),
9 UNESP, campus de Botucatu. Distrito de Rubião Jr., s/nº, caixa postal 560, CEP:18618-
10 970, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: takahira@fmvz.unesp.br *autor para correspondência

11
12 **RESUMO**

13 O concentrado de plaquetas é um hemocomponente obtido pela dupla centrifugação da
14 bolsa de sangue total. Durante o período de estocagem das bolsas, as plaquetas sofrem
15 lesões estruturais e bioquímicas, que devem ser analisadas por testes laboratoriais. O
16 objetivo do presente estudo foi determinar a manutenção da qualidade e viabilidade
17 plaquetárias em concentrados de plaquetas caninos estocados, por meio da contagem de
18 plaquetas, leucócitos e hemácias, mensuração do pH, glicose, avaliação do *swirling* e
19 análise microbiológica. Foram utilizadas 22 bolsas obtidas de cães saudáveis, separadas em
20 dois grupos, sendo um estocado durante 5 dias e o outro durante 7 dias. As bolsas dos dois
21 grupos foram negativas para o isolamento de microorganismos. Houve diminuição
22 significativa nas contagens de plaquetas e leucócitos, na mensuração do pH, glicose e
23 *swirling*, nos dois grupos durante o período de estocagem, e correlação direta entre pH,
24 *swirling* e glicose. 100% das bolsas estocadas por 5 dias e 73% das bolsas estocadas por 7
25 dias apresentaram adequados parâmetros de qualidade. Conclui-se que, mantida a
26 esterilidade microbiológica, as bolsas de concentrados de plaquetas caninas podem ser
27 estocadas por até 7 dias, no entanto, há uma maior perda da viabilidade plaquetária e
28 qualidade dos concentrados quando comparados ao grupo armazenado durante 5 dias.

29
30 **Palavras-chave:** cão, plaqueta, concentrado de plaquetas, controle de qualidade.

31

32 INTRODUÇÃO

33 Os concentrados de plaquetas (CP) podem ser obtidos pela dupla centrifugação de
34 uma bolsa de sangue total ou por aférese, sendo a primeira técnica a mais utilizada na
35 Medicina Veterinária (ALLYSON et al., 1997; ABRAMS-OGG, 2003). As bolsas de CP
36 contêm grande concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma (50 a 70mL),
37 possibilitando, após a transfusão, um incremento plaquetário maior em relação aos outros
38 hemocomponentes e redução dos riscos de hipervolemia, hiperproteinemia e outras reações
39 transfusionais (ABRAMS-OGG, 2003; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006).

40 A qualidade dos CP é um importante fator na terapia transfusional. Sabe-se que
41 durante o armazenamento, as plaquetas sofrem alterações estruturais e bioquímicas
42 denominadas “lesões plaquetárias de estocagem” (DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004;
43 SHANWELL et al., 2006) que podem levar a redução da sua viabilidade e função (SINGH
44 et al., 2003; SLICHTER, 2004). Desta forma, assim como é feito para os CP em bancos de
45 sangue humanos, estudos *in vitro* são necessários para a avaliação das plaquetas durante o
46 armazenamento das bolsas, possibilitando uma análise criteriosa da qualidade do
47 hemocomponente (ALLYSON et al., 1997; KLEIN et al., 1999; ABRAMS-OGG, 2003;
48 DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004; SANDGREN et al., 2007).

49 Dentre as análises de controle de qualidade em CP, as mensurações de pH e glicose,
50 entre outros elementos, são importantes parâmetros para a avaliação do metabolismo
51 celular e da qualidade do concentrado estocado (SINGH et al., 2003; CARDIGAN et al.,
52 2005; KAUFMAN, 2006; DEKKERS et al., 2007). As plaquetas mantêm seu metabolismo
53 durante a estocagem das bolsas de modo que o metabolismo celular passa a ser o
54 anaeróbico. Desta forma, há o consumo da glicose e liberação de produtos como o CO₂,
55 íons de hidrogênio e o lactato. Esses componentes ácidos promovem a diminuição do pH na
56 bolsa, alterando o meio plasmático (SINGH et al., 2003; CARDIGAN et al., 2005;
57 KAUFMAN, 2006; GUERIN & BURTET, 2006; DEKKERS et al., 2007; ZHANG et al.,
58 2008). Portanto, a mensuração da concentração de glicose é muito utilizada como um
59 parâmetro de controle de qualidade em bancos de sangue humanos (TYNNGARD, 2009).

60 De acordo com as normas nacionais que regem bancos de sangue, preconiza-se
61 manter o pH das bolsas de CP maior ou igual a 6,2 (ANVISA, 2004). No entanto, alguns

62 hemocentros indicam a manutenção de um pH maior ou igual a 6,4, devido a melhor
63 viabilidade plaquetária nestas mensurações (GUERIN & BURTET, 2006; DEKKERS et
64 al., 2007; STOMER et al., 2008). Diminuições do pH podem levar a alterações
65 morfológicas significativas nas plaquetas e valores abaixo de 6,2 causam alterações
66 irreversíveis que culminam em hipofunção e redução da sobrevivência plaquetária (VAN DE
67 MEER et al., 2001; GULLIKSSON, 2003). Neste meio ácido, as plaquetas perdem o
68 formato discóide passando para o esférico, iniciam a degranulação de seus componentes e
69 podem sofrer fragmentação do citoplasma (GUERIN & BURTET, 2006).

70 A avaliação do número de células nos CP deve ser incluída entre os testes de
71 controle de qualidade. Bolsas de concentrados com altas contagens plaquetárias e baixa
72 contagem de hemácias e leucócitos são preconizadas para que ocorra um adequado
73 incremento plaquetário no paciente, e minimize a incidência de reações transfusionais,
74 aloimunização, refratariedade na transfusão plaquetária e transmissão de agentes
75 infecciosos (ALLYSON et al., 1997; ABRAMS-OGG, 2000).

76 Modificações morfológicas das plaquetas também ocorrem durante a estocagem das
77 bolsas, e a sua detecção torna-se um importante parâmetro na avaliação dessas células em
78 CP. Uma técnica visual frequentemente utilizada na avaliação indireta da função
79 plaquetária em CP estocados é a observação do *swirling* (HERVIG et al., 1999; MAURER-
80 SPUREJ et al., 2008). A técnica consiste em examinar a bolsa de CP contra uma fonte de
81 luz, enquanto o plasma é suavemente homogeneizado com a mão. As plaquetas no estado
82 de repouso (discóide) irão refringir a luz e formar um redemoinho no plasma da bolsa,
83 fenômeno chamado *swirling*. As plaquetas que sofreram ativação (formato esférico) ou
84 perderam sua integridade não refringem a luz, ou seja, na bolsa há diminuição ou ausência
85 do *swirling* (CARDIGAN et al., 2005; MAURER-SPUREJ et al., 2008). Esta avaliação é
86 mensurada numa escala de 0 a 3, sendo 0 a ausência do *swirling* e 3 a observação máxima
87 do fenômeno (HERVIG et al., 1999; SINGH et al., 2009). A presença do fenômeno,
88 portanto, indica uma preservação conformacional das plaquetas e pode ter uma correlação
89 direta com um pH adequado na bolsa. A sua redução ou ausência indica uma qualidade
90 ruim da bolsa e provavelmente uma capacidade funcional plaquetária reduzida, devendo-se
91 descartar a bolsa em mensurações menores a 1 (ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006;
92 LINDAHL & RAMSTROM, 2009).

93 A contaminação bacteriana é um fator de risco na medicina transfusional de
94 plaquetas, pois o CP é um dos componentes de maior risco devido a necessidade de
95 estocagem à temperatura ambiente (SLICHTER, 2004; SHANWELL et al., 2006). A
96 contaminação pode ocorrer pela introdução de bactérias da pele do doador durante a
97 flebotomia, por bacteremia assintomática do doador ou por contaminação durante o
98 processo de estocagem. A transfusão de bolsas contaminadas pode ocasionar casos de sepse
99 e óbito em pacientes, portanto, uma avaliação criteriosa de contaminação bacteriana das
100 bolsas deve ser constantemente realizada nos bancos de sangue (KAUFMAN, 2006;
101 PALAVECINO et al., 2010).

102 Desta forma, o tempo de armazenamento é um fator limitante em bancos de sangue,
103 e o período máximo de estocagem regulamentado atualmente é de 5 dias (ANVISA, 2004).
104 No entanto, diversos estudos realizados em CP humanos avaliaram bolsas estocadas por
105 períodos prolongados, que variaram de 7 até 21 dias (MATSUBAYASHI et al., 1999;
106 DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004; MOHAMMADI et al., 2005; SANDGREN et al.,
107 2007; TYNNGARD, 2009). Na Medicina Veterinária, poucos estudos avaliaram a
108 viabilidade e a esterilidade em CP caninos por períodos maiores que 5 dias (ALLYSON et
109 al., 1997; KLEIN et al., 1999). Mantida a esterilidade microbiológica, as bolsas de CP
110 podem ser estocadas por mais tempo e a viabilidade plaquetária passa a ser o fator
111 determinante para o uso do CP em transfusões (SHANWELL et al., 2006; SPUREJ &
112 CHIPPERFIELD, 2007).

113 O objetivo do presente estudo foi determinar a manutenção da qualidade e
114 viabilidade plaquetárias em CP caninos estocados por 5 e 7 dias, por meio da contagem de
115 plaquetas, leucócitos e hemácias, mensuração do pH, glicose e avaliação do *swirling*.

116

117 MATERIAL E MÉTODOS

118 Foram utilizados 22 cães hípidos, com peso mínimo de 25 kg, machos e fêmeas,
119 com idade entre 1 e 8 anos, de diversas raças, provenientes do canil da FMVZ – Unesp -
120 campus de Botucatu ou de proprietários voluntários. Estes animais foram avaliados quanto
121 ao estado de higidez por meio da avaliação clínica, hemograma, exames bioquímicos
122 (uréia, creatinina, ALT, FA, GGT, proteínas totais e albumina) e PCR para *Ehrlichia sp.*
123 Todos os cães possuíam vacinação anual e vermifugação semestral atualizada e sem

124 histórico de uso de medicamentos nos últimos dois meses. O estudo foi aprovado pela
125 Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e
126 Zootecnia – Unesp – campus de Botucatu, protocolo nº166/2008 – CEEA. A colheita do
127 sangue foi realizada pela venopunção da jugular, após tricotomia e antisepsia local com
128 gazes estéreis embebidas em álcool, seguida de iodo povidine e álcool novamente
129 (MATHAI, 2009). Utilizou-se o método gravitacional para o preenchimento da bolsa de
130 sangue, com homogeneização mecânica durante todo o procedimento. O tempo médio de
131 colheita foi de 8 minutos. Foram utilizadas bolsas de sangue triplas de plástico, com
132 anticoagulante CPDA-1, sendo a bolsa principal com capacidade para 450 ± 50 mL de
133 sangue total (JP Indústria Farmacêutica[®]). A pesagem das bolsas durante a colheita foi
134 realizada em balança digital, atingindo-se o peso final de 560 ± 5 gramas, correspondendo a
135 cerca de 450mL de sangue total.

136 O sangue fresco total foi processado em até três horas após a colheita para
137 obtenção do CP e as duas centrifugações da bolsa foram realizadas a 22°C (ROTANTA
138 460RS - Hettich[®]). Na primeira centrifugação da bolsa de sangue total, foi utilizada uma
139 força centrífuga relativa de 1.000g durante 8 minutos e 30 segundos (incluindo o tempo de
140 aceleração de 2 minutos e 30 segundos), para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP),
141 caracterizando a centrifugação leve. O PRP foi separado do concentrado de hemácias e
142 transferido para a bolsa satélite específica para plaquetas. Em seguida, foi feita a segunda
143 centrifugação a partir do PRP durante 11 minutos a 2.000g (incluindo o tempo de
144 aceleração de 1 minuto). O sobrenadante ou plasma pobre em plaquetas (PPP), foi
145 transferido para outra bolsa satélite, obtendo-se o concentrado de plaquetas com um peso
146 médio de 67 gramas. O volume das bolsas foi determinado pela pesagem em balança
147 digital. A balança foi previamente tarada com o peso da bolsa de CP vazia, e o volume final
148 foi estabelecido considerando-se que cada 1,03 grama corresponde a 1 mL de concentrado
149 de plaquetas (ALLYSON et al., 1997). O CP foi mantido em repouso durante 60 minutos
150 para promover a desagregação plaquetária. Após este período, a bolsa foi armazenada sob
151 agitação constante em um homogeneizador de plaquetas rotacional (AP30 - PRESVAC[®])
152 em ambiente climatizado à temperatura de 22 a 24°C.

153 Foram constituídos dois grupos experimentais, sendo o grupo I (n=11)
154 concentrados de plaquetas armazenados durante 5 dias e o grupo II (n=11) concentrados de

155 plaquetas armazenados por 7 dias. Os dois grupos foram submetidos às análises de controle
156 de qualidade (volume, contagem de células, mensuração do pH, glicose, *swirling*) e análise
157 microbiológica no momento controle, logo após a colheita, e no quinto (grupo I) e sétimo
158 (grupo II) dias de armazenamento. A colheita das amostras de cada bolsa no primeiro dia de
159 avaliação (momento controle) foi realizada pela selagem do manguito da bolsa plástica,
160 mantendo-se o sistema sempre fechado e estéril. Antes da selagem, foram realizadas 4
161 homogeneizações do manguito com alicate de ordenha específico para esta finalidade, no
162 intuito de se obter uma amostra fidedigna ao conteúdo da bolsa de CP. A avaliação no
163 último dia de estocagem foi realizada com a abertura da bolsa, sendo que a amostra para o
164 cultivo microbiológico foi colheitada antes da abertura do sistema.

165 As contagens celulares foram realizadas em câmara de *Neubauer*. A diluição
166 para a contagem plaquetária foi realizada em solução de Brecher (diluição 1:200), a de
167 leucócitos em solução de *Turk* (diluição 1:20) e a de hemácias em solução isotônica de
168 *Marcano* (diluição 1:100). O hematócrito das bolsas de CP foi realizado pela técnica de
169 centrifugação de microhematócrito (JAIN, 1993).

170 A mensuração do pH foi realizada pela fita de pH Merck[®], que possui uma faixa
171 de avaliação entre 6,4 a 8,0. No último dia de estocagem, as mensurações também foram
172 realizadas em pHmetro digital (SOLAB[®]).

173 A mensuração da glicose foi realizada por meio de método colorimétrico
174 enzimático (KATAL[®]) em espectrofotômetro SB-190 CELM[®].

175 O *swirling* foi avaliado mediante a observação do aspecto visual do concentrado
176 plaquetário quanto à homogeneidade ou heterogeneidade e “turbilhonamento” das
177 partículas por meio de agitação manual da bolsa, à altura dos olhos e contra a luz. A
178 avaliação foi determinada em uma escala 0 a 3, de acordo com Hervig et al. (1999) e Singh
179 et al. (2009), sendo: “0” – plasma homogêneo, ausência de *swirling*; “1” – plasma com
180 aspecto heterogêneo e pouco contraste, *swirling* observado em alguns pontos da bolsa
181 (fraco); “2” – plasma heterogêneo com bom contraste por toda a bolsa (bom); “3” – plasma
182 muito heterogêneo com contraste observado em finos detalhes por toda a bolsa (ótimo).

183 Para a avaliação microbiológica, as amostras de concentrado de plaquetas foram
184 colheitadas de forma asséptica. Alíquotas de 0,5 mL foram obtidas no momento controle
185 nos dois grupos, no quinto dia (grupo I) e no sétimo dia (grupo II), mantidas estocadas a -

186 70°C até o momento do processamento, visando o exame microbiológico para detecção de
187 microorganismos. Todas as amostras foram semeadas nos meios de ágar sangue ovino
188 desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, em condições de aerobiose a 37°C, mantidas
189 respectivamente por 96h e 48h, com vistas ao isolamento bacteriano (QUINN et al., 2005).
190 O isolamento de fungos e leveduras foi procedido semeando as alíquotas do concentrado de
191 plaquetas nos meios de Micozel e Sabouraud, em condições de aerobiose, respectivamente
192 a 25°C e 37°C, mantidos por até 30 dias (LACAZ et al., 1998). Simultaneamente, alíquotas
193 foram semeadas em ágar sangue ovino desfibrinado (5%) e cultivadas em condições estritas
194 de anaerobiose, mantidas por 5 a 7 dias, utilizando gerador de anaerobiose (Difco®),
195 conforme as recomendações do fabricante (QUINN et al., 2005).

196 Os resultados foram submetidos à análise descritiva e as médias dos momentos
197 foram comparadas pelo teste t pareado ou pelo método de Mann-Whitney, de acordo com
198 as características de distribuição (paramétrica ou não paramétrica) das variáveis. As
199 comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste t ou Wilcoxon de acordo
200 com as características de distribuição (paramétrica ou não paramétrica) das variáveis. As
201 análises de correlação das variáveis pH e *swirling*, glicose e *swirling*, glicose e pH foram
202 realizadas por meio da análise de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas
203 ao nível de 5% de significância, no software SIGMASTAT.

204

205 **RESULTADOS**

206 As bolsas de concentrado de plaquetas dos dois grupos (n=22) apresentaram um
207 volume médio de 65 mL por unidade. Os valores médios (\pm D.P.) da contagem de
208 plaquetas, hemácias, leucócitos, glicose, pH e *swirling* estão descritos nas Tab 1 e 2.

209 As contagens de plaquetas e leucócitos apresentaram diminuição estatisticamente
210 significativa ($p < 0,05$) entre o momento controle e o último dia de estocagem, nos dois
211 grupos. Não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) em relação à contagem de
212 hemácias. O índice de hematócrito foi inferior a 1% em todas as bolsas de concentrados de
213 plaquetas utilizadas.

214 Em relação à mensuração do pH, houve diminuição estatisticamente significativa
215 ($p < 0,05$) entre o momento controle e o último dia de estocagem, nos dois grupos e foi
216 observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os momentos finais dos

217 grupos avaliados (5 dias e 7 dias). Uma porcentagem significativa dos CP apresentou
218 valores de pH adequados no último dia de estocagem, sendo que o pH manteve-se $\geq 6,4$ em
219 91% (10/11) das bolsas do grupo I e em 45% (5/11) das bolsas no grupo II. Considerando-
220 se como parâmetro de qualidade $\text{pH} \geq 6,2$ e utilizando valores obtidos por meio do
221 phmetro, este pH foi observado em 100% (11/11) das bolsas do grupo I e em 73% (8/11)
222 das bolsas do grupo II, no último dia de estocagem. Os valores de pH obtidos com a fita de
223 pH foram próximos aos obtidas pelo pHmetro.

224 Os valores mensurados de glicose apresentaram diminuição estatisticamente
225 significativa ($p < 0,05$) entre o momento controle e o último dia de estocagem, nos dois
226 grupos.

227 A avaliação do *swirling* apresentou diminuição estatisticamente significativa
228 ($p < 0,05$) entre o momento controle e o último dia de estocagem nos grupos I e II. Foi
229 observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o 5º e o 7º dia. No último
230 dia de armazenamento das bolsas, 100% (11/11) do grupo I e 82% (9/11) do grupo II
231 apresentaram *swirling* maior ou igual a 1.

232 Houve correlação positiva estatisticamente significativa entre o *swirling* e pH no
233 grupo I ($r = 0,542$, $p < 0,05$) e no grupo II ($r = 0,888$, $p < 0,001$). Houve correlação positiva
234 estatisticamente significativa entre o *swirling* e glicose no grupo I ($r = 0,646$, $p < 0,05$) e no
235 grupo II ($r = 0,638$, $p < 0,05$). Ocorreu também correlação positiva estatisticamente
236 significativa ocorreu entre o pH e glicose no grupo II ($r = 0,697$, $p < 0,001$).

237 Todas as 22 bolsas utilizadas no estudo apresentaram resultados negativos para o
238 isolamento de microorganismos.

239

240 **DISCUSSÃO**

241 Na Medicina Veterinária, são escassos os estudos que avaliaram as alterações
242 plaquetárias em CP caninos o que torna importante a realização de estudos específicos na
243 área da hemoterapia veterinária.

244 Os volumes das unidades plaquetárias obtidas apresentaram-se dentro do valor de
245 referencia preconizado, que varia de 50 a 70mL (ANVISA, 2004). Volumes inadequados
246 de CP podem reduzir significativamente a viabilidade e função das plaquetas. Volumes
247 inferiores a 50 mL podem promover aumento na formação de lactato e consequente maior

248 redução do pH, prejuízos no tamponamento do meio plasmático alterando o metabolismo
249 celular e também ocorrência de estimulação e ativação plaquetárias pelo maior contato com
250 a parede plástica da bolsa (SINGH et al., 2009).

251 A obtenção de concentrações adequadas de plaquetas nas bolsas depende de uma
252 padronização adequada dos protocolos de centrifugação para cada hemocentro veterinário
253 (ABRAMS-OGG et al., 1993; ALLYSON et al., 1997; ABRAMS-OGG, 2000). No
254 presente estudo, todas as bolsas apresentaram contagens plaquetárias acima de $5,5 \times 10^{10}$ x
255 10^{10} /unidade no momento controle, atendendo as especificações para bancos de sangue
256 humanos (ANVISA, 2004). Apesar da diminuição significativa na contagem plaquetária,
257 todas as bolsas do grupo I e II apresentaram valores acima de $5,3 \times 10^{10}$ /unidade no último
258 dia de estocagem. Estes valores foram discretamente inferiores aos relatados em estudos
259 veterinários prévios (ABRAMS-OGG et al., 1993; ALLYSON et al., 1997; ULATA, 2005;
260 GONÇALVES, 2006), entretanto, ainda não foram estabelecidos valores específicos para
261 CP caninos. Diminuições das contagens de plaquetas também foram descritas em CP
262 humanos estocados durante apenas dois dias (NEIVA et al., 2003). Em um estudo médico,
263 Tostes et al. (2008), encontraram reduções significativas na concentração de plaquetas em
264 CP estocados por 5 dias, atribuindo a este fato a formação de microagregados plaquetários,
265 lise celular e alterações metabólicas durante o armazenamento. No entanto, diminuições nas
266 contagens plaquetárias não foram relatadas em estudos veterinários que avaliaram CP
267 estocados durante 5 dias (ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006) e 7 dias (ALLYSON et al.,
268 1997).

269 Todas as bolsas de CP utilizadas neste estudo apresentaram índice de hematócrito
270 <1% e baixa contagem de hemácias, semelhante aos valores de estudos veterinários prévios
271 (ALLYSON et al., 1997; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006). A presença de hemácias
272 nas bolsas pode influenciar na incompatibilidade do CP durante a transfusão, consumir
273 nutrientes e diminuir o pH da bolsa, já que as hemácias mantêm seu metabolismo durante a
274 estocagem (ULATA, 2005).

275 Preconiza-se um número reduzido de leucócitos nas bolsas de CP, pois, além dos
276 riscos já descritos anteriormente, a presença de leucócitos em número significativo pode
277 alterar o meio promovendo redução do pH, aumento do consumo de glicose e da produção
278 de ácido lático (ALLYSON et al., 1997; SINGH et al., 2009; TYNNGARD, 2009). A

279 contagem de leucócitos no momento controle nos dois grupos foi de $0,3 \times 10^8$ /unidade,
280 número próximo ao obtido em CP humanos ($0,4$ a $0,5 \times 10^8$ leucócitos/unidade) e caninos
281 ($0,4$ a $0,8 \times 10^8$ leucócitos/unidade) obtidos pelo mesmo método de centrifugação
282 (ULATA, 2005; TOSTES et al., 2008; SINGH et al., 2009). Neste estudo, houve
283 diminuição no número de leucócitos durante o período de estocagem, demonstrando uma
284 perda dessas células durante o armazenamento. Em estudo médico realizado por Tostes et
285 al. (2008), também foi observada uma diminuição significativa do número de leucócitos
286 durante a estocagem de CP por 5 dias.

287 Uma baixa contagem de hemácias e leucócitos nas bolsas pode ser atribuída ao
288 método de centrifugação e separação do PRP (ABRAMS-OGG et al., 1993; ALLYSON et
289 al., 1997). Neste estudo, após a primeira centrifugação, a extração do plasma foi
290 interrompida quando a fase de separação plasma/hemácias encontrava-se a 2 cm do topo da
291 bolsa, evitando-se que houvesse contaminação do PRP por leucócitos durante a extração.

292 A mensuração do pH em CP é um dos parâmetros mais importantes para a
293 utilização ou descarte das bolsas para transfusão, já que influencia diretamente a
294 viabilidade plaquetária (VAN DE MEER et al., 2001; TYNNGARD, 2009). Para a
295 avaliação do pH dos CP caninos optou-se por utilizar a fita de pH (Merck®), referenciada
296 em alguns estudos em bancos de sangue humanos como uma técnica fidedigna, simples,
297 rápida e que necessita de um pequeno volume de amostra, possibilitando uma avaliação
298 contínua das bolsas sem a necessidade da abertura do sistema (BUCHIGNANI et al., 1998;
299 MATSUBAYASHI et al., 1999; HAY & BRECHER, 2004; GUERIN & BURTET, 2006).
300 No último dia de estocagem, foi realizada também a mensuração do pH por meio de um
301 pHmetro. Os resultados obtidos por meio da fita apresentaram indicações próximas aos do
302 pHmetro, sendo portanto, um adequado método de avaliação do pH em bolsas de CP
303 caninos.

304 Neste estudo, houve diminuição do pH durante o período de estocagem nos dois
305 grupos, sendo que a diminuição foi mais significativa no grupo estocado até o 7º dia. Em
306 um estudo realizado por Klein et al. (1999), foram avaliados 22 CP caninos estocados
307 durante 10 dias a 22°C e os autores observaram diminuições significativas do pH (abaixo de
308 6,3) a partir do 5º dia de estocagem. Os autores concluíram que as mudanças bioquímicas

309 que ocorrem nos CP caninos durante o armazenamento são semelhante as que ocorrem em
310 CP humanos.

311 A visualização do *swirling* é um método simples e não invasivo, que avalia
312 indiretamente da manutenção da morfologia e função plaquetárias durante a estocagem dos
313 CP (HERVIG et al., 1999). Assim como o pH, o *swirling* diminuiu com o tempo de
314 armazenamento nos dois grupos, tendo ocorrido reduções mais significativas nas bolsas
315 armazenadas até o 7º dia. A correlação positiva entre pH e *swirling* observada no presente
316 estudo também foi descrita em trabalhos humanos e veterinários (HERVIG et al., 1999;
317 DIJKSTRA-TIEKSTRA et al., 2004; ULATA, 2005; DEVINE & SERRANO, 2010). As
318 bolsas de CP que apresentaram, no último dia de estocagem, valores de pH acima de 6,4
319 apresentaram escore de *swirling* maior ou igual a 2, demonstrando boa viabilidade e função
320 plaquetárias. Nas bolsas que apresentaram valores de pH entre 6,4 e 6,2 observou-se escore
321 de *swirling* igual a 1, e em CP que apresentaram pH inferior a 6,2, o escore de *swirling* foi
322 zero. Estes resultados reforçam a relação direta entre o pH e a avaliação da função
323 plaquetária em CP.

324 Durante o período de estocagem das bolsas de CP, as plaquetas caninas mantêm seu
325 metabolismo, consumindo a glicose presente no meio e reduzindo o pH (ALLYSON et al.,
326 1997; GUERIN & BURTET, 2006; DEKKERS et al., 2007; ZHANG et al., 2008). Houve
327 diminuição significativa nos níveis de glicose durante a estocagem nos dois grupos,
328 demonstrando o consumo deste componente durante o armazenamento. A correlação direta
329 entre os valores de glicose, pH e *swirling* demonstram a interação desses parâmetros
330 químicos e físicos analisados nas bolsas de CP caninos, que envolvem diretamente o
331 metabolismo celular, a morfologia das plaquetas e sua viabilidade durante a estocagem.

332

333 **CONCLUSÃO**

334 Durante o período de estocagem de CP caninos é importante a análise das suas
335 características físicas e químicas para um adequado controle de qualidade.

336 O tempo de armazenamento das bolsas influi diretamente nessas características,
337 quanto maior o período, mais intensas são as alterações. Desta forma, as bolsas de CP
338 caninas podem ser estocadas por até 7 dias, atentando-se ao fato de que há uma diminuição
339 mais evidente da viabilidade e função plaquetárias pelo prolongamento do tempo de

340 armazenamento. O período de 5 dias mostrou ser um tempo adequado para a estocagem CP
341 caninos, com a manutenção da qualidade das bolsas.

342 Na medicina transfusional, não há um exame específico que, utilizado isoladamente,
343 seja capaz de avaliar todos os parâmetros relacionados à qualidade das bolsas de CP, sendo
344 necessária a combinação de várias análises para que se obtenham informações sobre a
345 viabilidade das plaquetas estocadas. Para a avaliação de CP caninos em hemocentros
346 veterinários, sugere-se que sempre seja realizada a mensuração do pH, contagem de
347 plaquetas e observação do *swirling*. Na Medicina Veterinária, embora existam poucos
348 estudos na área, é importante que protocolos sejam estabelecidos, técnicas avaliadas e
349 parâmetros específicos sejam relatados.

350

351 **AGRADECIMENTO**

352 À FAPESP pelo suporte financeiro.

353

354 **REFERENCIAS**

355 ABRAMS-OGG, A.C.G.; KRUTH, S.A.; CARTER, R.F. et al. Preparation and transfusion
356 of canine platelet concentrates. *Am. J. Vet.Res.*, v. 54, p. 635-642, 1993.

357 ABRAMS-OGG, A.C.G. Practical blood transfusion. In: DAY, M.; MACKIN, A.,
358 LITTLEWOOD, J. (Ed.). *Manual of canine and feline haematology and transfusion*
359 *medicine*. Iowa: Blackwell Publishing, 2000. p.263-303.

360 ABRAMS-OGG, A.C.G. Triggers for prophylactic use of platelet transfusion and optimal
361 platelet dosing in thrombocytopenic dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim.*
362 *Pract.*, v.33, n.6, p.1401-1418, 2003.

363 ALLYSON, K.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; JOHNSTONE, I.B. Room temperature storage
364 and cryopreservation of canine platelet concentrates. *Am. J. Vet. Res.*, v.58, p.1338-1347,
365 1997.

366 ANVISA. Resolução RDC nº153, de 14 de junho de 2004. Determina o regulamento
367 técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a colheita, o processamento, a
368 testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de
369 sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e
370 da medula óssea. Disponível em: <www.anvisa.org.br>. Acesso em: 05 nov. 2010.

- 371 BUCHIGNANI, M.R.; DEFFUNE, E.; MASTRANJO, G.C. Controle de qualidade de
372 concentrados de plaquetas. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.30, n.3, p.137-140, 1998.
- 373 CARDIGAN, R.; TURNER, C.; HARRISON, P. Current methods of assessing platelet
374 function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang.*, v.88, p.153-163, 2005.
- 375 DEKKERS, D.W.C.; DE CUYPER, I.M.; VAN DE MEER, P.F. et al. Influence of pH on
376 stored human platelets. *Transfusion*, v.47, p.1889-1895, 2007.
- 377 DEVINE, D.V.; SERRANO, K. The platelet storage lesion. *Clin. Lab. Med.*, v.30, p.475-
378 487, 2010.
- 379 DIJKSTRA-TIEKSTRA, M.J.; PIETERSZ, R.N.I.; HUIJGENS, P.C. Correlation between
380 the extent of platelet activation in platelet concentrates and *in vitro* and *in vivo* parameters.
381 *Vox Sang.*, v.87, p.257-263, 2004.
- 382 GONÇALVES, S. *Reações transfusionais após a administração de concentrados de*
383 *plaquetas em cães*. 2006. 94f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) -
384 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 385 GUERIN, G.D.; BURTET, L.P. Avaliação de concentrados de plaquetários produzidos
386 pelo serviço de hemoterapia do Hospital Santo Ângelo: implantação de um sistema de
387 controle de qualidade. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.38, n.4, p.287-292, 2006.
- 388 GULLIKSSON, H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of
389 platelets. *Transfus. Med. Rev.*, v.17, n.3, p.209-215, 2003.
- 390 HERVIG, T.; BAKKEN, A.M.; FARSTAD, M. The *swirling* phenomenon in stored
391 platelets is influenced by their endogenous serotonin. *Transfus. Med.*, v.9, p.139-145, 1999.
- 392 HAY, S.N.; BRECHER, M.E. Validation of pH and glucose determination for bacteria
393 detection screening in platelet concentrates stored in the Terumo Teruflex XT612 platelet
394 container. *Transfusion*, v.44, p.1395, 2004.
- 395 JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea&Febiger, 1993. 417p.
- 396 KAUFMAN, R. M. Platelets: testing, dosing and the storage lesion – recent advances.
397 *Hematology*, p.492-496, 2006.
- 398 KLEIN, A.; ADAMIK, A.; MISCHKE, R. Changes in platelet concentrates from dogs due
399 to storage I. Platelet count *in vitro* function. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, v.112,
400 p.243-253, 1999. (Abstract).

- 401 LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M. et al. *Guia para identificação de*
402 *fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier, 1998. 445p.
- 403 LINDAHL, T.L.; RAMSTROM, S. Methods for evaluation of platelet function. *Transfus.*
404 *Apher. Sci.*, v.41, p.121-125, 2009.
- 405 MATHAI, J. Problem of bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfus. Apher.*
406 *Sci.*, v.41, p.139-144, 2009.
- 407 MATSUBAYASHI, H.; WEIDNERA, J.; MIRAGLIAA, C.C. et al. Platelet membrane
408 early activation markers during prolonged stored. *Thromb. Res.*, v.93, p.151-160, 1999.
- 409 MAURER-SPUREJ, E.; LABRIE, A.; BROWN, K. Routine quality testing of blood
410 platelet transfusions with dynamic light scattering. *Part. Part. Syst. Charact.*, v.25, p.99-
411 104, 2008.
- 412 MOHAMMADI, T.; PIETERSZ, R.N.I.; SCHOLTALBERS, L.A.H. et al. Optimal
413 sampling time after preparation of platelet concentrates for detection of bacterial
414 contamination by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Vox Sang.*, v.89, p.208-
415 214, 2005.
- 416 NEIVA, T.J.C.; MACHADO, M.J.; HOEHN, M. et al. Evaluation of platelet aggregation in
417 platelet concentrates: storage implications. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.25, n.4, p.207-
418 212, 2003.
- 419 PALAVECINO, E.L.; YOMTOVIAN, R.A.; JACOBS, M.R. Bacterial contamination of
420 platelets. *Transfus. Apher. Sci.*, v.42, p.71-82, 2010.
- 421 QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E. et al. *Microbiologia veterinária e doenças*
422 *infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- 423 SANDGREN, P.; HANSSON, M.; GULLIKSSON, H. et al Storage of buffy-coat-derived
424 platelets in additive solutions at 4°C and 22°C: flow cytometry analysis of platelet
425 glycoprotein expression. *Vox Sang.*, v.93, p.27-36, 2007.
- 426 SHANWELL, A.; DIEDRICH, D.; FALKER, C. et al. Paired *in vitro* and *in vivo*
427 comparison of apheresis platelet concentrates stored in platelet additive solution for 1
428 versus 7 days. *Transfusion*, v.46, p.973-979, 2006.
- 429 SINGH, H.; CHAUDHARY, R.; RAY, V. Platelet indices as quality markers of platelet
430 concentrates during storage. *Clin. Lab. Haematol.*, v.25, p.307-310, 2003.

- 431 SINGH, R.P.; MARWAHA, N.; MALHOTRA, N. et al. Quality assessment of platelet
432 concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet
433 concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. *Asian J. Transfus. Sci.*, v.3, n.2, p.86-94,
434 2009.
- 435 SLICHTER, S.J. Platelet transfusion: future directions. *Vox Sang.*, v.87, p.47-51, 2004.
- 436 SPUREJ, M.E.; CHIPPERFIELD, K. Past and futures approaches to assess the quality of
437 platelets for transfusion. *Transfus. Med. Rev.*, v.21, n.4, p.295-306, 2007.
- 438 STOMER, M.; KLEESIEK, K.; DREIER, J. pH value promotes growth of *Staphylococcus*
439 *epidermidis* in platelet concentrates. *Blood Components*, v.48, p.836-846, 2008.
- 440 TOSTES, M.A.V.; TOSTES JUNIOR, S.; PEREIRA, G.A. et al. Influência da colheita, da
441 produção e da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. *Rev. Bras. Hematol.*
442 *Hemoter.*, v.30, n.5, p.367-373, 2008.
- 443 TYNNGARD, N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrate. *Transfus.*
444 *Apher. Sci.*, v.41, p.97-104, 2009.
- 445 ULATA, S. K. *Determinação in vitro da atividade do Fator de Necrose Tumoral (TNF) em*
446 *concentrados de plaquetas em cães. Fracionamento do sangue total. Banco de Sangue*
447 *Veterinário*. 2005. 113f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de
448 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 449 VAN DE MEER, P.F.; VAN ZANTEN, A.P.; PIETERSZ, R.N.I. et al. Variation of pH-
450 measurement in platelet concentrates. *Transfus. Med.*, v.11, p.49-54, 2001.
- 451 ZHANG, J.G.; CARTER, C.J.; CULIBRK, B. et al. Buffy-coat platelet variables and
452 metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Blood Components*, v.48, p.847-
453 856, 2008.
- 454

455

456 Tabela 1. Avaliação dos parâmetros de qualidade em concentrados de plaquetas caninos
 457 (média \pm D.P.) por meio de contagens celulares e mensurações de glicose, pH (fita
 458 MercK[®]) e *swirling*, no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem.

	Momentos	
	M0	5º dia
Plaqueta x 10¹⁰/ unidade	5,9 (\pm 1,4) ^a	5,4 (\pm 0,4) ^b
Hemácias x 10¹⁰/unidade	0,6 (\pm 0,4) ^a	0,4 (\pm 0,3) ^a
Leucócitos x 10⁸/unidade	0,3 (\pm 0,3) ^a	0,1 (\pm 0,1) ^b
Glicose (mg/dL)	456 (\pm 80) ^a	388 (\pm 121) ^b
pH	7,0 (\pm 0,1) ^a	6,7 (\pm 0,2) ^b
Swirling (escore 0 a 3)	100% (3)	9% (1); 55% (2); 36% (3)

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

460

461

462 Tabela 2. Avaliação dos parâmetros de qualidade em concentrados de plaquetas caninos
 463 (média \pm D.P.) por meio de contagens celulares e mensurações de glicose, pH (fita
 464 MercK[®]) e *swirling*, no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem.

	Momentos	
	M0	7º dia
Plaqueta x 10¹⁰/ unidade	5,8 (\pm 0,6) ^a	5,3 (\pm 0,3) ^b
Hemácias x 10¹⁰/unidade	0,4 (\pm 0,5) ^a	0,4 (\pm 0,2) ^a
Leucócitos x 10⁸/unidade	0,4 (\pm 0,3) ^a	0,1 (\pm 0,1) ^b
Glicose (mg/dL)	452 (\pm 90) ^a	340 (\pm 96) ^b
pH	7,01(\pm 0,1) ^a	6,5 (\pm 0,2) ^b
Swirling (escore 0 a 3)	100% (3)	27% (0); 27% (1); 46% (2)

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

466

Capítulo 3

2 **Avaliação da função plaquetária e expressão da GPIIbIIIa em concentrados de**
3 **plaquetas caninos estocados**

4 Avaliação de concentrados de plaquetas caninos

5
6 CARLA C.M. RIANI COSTA¹; MARJORIE A. GOLIM²; REGINA K. TAKAHIRA^{1*}

7 ¹ Departamento de Clínica Veterinária - Laboratório Clínico Veterinário, Faculdade de
8 Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, campus de Botucatu; ²Hemocentro,
9 Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, campus de Botucatu Distrito de
10 Rubião Jr., s/nº, caixa postal 560, CEP:18618-970, Botucatu, SP, Brasil. E-mail:

11 takahira@fmvz.unesp.br *autor para correspondência

12
13 **RESUMO**

14 A transfusão de concentrado de plaquetas é uma terapia que visa controlar episódios
15 de sangramento ativo em animais com trombocitopenia ou trombocitopatia. Durante o
16 período de estocagem das bolsas, as plaquetas sofrem alterações que devem ser analisadas.
17 O objetivo do presente estudo foi avaliar a função plaquetária pela técnica turbidimétrica de
18 agregação e a expressão da GPIIbIIIa por meio da citometria de fluxo, em concentrados de
19 plaquetas caninos estocados. Foram utilizadas 22 bolsas de sangue obtidas de cães
20 saudáveis, divididas em dois grupos, sendo um estocado por 5 dias e o outro por 7 dias. Foi
21 realizado o teste de agregação plaquetária, com os agonistas ADP e epinefrina, para
22 avaliação funcional das plaquetas. A avaliação da expressão da GPIIbIIIa na superfície
23 plaquetária foi realizada por meio de citometria de fluxo, com os anticorpos monoclonais
24 CD41 e CD61. Houve diminuição na resposta agregatória nos dois grupos durante o
25 período de estocagem, com o uso isolado ou associado aos agonistas. Na citometria de

26 fluxo, os anticorpos apresentaram uma alta porcentagem de fluorescência em todos os
27 momentos, e não houve variação significativa na média de intensidade de fluorescência
28 plaquetária. Conclui-se que durante o período de estocagem de concentrados de plaquetas,
29 há uma perda funcional das células devido à redução da resposta agregatória, e sugere-se a
30 utilização associada dos agonistas para a realização da técnica. Os anticorpos usados na
31 citometria de fluxo podem ser utilizados na avaliação da GPIIbIIIa de plaquetas caninas
32 durante os períodos de estocagem avaliados.

33

34 **Palavras-chave:** agregação plaquetária, cão, citometria de fluxo, concentrado de plaquetas,
35 plaquetas.

36

37 INTRODUÇÃO

38 Nas últimas décadas, tem ocorrido na Medicina Veterinária um aumento na
39 utilização de hemocomponentes em relação à transfusão do sangue total^{1,2}.

40 Os concentrados de plaquetas (CP) apresentam um volume reduzido (50 a 70mL) e
41 uma concentração maior de plaquetas em comparação com o sangue total ou com outros
42 hemocomponentes, possibilitando maiores benefícios para o paciente transfundido. O uso
43 de CP permite a transfusão de grandes quantidades dessas células, proporcionando um
44 incremento plaquetário maior em relação ao uso de outros hemocomponentes, além de
45 evitar complicações como hipervolemia, hiperproteinemia e outras reações transfusionais³.

46 A transfusão de plaquetas é uma terapia que visa controlar episódios de
47 sangramento ativo em animais que apresentam diminuição no número de plaquetas
48 circulantes (trombocitopenias) ou que apresentem disfunções plaquetárias qualitativas
49 (trombocitopatias)⁴. Também pode ser utilizada profilaticamente, na prevenção de um

50 possível sangramento causado por procedimentos cirúrgicos em animais
51 trombocitopênicos³.

52 Existem testes de avaliação da qualidade de CP em bancos de sangue, como a
53 mensuração do pH, glicose, contagem celular, entre outros. Estes testes possibilitam uma
54 análise mais criteriosa do hemocomponente a ser transfundido^{3,5}.

55 Para a avaliação funcional das plaquetas no CP, pode-se utilizar a prova de
56 agregação plaquetária. A agregação é um método clássico, que ainda nos dias de hoje, na
57 Medicina e na Medicina Veterinária, é considerado o método “padrão ouro” para a
58 avaliação funcional das plaquetas e a técnica de escolha é a turbidimetria^{6,7}.

59 A técnica turbidimétrica baseia-se na mensuração de mudanças na densidade óptica
60 do plasma, causadas pelo aumento da transmissão da luz por meio do plasma rico em
61 plaquetas (PRP), após a adição do agonista. O aparelho mensura a porcentagem de
62 agregação comparando a amostra de PRP com o plasma pobre em plaquetas (PPP) do
63 mesmo animal. Se todas as plaquetas da amostra agregarem, a transmissão de luz do PRP
64 será de 100% em relação ao PPP e uma curva será desenhada de acordo com esta resposta⁸.

65 Os agonistas mais citados na avaliação da agregação plaquetária em cães são o
66 ADP, epinefrina, fator ativador de plaquetas (PAF), ácido araquidônico, trombina,
67 ristocetina e colágeno. Estes agonistas podem ser utilizados isoladamente ou aos pares^{6,8,9}.

68 A avaliação da agregação plaquetária em cães pelo método turbidimétrico é
69 considerada uma técnica de importante relevância clínica, de fácil padronização e utilizada
70 frequentemente em estudos clínicos e em pesquisas^{6,8,10}. A agregação plaquetária é um teste
71 utilizado na avaliação funcional de plaquetas estocadas em bancos de sangue humanos e
72 estudos têm demonstrado que ocorrem diminuições da resposta agregatória em bolsas

73 estocadas^{12,13}. No entanto, são escassos os estudos que avaliaram a função plaquetária em
74 CP caninos^{5,11}.

75 Outro método utilizado na avaliação das plaquetas é a citometria de fluxo (CF)^{14,15}.
76 Na Medicina Veterinária, esta técnica possui importante aplicação na avaliação funcional,
77 estrutural e na ativação plaquetária em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*^{16,17,18,19}.

78 A citometria consiste em analisar amostras de células em suspensão marcadas com
79 anticorpos monoclonais específicos, ligados a fluocromos. A análise é realizada por meio
80 do citômetro de fluxo com a leitura das células baseando-se no tamanho (Forward Scatter -
81 FSC), granulosidade ou complexidade interna (Side Scatter - SSC) e fluorescência das
82 mesmas. Após a identificação e leitura da população celular da amostra, os sinais de
83 fluorescência são expressos em porcentagem de células positivas ou em média de
84 intensidade de fluorescência (MIF)^{18,20,21}.

85 A CF pode ser utilizada na análise plaquetária por meio da mensuração de
86 componentes granulares específicos, na expressão de receptores de membrana, e na
87 avaliação da resposta plaquetária à adição de agonistas^{10,16,17,22,23}. Mudanças na expressão
88 dos receptores de membrana, também chamados de glicoproteínas, são muito estudadas em
89 CP estocados em bancos de sangue humanos. As glicoproteínas plaquetárias
90 frequentemente avaliadas são a GPIb, GPIIbIIIa e GPIV, entre outras. Dentre os estudos
91 realizados em bancos de sangue humanos com CP, a avaliação da expressão da GPIIbIIIa
92 tem sido muito utilizada^{10,20,24,25}.

93 A GPIIbIIIa (CD41/CD61) é a principal e mais representativa glicoproteína na
94 superfície plaquetária. Ela é formada por um complexo de cadeias de polipeptídeos,
95 composta pelas subunidades Ib (CD41) e IIIa (CD61). Sabe-se que a plaqueta humana em

96 repouso apresenta aproximadamente 50.000 cópias da GPIIbIIIa na superfície da membrana
97 e 30.000 cópias ficam internalizadas na célula^{26,27,28}.

98 Na ativação plaquetária, a GPIIbIIIa muda sua conformação e expressão na
99 superfície da membrana, atuando como um receptor de interação entre as plaquetas e na
100 ligação das plaquetas com proteínas do subendotélio vascular. Portanto, esta glicoproteína é
101 fundamental no processo de adesão e agregação plaquetárias, funcionando como um
102 receptor na ligação com o fibrinogênio, fator de von Willebrand e fibronectina^{15,20}.

103 A identificação e expressão da GPIIbIIIa em plaquetas caninas estocadas também
104 pode ser um importante parâmetro de avaliação dessas células durante o armazenamento
105 em CP. No entanto, apesar dos estudos realizados em bancos de sangue humanos, até o
106 presente momento não foram encontrados estudos que tenham avaliado esses parâmetros
107 em CP caninos pela citometria de fluxo.

108 A expressão deste receptor depende da natureza e intensidade dos estímulos que
109 ativam as plaquetas, podendo estes estímulos desencadear aumentos ou não alterar a
110 expressão da glicoproteína. A diminuição na expressão da GPIIbIIIa também pode ocorrer,
111 embora estudos médicos tenham demonstrado que essas reduções não apresentaram
112 relevância sobre a função plaquetária^{26,27,28}.

113 Os anticorpos monoclonais podem se ligar a glicoproteína de diversas formas, como
114 por exemplo, reconhecendo todo o receptor na superfície plaquetária, ligando-se
115 especificamente às subunidades IIb e IIIa, ou reconhecendo sítios expostos pela
116 glicoproteína quando esta muda sua conformação na ativação plaquetária^{15,20}. Existe uma
117 grande variedade de anticorpos monoclonais vendidos comercialmente que são utilizados
118 na identificação da GPIIbIIIa em plaquetas humanas, embora apenas alguns anticorpos são
119 citados por apresentarem reação cruzada com plaquetas caninas^{19,23,29,30,31}.

120 Desta forma, torna-se importante a padronização de técnicas para a utilização de
121 anticorpos monoclonais que identifiquem a GPIIbIIIa em plaquetas caninas estocadas em
122 CP, permitindo a avaliação de mudanças na expressão desta glicoproteína durante o período
123 de estocagem e possibilitando outras avaliações de viabilidade e ativação plaquetárias em
124 estudos futuros.

125 O objetivo do presente estudo foi avaliar a função plaquetária pela técnica
126 turbidimétrica de agregação com o uso de ADP e epinefrina, e avaliar a expressão da
127 GPIIbIIIa por meio da citometria de fluxo, em CP caninos durante o período de estocagem
128 de 5 e 7 dias.

129

130 **MATERIAL E MÉTODOS**

131 Foram utilizados 22 cães hígdos, com peso mínimo de 25 kg, machos e fêmeas,
132 com idade entre 1 e 8 anos, de diversas raças, provenientes do canil da FMVZ – Unesp -
133 campus de Botucatu ou de proprietários voluntários. Estes animais foram avaliados quanto
134 ao estado de higidez por meio de avaliação clínica, hemograma, exames bioquímicos
135 (uréia, creatinina, ALT, FA, GGT, proteínas totais e albumina) e PCR para *Ehrlichia sp.*
136 Todos os cães possuíam vacinação anual e vermifugação semestral atualizadas e sem
137 histórico de uso de medicamento nos últimos dois meses. O estudo foi aprovado pela
138 Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e
139 Zootecnia – Unesp – campus de Botucatu, protocolo nº166/2008 - CEEA

140 A colheita do sangue foi realizada pela venopunção da jugular, após tricotomia e
141 antisepsia local. Utilizou-se o método gravitacional para o preenchimento da bolsa de
142 sangue, com homogeneização mecânica durante todo o procedimento. O tempo médio de
143 colheita foi de 8 minutos. Foram utilizadas bolsas de sangue triplas de plástico, com

144 anticoagulante CPDA-1, sendo a bolsa principal com capacidade para 450 ± 50 mL de
145 sangue total (JP Indústria Farmacêutica®). A pesagem das bolsas durante a colheita foi
146 realizada em balança digital, atingindo-se o peso final 560 ± 5 gramas, correspondendo a
147 cerca de 450mL de sangue total.

148 O sangue fresco total obtido foi processado em até três horas após a colheita,
149 para obtenção do CP. As duas centrifugações da bolsa foram realizadas a 22°C (ROTANTA
150 460RS - Hettich®). Na primeira centrifugação da bolsa de sangue total, foi utilizada uma
151 força centrífuga relativa de 1.000g durante 8 minutos e 30 segundos (incluindo o tempo de
152 aceleração de 2 minutos e 30 segundos), para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP),
153 caracterizando a centrifugação leve. O PRP foi separado do concentrado de hemácias e
154 transferido para a bolsa satélite específica para plaquetas. Em seguida, foi feita a segunda
155 centrifugação a partir do PRP durante 11 minutos a 2.000g (incluindo o tempo de
156 aceleração de 1 minuto). O sobrenadante ou plasma pobre em plaquetas (PPP), foi
157 transferido para outra bolsa satélite, obtendo-se o concentrado de plaquetas com um peso
158 médio de 67 gramas. O PPP de cada animal foi armazenado em freezer (-20°C) para sua
159 posterior utilização na técnica de agregação plaquetária.

160 O concentrado de plaquetas foi mantido em repouso durante 60 minutos para
161 promover a desagregação plaquetária. Após este período, a bolsa foi armazenada sob
162 agitação constante em um homogeneizador de plaquetas rotacional (AP30 - PRESVAC®)
163 em ambiente climatizado à temperatura de 22 a 24°C.

164 Foram constituídos dois grupos experimentais, sendo o grupo I (n=11)
165 concentrados de plaquetas armazenados durante 5 dias e o grupo II (n=11) concentrados de
166 plaquetas armazenados por 7 dias. Os dois grupos foram submetidos às análises de
167 avaliação da agregação plaquetária e análise da expressão da GPIIbIIIa no momento

168 controle, logo após a colheita, e no quinto (grupo I) e sétimo (grupo II) dias de
169 armazenamento. Não houve isolamento de microorganismos (bactérias aeróbicas,
170 anaeróbicas ou fungos) durante o período de estocagem nos dois grupos.

171 O teste de agregação plaquetária foi realizado pela técnica turbidimétrica, em
172 um agregômetro de plaquetas (NETLAB 2000 – ZÊNITE®). A agregação plaquetária foi
173 realizada mediante adição dos agonistas ADP (ADP reagent – Sigma Diagnostics®) e
174 epinefrina (Epinefrine reagent – Helena Diagnostics®), nas concentrações 200µM/mL e
175 3mM/mL respectivamente. A amostra colheitada da bolsa de CP foi ajustada para uma
176 contagem de 200 a 300 x 10³ plaquetas/µL, com o PPP autólogo. 450µL do concentrado
177 plaquetário ajustado foram incubados em uma cubeta de vidro contendo uma barra
178 magnética, a 37°C durante 5 minutos. Após este período, os agonistas foram adicionados,
179 sendo 25µL de ADP e 25 µL de epinefrina quando associados e 50µL de ADP ou
180 epinefrina quando utilizados isoladamente. A calibração do aparelho foi realizada com o
181 PPP autólogo de cada amostra e a resposta das plaquetas frente aos agonistas foi mensurada
182 durante 5 minutos e expressa em porcentagem de agregação³².

183 Para a avaliação por meio da citometria de fluxo, foram preparadas três
184 alíquotas de cada bolsa em cada momento de avaliação e utilizando-se dois anticorpos
185 monoclonais na identificação da GPIIb/IIIa, CD61-FITC (clone Y2/51, Dako®, CA) e
186 CD41/FITC (clone 5B12, Dako®, CA). As amostras foram diluídas em solução tampão de
187 PBS filtrado para padronização da contagem plaquetária em 100 a 150 x 10³ plaquetas/µL.
188 Em seguida, dois tubos contendo 100µL cada desta solução foram incubados, um com
189 10µL do anticorpo monoclonal CD61 e o outro com 10µL do anticorpo monoclonal CD41,
190 no escuro e em temperatura ambiente (24°C) durante 15 minutos³¹. Como controle
191 autofluorescente, foi utilizado um tubo contendo 100µL da solução, incubado durante 15

192 minutos sob as mesmas condições. Ao final do período de incubação, cada amostra foi
193 diluída em 500µL de solução tampão PBS filtrado e a leitura realizada imediatamente após
194 a diluição no citômetro de fluxo.

195 As análises foram realizadas no citômetro de fluxo (FACScalibur[®] BD,
196 Hemocentro na Faculdade de Medicina da Unesp, Botucatu), e os dados processados no
197 programa CellQuest[®] (BD). A população de plaquetas foi selecionada por “gates”
198 excluindo a marcação autofluorescente, usando-se os parâmetros de tamanho (FSC),
199 granulosidade (SSC) e positividade de fluorescência, contada em 20.000 eventos. Os
200 resultados obtidos em porcentagem de células marcadas pelos anticorpos e a média de
201 intensidade de fluorescência (MIF) foram expressos em histogramas.

202 Os resultados foram submetidos à análise descritiva e as médias dos momentos
203 foram comparadas pelo teste t pareado. As comparações entre os grupos foram realizadas
204 por meio do teste t. Todas as análises foram realizadas ao nível de 5% de significância, no
205 software SIGMASTAT[®].

206

207 **RESULTADOS**

208 As porcentagens de agregação dos dois grupos estão descritas nas tabelas 1 e 2.
209 Houve diminuição na resposta agregatória estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o
210 momento controle e o último dia de estocagem, no grupo I e II, pela adição isolada e
211 concomitante de ADP e epinefrina. Não houve diferença entre os momentos controle e
212 entre o 5º e 7º dias de estocagem, nos dois grupos. Apesar de não haver diferença
213 estatisticamente significativa, observou-se uma resposta plaquetária potencializada com o
214 uso concomitante do ADP e epinefrina, em relação ao uso isolado dos agonistas.

215 A porcentagem média de plaquetas marcadas pelos anticorpos monoclonais CD41 e
216 CD61 na análise por CF variou de 96 a 99% em todos os momentos nos dois grupos. Não
217 houve variação estatisticamente significativa ($p>0,05$) na porcentagem de plaquetas
218 marcadas pelos anticorpos CD61 e CD41, sendo obtida uma intensa marcação pelos
219 anticorpos em todos os momentos. Não houve diferença estatisticamente significativa
220 ($p>0,05$) em relação a MIF dos anticorpos monoclonais entre os momentos estudados e
221 entre os grupos.

222

223 **DISCUSSÃO**

224 Na técnica de agregação plaquetária, o ADP e a epinefrina foram escolhidos como
225 agonistas, devido a sua ampla utilização em estudos veterinários e por eles interagirem em
226 diferentes vias da ativação plaquetária^{6,8,9,33}. O ADP estimula a agregação pela indução de
227 mudanças conformacionais na glicoproteína GPIIb/IIIa promovendo a exposição do sítio de
228 ligação do fibrinogênio, e a epinefrina atua na estimulação de receptores de membrana alfa
229 2 adrenérgicos⁹.

230 No presente estudo, a resposta agregatória com o uso isolado ou concomitante dos
231 agonistas apresentou diminuição significativa nos dois grupos, sugerindo que o
232 armazenamento e o tempo de estocagem são deletérios a função das plaquetas caninas.
233 Estudos veterinários que avaliaram CP caninos também observaram diminuições
234 significativas da agregação após o 4º dia de estocagem^{5,11}.

235 Nos CP avaliados no presente estudo, a agregação plaquetária com o uso dos
236 agonistas ADP e epinefrina isoladamente foram semelhantes entre si, e induziram uma
237 fraca resposta agregatória. Em um estudo veterinário realizado por Allyson et al. (1997), a
238 agregação plaquetária em CP caninos foi avaliada nos dias 0, 3, 5 e 7 de estocagem, pela

239 adição isolada e concomitante de ADP, colágeno e PAF. A resposta agregatória média em
240 relação ao uso isolado do ADP foi de aproximadamente 20% nos dias 0 e 5, e 15% no dia
241 7, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os momentos.

242 Resultados semelhantes na porcentagem de agregação foram obtidos em estudos
243 médicos. NEIVA et al. (2003) avaliando a agregação plaquetária em CP, empregaram como
244 agonistas plaquetários o colágeno, ADP e epinefrina isoladamente, e obtiveram índices de
245 agregação no 5º dia de 15%, 4% e 3% respectivamente. MIYAJI et al. (2004) avaliaram a
246 agregação plaquetária em CP colhidos por aférese estocados durante 3 dias, pela adição de
247 ADP e colágeno separadamente, e a média (\pm D.P.) de agregação obtida com o ADP no
248 último dia foi $17,6 \pm 9,3\%$. Em outro estudo, realizado por AKAY et al. (2007), dois grupos
249 de bolsas CP foram avaliados em relação à função plaquetária pela agregação com ADP e
250 colágeno, e em relação à ativação plaquetária por meio da citometria de fluxo. Em relação à
251 resposta agregatória, houve uma redução funcional significativa das plaquetas durante o
252 período de estocagem, sendo que as médias (\pm D.P.) obtidas no 5º dia com o uso do ADP
253 foram $25 \pm 17\%$ e $13 \pm 18\%$. Não foram encontrados estudos com CP caninos utilizando a
254 epinefrina isolada ou associada ao ADP.

255 Apesar do ADP e epinefrina isoladamente demonstrarem uma capacidade reduzida
256 em induzir agregação em plaquetas caninas, a associação desses agonistas tem demonstrado
257 promover uma potencialização constante e irreversível da agregação, em estudos clínicos
258 veterinários^{6,8,9,33}.

259 As avaliações da agregação plaquetária nos grupos I e II com o uso concomitante do
260 ADP e epinefrina, apresentaram uma resposta agregatória mais intensa em relação ao uso
261 isolado dos agonistas. Embora no estudo veterinário realizado por Allyson et al. (1997)
262 tenham sido utilizados pares de agonistas diferentes (ADP, colágeno e PAF), os autores

263 também observaram potencialização da agregação com o uso associado dos agonistas
264 plaquetários e diminuição significativa da resposta durante a estocagem. No entanto, em
265 um estudo médico realizado por Tostes et al. (2008), foram obtidas porcentagens de
266 agregação plaquetária mais elevadas com a utilização concomitante do ácido araquidônico
267 e ADP ou epinefrina. Estes autores concluíram que as porcentagens de agregação (40 a
268 60%) foram maiores que as de outros estudos médicos, devido ao uso concomitante desses
269 agonistas.

270 A análise plaquetária pela CF pode fornecer informações importantes sobre a
271 viabilidade dessas células estocadas em CP. O presente estudo avaliou a expressão da
272 GPIIbIIIa, com a utilização de dois anticorpos monoclonais, CD61 e CD41, que ligam-se
273 separadamente à subunidades IIb e IIIa. As avaliações demonstraram que as plaquetas
274 caninas são intensamente marcadas por esses anticorpos e que não houve variação na
275 expressão da glicoproteína durante a estocagem, nos dois grupos.

276 Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados com CP
277 provenientes de bancos de sangue humanos. Em estudo realizado por Sandgren et al.
278 (2007), foram analisadas a expressão da GPIIbIIIa, entre outros receptores, através do uso
279 de anticorpos monoclonais CD41 e CD61 em plaquetas estocadas. Durante o período de
280 estocagem de 7 dias, não houve diferença significativa na expressão do CD61 e do CD41.
281 AKAY et al. (2007) também avaliaram a ativação plaquetária em CP pela citometria de
282 fluxo, porém com a adição de agonistas, e não foram encontradas variações significativas
283 na expressão do CD41 durante o armazenamento. WANG et al. (1999) avaliaram CP
284 estocados por 5 dias, utilizando vários marcadores, dentre eles o CD41, na avaliação das
285 plaquetas em repouso e estimuladas pela trombina. Foram encontradas variações na
286 expressão dos outros marcadores utilizados, no entanto, a expressão do CD41 não variou

287 durante o período de estocagem, condizendo com os resultados do presente estudo. Outro
288 estudo que avaliou a ativação plaquetária pela CF em CP obtidos por três métodos de
289 separação diferentes, não observou alterações na expressão da GPIIbIIIa pelo CD41,
290 durante os 8 dias de estocagem. No entanto, variações significativas ocorreram com outros
291 marcadores de superfície, como CD62P, CD42 e anexina V, demonstrando que alterações
292 plaquetárias ocorrem durante a estocagem e que a citometria de fluxo é uma ferramenta
293 importante nesta avaliação²⁴.

294 Contrariamente a estes resultados, em um estudo médico realizado por Lozano et al.
295 (1999) foi demonstrada uma redução de 25% na expressão da GPIIbIIIa durante o período
296 de estocagem de 5 dias, atribuindo esta redução às lesões plaquetárias ocorridas durante o
297 período de estocagem em bolsas obtidas pela centrifugação do PRP. No entanto, os autores
298 afirmam que pelas análises concomitantes com marcadores adesivos e coesivos
299 plaquetários, essa redução na expressão da GPIIbIIIa não influenciou a capacidade
300 funcional das plaquetas.

301 Em estudo veterinário realizado por Wilkerson & Shuman (2001), utilizando tubos
302 de EDTA com sangue total estocados a 4°C durante 3 dias, os autores avaliaram a
303 expressão da GPIIbIIIa de plaquetas caninas, entre outros marcadores, com e sem a adição
304 de agonistas. Houve uma diminuição significativa na porcentagem de plaquetas positivas
305 para o CD61 durante a estocagem, nas amostras não estimuladas. Em 4 horas após a
306 colheita, 80% das plaquetas apresentaram positividade para CD61, em 24 horas de
307 estocagem esse valor caiu para 45% e após, os valores foram menores que 20%. Os autores
308 atribuíram essa redução na expressão da GPIIbIIIa pela internalização do receptor por
309 endocitose, já que quando estimuladas, as plaquetas voltaram a expressar uma maior
310 porcentagem do CD61. No entanto, em condições adversas de estocagem, temperatura e

311 utilização de anticoagulantes inadequados, as plaquetas podem sofrer alterações
312 conformacionais, funcionais e dissociação de seus receptores, levando a uma redução na
313 expressão dos mesmos. Estes fatores podem explicar a intensa redução na expressão da
314 glicoproteína observada no estudo citado. Como as plaquetas possuem a GPIIb/IIIa
315 distribuída externa e internamente na membrana plasmática e nos alfa-grânulos
316 citoplasmáticos, isso permite que, havendo um estímulo plaquetário, haja possibilidade de
317 uma maior exposição do receptor e um aumento de sua expressão na superfície²⁷.

318 Estudos que avaliem a capacidade hemostática plaquetária e a expressão de
319 receptores de membrana são importantes para a avaliação da viabilidade dessas células
320 durante a estocagem de CP, embora sejam escassos na Medicina Veterinária. A agregação
321 plaquetária em CP caninos apresenta baixa resposta agregatória, havendo uma redução da
322 função plaquetária ao longo do tempo, sugerindo que a estocagem e o tempo de
323 armazenamento das bolsas influenciam na função das plaquetas *in vitro*. O uso associado
324 dos agonistas promoveu uma maior porcentagem de agregação em todas as avaliações.
325 Assim, sugere-se o uso concomitante dos agonistas ADP e epinefrina na técnica de
326 agregação plaquetária em CP caninos.

327 A citometria de fluxo, assim como é utilizada na Medicina, possui diversas
328 aplicações na avaliação plaquetária de CP caninos, e novos estudos são necessários para
329 analisar essas células durante a estocagem. As plaquetas caninas estocadas em CP não
330 apresentam variação significativa na expressão da GPIIb/IIIa pelos anticorpos CD41 e
331 CD61, e possuem alta porcentagem de fluorescência por até 7 dias, possibilitando que
332 estudos futuros possam ser realizados na avaliação desse e de outros marcadores
333 plaquetários.

334

335 **AGRADECIMENTOS**

336 À FAPESP pelo suporte financeiro e à Faculdade de Medicina de Botucatu, por
337 realizar as análises no citômetro de fluxo.

338

339 **REFERENCIAS**

340 1. Kristensen A, Feldman BF. Bancos de Sangue e medicina transfusional. In: ETTINGER
341 SJ, FELDMAN EC, eds. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5th ed. Philadelphia: W.
342 B. Saunders Company; 2004:366-381.

343

344 2. Abrams-ogg ACG. Practical blood transfusion. In: DAY M, MACKIN A,
345 LITTLEWOOD J, eds. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine.
346 Iowa: Blackwell Publishing; 2000:263-303.

347

348 3. Abrams-ogg ACG. Triggers for prophylactic use of platelet transfusion and optimal
349 platelet dosing in thrombocytopenic dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract.
350 2003;33:1401-1418.

351

352 4. De Gopegui RR, Feldman BF. Use of blood and blood components in canine and feline
353 patients with hemostatic disorders. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1995;25:1387-
354 1399.

355

356 5. Allyson K, Abrams-ogg ACG, Johnstone IB. Room temperature storage and
357 cryopreservation of canine platelet concentrates. Am J Vet Res. 1997;58:1338-1347.

358

- 359 6. Brandao LP, Hasegawa MY, Hagiwara MK, et al. Platelet aggregation studies in acute
360 experimental canine ehrlichiosis. *Vet Clin Pathol.* 2006;35:78-81.
361
- 362 7. Nielsen LA, Zois NE, Pedersen HD, et al. Platelet function in dogs: breed differences
363 and effect of acetylsalicylic acid administration. *Vet Clin Pathol.* 2007;36:267-273.
364
- 365 8. Mischke R, Schulze U. Studies on platelet aggregation using the Born method in normal
366 and uraemic dogs. *Vet J.* 2004;168:270-275.
367
- 368 9. Harrus S, Waner T, Eldor A, et al. Platelet dysfunction associated with experimental
369 acute canine ehrlichiosis. *Vet Rec.* 1996;139:290-293.
370
- 371 10. Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci.* 2009;41:105-113.
372
- 373 11. Klein A, Adamik A, Mischke R. Changes in platelet concentrates from dogs due to
374 storage I. Platelet count *in vitro* function (Abstract). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*
375 1999;112:243-253.
376
- 377 12. Neiva TJC, Machado MJ, Hoehn M, et al. Evaluation of platelet aggregation in platelet
378 concentrates: storage implications. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003;25:207-212.
379
- 380 13. Miyaji R, Sakai M, Urano H, et al. Decreased platelet aggregation of platelet
381 concentrate during storage recovers in the body after transfusion. *Transfusion.*
382 2004;44:891-899.

383

384 14. Wang C, Mody M, Herst R, et al. Flow cytometric analysis of platelet function in stored
385 platelet concentrates. *Transfus Sci.* 1999;20:129-139.

386

387 15. Landi EP, Marques JJ. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de
388 plaquetas por citometria de fluxo. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003;25:39-46.

389

390 16. Brooks MB, Catalfamo JL, Brown HA, et al. A hereditary bleeding disorder of dogs
391 caused by a lack of platelet procoagulant activity. *Hemost Thromb Vasc Biol.*
392 2002;99:2434-2441.

393

394 17. Weiss DJ. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology.
395 *Vet Clin Pathol.* 2002;31:72-81.

396

397 18. Nakage APM, Santana AE, Cápuá MLB, et al. Metodologia e aplicação da citometria
398 de fluxo na hematologia veterinária. *Cienc Rural.* 2005;35:966-973.

399

400 19. Tarnow I, Kristensen AT, Krogh AKR, et al. Effects of physiologic agonists on canine
401 whole blood flow cytometry assays of leukocyte-platelet aggregation and platelet
402 activation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;123:345-352.

403

404 20. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, et al.. Evaluation of platelet function by flow
405 cytometry. *Methods.* 2000;21:259-270.

406

- 407 21. Tynngard, N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrate. *Transfus*
408 *Apher Sci.* 2009;41:97-104.
409
- 410 22. Tanaka KA. The assessment of platelet function. *Transfus Altern Transfus Med.*
411 2006;2:95-105.
412
- 413 23. Wills TB, Wardrop KJ, Meyers KM. Detection of activated platelets in canine blood by
414 use of flow cytometry. *Am J Vet Res.* 2006;67:56-63.
415
- 416 24. Metcalfe P, Williamson M, Reutelingsperger CPM, et al. Activation during preparation
417 of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric
418 study of different production methods (abstract). *Br J Haemathol.* 1997; 98: 86-95.
419
- 420 25. Lozano M, Estabanell E, Cid J, et al. Platelet concentrates prepared and stored under
421 currently optimal conditions: minor impact on platelet adhesive and cohesive functions
422 after storage. *Transfusion.* 1999;39:951-959.
423
- 424 26. Seghatchian J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. *Transfus Med Rev.*
425 1997;11:130-144.
426
- 427 27. Escolar G, White JG. Changes in glycoprotein expression after platelet activation:
428 differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *Thromb Haemost.* 2000;83:371-386.
429
- 430 28. Devine DV, Serrano K. The platelet storage lesion. *Clin Lab Med.* 2010;30:475-487.

431

432 29. Boudreaux MK, Panangala VS, Bourne C. A platelet activation-specific monoclonal
433 antibody that recognizes a receptor-induced binding site on canine fibrinogen. *Vet Pathol.*
434 1996;33:419-427.

435

436 30. Wilkerson M, Shuman W. Alteration in normal canine platelets during storage in
437 EDTA anticoagulated blood. *Vet Clin Pathol.* 2001;30:107-113.

438

439 31. Brooks MB, Randolph J, Warner K, et al. Evaluation of platelet function screening tests
440 to detect platelet procoagulant deficiency in dogs with Scott syndrome. *Vet Clin Pathol.*
441 2009;38:306-315.

442

443 32. Tostes MAV, Tostes Junior S, Pereira GA, et al. Influência da colheita, da produção e
444 da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. *Rev Bras Hematol Hemoter.*
445 2008;30:367-373.

446

447 33. Tarnow I, Kristensen AT, Lisbeth HO, et al. Dogs with heart diseases causing turbulent
448 high-velocity blood flow have changes in platelet function and von Willebrand factor
449 multimer distribution. *J Vet Intern Med.* 2005;19:515-522.

450

451 34. Akay OM, Gunduz E, Basyigit H, et al. Platelet function testing during 5-day storage of
452 single and random donor plateletpheresis. *Transfus Apher Sci.* 2007;36:285-289.

453

454 35. Sandgren P, Hansson M, Gulliksson H, et al. Storage of buffy-coat-derived platelets in
 455 additive solutions at 4°C and 22°C: flow cytometry analysis of platelet glycoprotein
 456 expression. Vox Sang. 2007;93:27-36.

457

458 **TABELA 1:** Valores médios (\pm D.P.) das porcentagens de agregação plaquetária no
 459 momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas do grupo I, com o uso isolado
 460 e concomitante do ADP e epinefrina.

Momentos		
	M0	5º dia
ADP	11.5 \pm 8.9 ^a	4.1 \pm 4.1 ^b
Epinefrina	11.1 \pm 6.0 ^a	4.5 \pm 3.7 ^b
ADP + Epinefrina	21.3 \pm 10.6 ^a	13.3 \pm 8.8 ^b

461 Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0.05$)

462

463 **TABELA 2:** Valores médios (\pm D.P.) das porcentagens de agregação plaquetária no
 464 momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem das bolsas do grupo II, com o uso isolado
 465 e concomitante do ADP e epinefrina.

Momentos		
	M0	7º dia
ADP	14.2 \pm 8.4 ^a	5.4 \pm 5.3 ^b
Epinefrina	14.7 \pm 6.3 ^a	4.4 \pm 3.7 ^b
ADP + Epinefrina	22.3 \pm 17.5 ^a	9 \pm 6.1 ^b

466 Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Capítulo 4

DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo, foram realizadas a padronização e validação das técnicas de centrifugação de bolsas de sangue canino para obtenção de concentrados de plaquetas. A padronização das técnicas utilizadas para a obtenção dos diferentes hemocomponentes é de suma importância para os hemocentros que as utilizam. Existem alguns protocolos descritos em literatura veterinária, no entanto, a validação do protocolo para cada banco de sangue é um procedimento necessário devido às diferenças das centrífugas utilizadas (ALLYSON et al., 1997; ABRAMS-OGG, 2000; ABRAMS-OGG, 2003; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006).

Os CP são hemocomponentes que, por serem estocados à temperatura ambiente, possuem maior risco de apresentarem multiplicação microbiana. Vários fatores relacionados à colheita, processamento e estocagem, podem permitir o ingresso de microrganismos nas bolsas de CP. Deste modo, essas etapas devem ser realizadas de forma criteriosa. Além dos cuidados adotados para prevenção de contaminações das bolsas, é importante que seja realizada uma avaliação microbiológica para confirmar a esterilidade e evitar septicemias em decorrência de transfusões (KAUFMAN, 2006; PALAVECINO et al., 2010). Neste estudo, todas as bolsas apresentaram resultado negativo para o isolamento de bactérias aeróbicas, anaeróbicas e fungos, desta forma, não foi possível estudar as possíveis alterações decorrentes da presença de agentes microbianos nos CP.

Não há um exame específico que, utilizado isoladamente, seja capaz de garantir a qualidade das bolsas de CP, sendo necessária a combinação de vários métodos diagnósticos para que se obtenham informações sobre a viabilidade das plaquetas estocadas. No presente estudo, verificou-se que a mensuração do pH e glicose, a avaliação do *swirling* e as contagens celulares são ferramentas importantes para esta avaliação. O consumo celular da glicose proveniente do metabolismo celular é o principal responsável pela diminuição do pH durante a estocagem, e estes fenômenos influenciam na manutenção da morfologia plaquetária detectada pela observação do *swirling* e na contagem de células.

Não existem valores estabelecidos para a contagem de hemácias e leucócitos em CP caninos, embora se objetive que este hemocomponente apresente baixa contagem para essas células. Também não existem valores estabelecidos para a contagem de plaquetas em CP caninos, e as normas da ANVISA (2004) estabelecem apenas valores

para CP humanos. Apesar da redução do número de plaquetas no presente estudo, as contagens de plaquetas foram discretamente inferiores aos resultados de contagens obtidos em outros estudos veterinários (ABRAMS-OGG et al, 1993; ALLYSON et al., 1997; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006). É importante destacar que, não apenas a análise quantitativa, mas também a manutenção das qualidades químicas, físicas e funcionais das plaquetas é essencial para que elas possam exercer adequadamente suas funções após a transfusão (ALLYSON et al., 1997; CARDIGAN et al., 2005; KAUFMAN, 2006; DEKKERS et al., 2007).

O tempo de estocagem influenciou na qualidade dos CP caninos, sendo que as bolsas estocadas durante 7 dias apresentaram maior porcentagem de unidades com diminuições nos parâmetros analisados, quando comparadas aos CP estocado até o 5º dia. Desta forma, recomenda-se o período de 5 dias para a estocagem de CP caninos, entretanto, as bolsas podem ser mantidas até o 7º dia, atentado-se ao fato da maior perda da qualidade e descarte das bolsas, além da maior importância aos exames de avaliação dos CP.

O presente estudo avaliou as características funcionais das plaquetas, aspecto importante, porém pouco avaliado na medicina veterinária transfusional. Os escassos estudos humanos e veterinários que avaliaram a agregação plaquetária em CP observaram diminuições significativas na porcentagem agregatória durante o período de estocagem (ALLYSON et al., 1997; KLEIN et al., 1999; NEIVA et al., 2003; MIYAJI et al., 2004; AKAY et al., 2007) assim como neste estudo. Esses resultados demonstram que ocorrem alterações funcionais nas plaquetas durante o armazenamento, associadas às alterações de pH, glicose, *swirling* e contagens celulares. A avaliação da agregação plaquetária, que é o método padrão ouro para avaliação funcional, reforça a necessidade de análises qualitativas das plaquetas presentes em CP caninos estocados, entretanto as avaliações de pH, glicose e *swirling* foram capazes de detectar a diminuição da qualidade dos CP.

A citometria de fluxo é uma técnica pouco utilizada na rotina veterinária e não existem relatos prévios sobre a avaliação da GPIIb/IIIa em CP caninos. A maioria dos resultados das pesquisas em bancos de sangue humanos não demonstraram variações na expressão da GPIIb/IIIa durante o período de estocagem (WANG et al., 1999; AKAY et al., 2007; SANDGREN et al., 2007), em acordo com o observado no presente estudo. Entretanto, a citometria de fluxo demonstrou ser uma ferramenta importante a ser utilizada em outros estudos plaquetários, inclusive de plaquetas estocadas, uma vez que

os anticorpos CD41 e CD61 apresentaram alta porcentagem de fluorescência e não apresentaram variações na MIF em plaquetas caninas. Estudos futuros poderão determinar as melhores técnicas para avaliação da qualidade dos CP no decorrer do tempo de armazenamento.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que foi realizado o estudo, os resultados obtidos permitiram concluir que:

1. Durante o período de estocagem dos CP caninos ocorrem diminuições no pH, glicose, *swirling*, contagem de plaquetas e leucócitos. Não há variação na contagem de hemácias;
2. Há correlação direta positiva entre o pH e *swirling* e glicose e *swirling* no grupo estocado até o 5º dia. Há correlação direta positiva entre o pH e *swirling*, glicose e *swirling* e glicose e pH no grupo estocado até o 7º dia;
3. Os CP estocados até o 7º dia apresentam diminuições de pH, *swirling* e glicose mais intensas que o grupo estocado até o 5º dia;
5. Durante o período de estocagem, há diminuição na agregação plaquetária avaliada com o uso isolado e concomitante de ADP e epinefrina;
6. O uso concomitante do ADP e epinefrina promovem uma maior porcentagem de agregação plaquetária.
7. As alterações físicas (*swirling*) e químicas (pH e glicose) observadas nos CP estão relacionadas à diminuição da capacidade funcional das plaquetas durante o período de estocagem.
8. Os anticorpos monoclonais CD41 e CD61 apresentam alta porcentagem de fluorescência nas plaquetas caninas estocadas;
9. Não há variação na MIF dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61 em plaquetas caninas durante o armazenamento;
10. Apesar das alterações físicas, químicas e funcionais encontradas nas plaquetas caninas durante a estocagem, elas não apresentam variações na MIF e mantém a alta porcentagem de fluorescência por até 7 dias.

REFERENCIAS

ABRAMS-OGG, A. C. G. et al. Preparation and transfusion of canine platelet concentrates. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 635-642, 1993.

ABRAMS-OGG, A. C. G. Practical blood transfusion. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. **Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine**. Iowa: Blackwell Publishing, 2000. p.263-303.

ABRAMS-OGG, A. C. G. Triggers for prophylactic use of platelet transfusion and optimal platelet dosing in thrombocytopenic dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, n.6, p.1401-1418, 2003.

AKAY, O.M.; GUNDUZ, E.; BASYIGIT, H.; GULBAS, Z. Platelet function testing during 5-day storage of single and random donor plateletpheresis. **Transfusion and Apheresis Science**, v.36, p.285-289, 2007.

ALLYSON, K.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; JOHNSTONE, I. B. Room temperature storage and cryopreservation of canine platelet concentrates. **American Journal Veterinary Research**, v.58, p.1338-1347, 1997.

ANVISA. **Resolução RDC nº153, de 14 de junho de 2004**. Determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a colheita, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Disponível em: <www.anvisa.org.br>. Acesso em: 10 ago. 2008.

BROOKS, M.B.; RANDOLPH, J.; WARNER, K.; CENTER, S. Evaluation of platelet function screening tests to detect platelet procoagulant deficiency in dogs with Scott syndrome. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n.3, p.306-315, 2009.

CARDIGAN, R.; TURNER, C.; HARRISON, P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. **Vox Sanguinis**, v. 88, p. 153-163, 2005.

CHABANEL, A. et al. National French observatory of the quality of blood components for transfusion. **Transfusion Clinique et Biologique**, v.15, p.85-90, 2008

CRAMER, E.M.; FONTENAY, M. Platelets: Structure related to function. In: COLMAN, R.W. et al. (Eds.). **Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice**. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p.463-481.

DE GOPEGUI, R. R.; FELDMAN, B. F. Use of blood and blood components in canine and feline patients with hemostatic disorders. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v.25, p.1387-1399, 1995.

DE GOPEGUI, R.R.; FELDMAN, B.F. Acquired and inherited platelet dysfunction in small animals. **Compendium Continuing Education Practice Veterinary**, v.20, n.9, p.1039-1051, 1998.

DEKKERS, D. W. C. et al. Influence of pH on stored human platelets. **Transfusion**, v.47, p. 1889-1895, 2007.

DIJKSTRA-TIEKSTRA, M. J.; PIETERSZ, R. N. I.; HUIJGENS, P. C. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and *in vitro* and *in vivo* parameters. **Vox Sanguinis**, v. 87, p. 257-263, 2004.

ESCOLAR, G.; WHITE, J.G. Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between *in vitro* and *in vivo* studies. **Thrombosis and Haemostasis**, v.83, p.371-386, 2000.

GONÇALVES, S. **Reações transfusionais após a administração de concentrados de plaquetas em cães**. 2006. 94f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GOODRICH, R. P. et al. Correlation of *in vivo* platelet quality measurements with *in vivo* platelet viability in human subjects. **Vox Sanguinis**, v. 90, p. 279-285, 2006.

HARRISON, P. Platelet function analysis. **Blood Reviews**, v. 19, p. 111-123, 2005.

HERVIG, T. et al. The swirling phenomenon in stored platelets is influenced by their endogenous serotonin. **Transfusion Medicine**, v.9, p.139–145, 1999.

KALBANTNER, K.; BAUMGARTEN, A.; MISCHKE, R. Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. **The Veterinary Journal**, v. 185, n.2, p.144-151, 2009.

KAUFMAN, R. M. Platelets: testing, dosing and the storage lesion – recent advances. **Hematology**, p. 492-496, 2006.

KLEIN, A. et al. Changes in platelet concentrates from dogs due to storage I. Platelet count *in vitro* function. **Berliner Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v.112, p.243-253, 1999. (Abstract).

KRISTENSEN, A.; FELDMAN, B. F. Bancos de Sangue e medicina transfusional. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds). **Tratado de medicina interna veterinária**. 4.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995. v.1, 1495p.

LANDI, E. P. et al. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, p. 39-46, 2003.

LIM, Y. A.; HYUN, B. H. Evaluation of platelet parameters on the ADVIA 120 as the quality indicator for stored platelets. **Clinical & Laboratory Haematology**, v. 24, p.377-384, 2002.

LINDAHL, T. L.; RAMSTROM, S. Methods for evaluation of platelet function. **Transfusion and Apheresis Science**, v.41, p.121-125, 2009.

MATSUBAYASHI, H. et al. Platelet membrane early activation markers during prolonged stored. **Thrombosis Research**, v.93, p.151-160, 1999.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. Evaluation of hemostasis: coagulation and platelet disorders In:----. **Veterinary Laboratory Medicine: interpretation and diagnosis**. 3.ed. Saunders Elsevier, 2004. p.107-131.

MICHELSON, A. D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. **Blood**, v.87, n.12, p.4925-4936, 1996.

MORITZ, A.; WALCHECK, B.K.; WEISS, D.J. Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.32, n.1, p.6-12, 2003.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CÁPUA, M.L.B.; COELHO, P.S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.966-973, 2005.

NIELSEN, L.A.; ZOIS, N.E.; PEDERSEN, H.D.; OLSEN, L.H.; TAMOW, I. Platelet function in dogs: breed differences and effect of acetylsalicylic acid administration. **Veterinary Clinical Pathology**, v.36, n.3, p.267-273, 2007.

PALAVECINO, E.L.; YOMTOVIAN, R.A.; JACOBS, M.R. Bacterial contamination of platelets. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 42, p.71-82, 2010.

PEREIRA, P. M.; RAMALHO, F. S. Transfusão sanguínea. **Clínica Veterinária**, v.34, p.34-40, 2001.

PRATER, R.; TVEDTEN, H. Hemostatic abnormalities. In: WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. (Eds.). **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 4.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2004. p.92-112.

RAND, M.L.; LEUNG, R.; PACKHAM, M.A. Platelet function assays. **Transfusion and Apheresis Science**, v.28, p.307-317, 2003.

SANDGREN, P.; HANSSON, M.; GULLIKSSON, H.; SHANWELL, A. Storage of buffy-coat-derived platelets in additive solutions at 4°C and 22°C: flow cytometry analysis of platelet glycoprotein expression. **Vox sanguinis**, v. 93, p. 27-36, 2007.

SCHNEIDER, A. Blood components: collection, processing and storage. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v. 25, p. 1245-1261, 1995.

SCOTT, M.A.; STOCKHAM, S.L. Platelets. In: -----. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2.ed. St. Louis: Blackwell Publishing, 2008. p.223-257.

SHANWELL, A. et al. Paired *in vitro* and *in vivo* comparison of apheresis platelet concentrates stored in platelet additive solution for 1 versus 7 days. **Transfusion**, v.46, p.973-979, 2006.

SLICHTER, S. J. Platelet transfusion: future directions. **Vox Sanguinis**, v. 87, p. 47-51, 2004.

SOLOVIEV, M.V.; OKAZAKI, M.D.; HARASAKI, H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. **Journal of Surgical Research**, v.82, p.180-187, 1999.

STOMER, M.; KLEESIEK, K.; DREIER, J. pH value promotes growth of *Staphylococcus epidermidis* in platelet concentrates. **Blood Components**, v.48, p.836-846, 2008.

TANAKA, K.A. The assessment of platelet function. **Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine**, v.2, p.95-105, 2006.

ULATA, S. K. **Determinação *in vitro* da atividade do Fator de Necrose Tumoral (TNF) em concentrados de plaquetas em cães. Fracionamento do sangue total. Banco de Sangue Veterinário**. 2005. 113f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VAN DE MEER, P.F.; VAN ZANTEN, A.P.; PIETERSZ, R.N.I.; REESINK, H.W. Variation of pH-measurement in platelet concentrates. **Transfusion Medicine**, v. 11, p.49-54, 2001.

WANG, C. et al. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. **Transfusion Science**, v. 20, p. 129-139, 1999.

WEISS, D.J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, n.2, p.72-81, 2002.

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.

ANEXOS

QUADRO 1. Valores individuais do pH mensurados no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do Grupo I.

Bolsas	Momentos		
	M0	5º dia	5º dia*
1	7,2	6,7	6,9
2	7	<6,4	6,2
3	7	6,7	6,8
4	6,7	6,7	7
5	7	7	7,1
6	7	6,7	7
7	7,2	6,7	7,2
8	7	6,7	6,8
9	7	6,7	7,2
10	7	6,7	6,8
11	7	7	7,1

* valores mensurados no aparelho de pHmetro

QUADRO 2. Valores individuais do pH mensurados no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do Grupo II.

Bolsa	Momentos		
	M0	7º dia	7º dia*
1	7	<6,4	5,3
2	7	<6,4	6,3
3	7	6,4	6,4
4	7	<6,4	6
5	6,7	<6,4	6
6	7	6,7	6,7
7	7,2	<6,4	6,2
8	7	6,7	7,1
9	7,2	6,7	7
10	7	6,7	7,1
11	7	6,4	6,7

* valores mensurados no aparelho de pHmetro

QUADRO 3: Valores individuais e médias da glicose (mg/dL) no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do Grupo I.

Bolsas	Momentos	
	M0	5º dia
1	516	410
2	356	190
3	432	400
4	470	454
5	494	576
6	484	334
7	468	337
8	311	290
9	383	300
10	586	600
11	518	380
Médias	456	388

QUADRO 4: Valores individuais e médias da glicose (mg/dL) no momento controle (M0) e 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do Grupo II.

Bolsas	Momentos	
	M0	7º dia
1	294	283
2	339	214
3	375	386
4	399	479
5	454	424
6	478	316
7	500	413
8	506	458
9	508	240
10	518	308
11	600	220
Médias	452	340

QUADRO 5: Valores individuais e médias do *swirling* no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do Grupo I (escala 0 a 3).

Bolsas	Momentos	
	M0	5º dia
1	3	2
2	3	1
3	3	3
4	3	3
5	3	2
6	3	2
7	3	2
8	3	3
9	3	2
10	3	3
11	3	2
Médias	3	2,3

QUADRO 6: Valores individuais e médias do *swirling* no momento controle (M0) e 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas do Grupo II (escala 0 a 3).

Bolsas	Momentos	
	M0	7º dia
1	3	0
2	3	1
3	3	1
4	3	1
5	3	0
6	3	2
7	3	1
8	3	2
9	3	2
10	3	2
11	3	2
Médias	3	1,3

QUADRO 7: Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD61, avaliadas no momento controle (M0) e 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do Grupo I.

Bolsas	Momentos	
	M0	5º dia
1	609,8	276,3
2	385,4	134,6
3	414,2	187,7
4	429,4	392,4
5	514,0	152,6
6	349,1	352,3
7	491,4	336,8
8	241,4	518,6
9	245,8	504,8
10	572,6	116,5
11	368,5	365,2

QUADRO 8: Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD61, avaliadas no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do Grupo II.

Bolsas	Momentos	
	M0	7º dia
1	222,7	257,1
2	173,1	637,8
3	365,2	174,7
4	264,2	106,5
5	214,8	220,7
6	254,8	138,2
7	296,9	230,8
8	425,5	396,0
9	453,2	349,1
10	433,2	333,8
11	449,1	269,0

QUADRO 9: Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD41, avaliadas no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do Grupo I.

Bolsas	Momentos	
	M0	5º dia
1	604,3	294,3
2	378,6	211,0
3	286,4	162,5
4	307,8	296,9
5	324,9	143,3
6	264,2	299,6
7	327,8	310,6
8	226,7	469,8
9	177,8	609,8
10	392,4	167,0
11	365,2	316,2

QUADRO 10: Valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) individuais do anticorpo monoclonal CD41, avaliadas no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos do Grupo II.

Bolsas	Momentos	
	M0	7º dia
1	243,6	149,9
2	230,8	349,1
3	474,0	264,2
4	316,2	207,2
5	237,1	230,8
6	342,9	235,0
7	192,8	276,3
8	388,9	361,9
9	346,0	320,3
10	316,2	281,3
11	358,7	322,0

TABELA 5. Intervalo das médias de intensidade de fluorescência (MIF) dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61, avaliados no momento controle (M0) e no último dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos, do Grupo I.

Momentos		
	M0	5º dia
CD41	177,8 - 604,3 ^a	143,3 - 609,8 ^a
CD61	241,4 - 609,8 ^a	116,5 - 518,6 ^a

Letras minúsculas iguais representam valores significativamente iguais ($p>0,05$)

TABELA 6. Intervalo das médias de intensidade de fluorescência (MIF) dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61, avaliados no momento controle (M0) e no último dia de estocagem das bolsas de concentrado de plaquetas caninos, do Grupo II.

Momentos		
	M0	7º dia
CD41	192,8 - 474 ^a	149,9 - 361,9 ^a
CD61	173,1 - 453,2 ^a	106,5 - 637,8 ^a

Letras minúsculas iguais representam valores significativamente iguais ($p>0,05$)

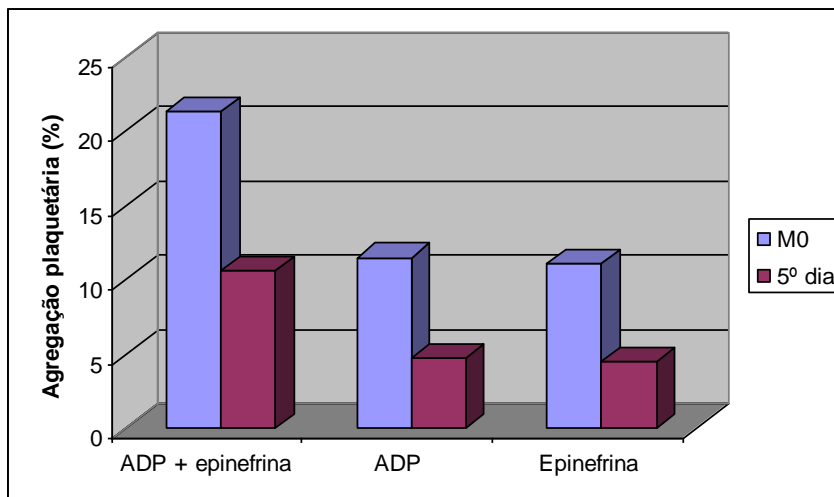


FIGURA 1: Médias da agregação plaquetária (%) dos concentrados de plaquetas caninos, avaliados no momento controle (M0) e no 5º dia de estocagem, pela adição dos agonistas ADP e epinefrina.

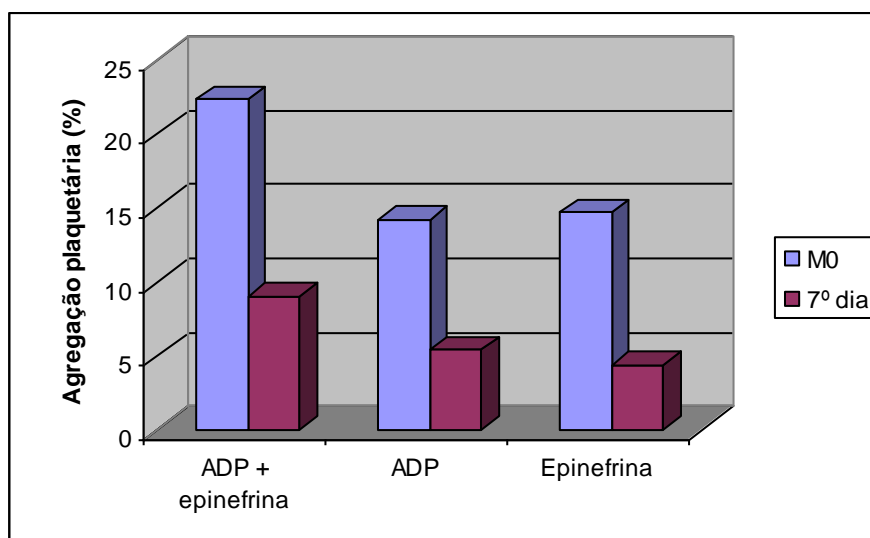


FIGURA 2: Médias da agregação plaquetária (%) dos concentrados de plaquetas caninos, avaliados no momento controle (M0) e no 7º dia de estocagem, pela adição dos agonistas ADP e epinefrina.

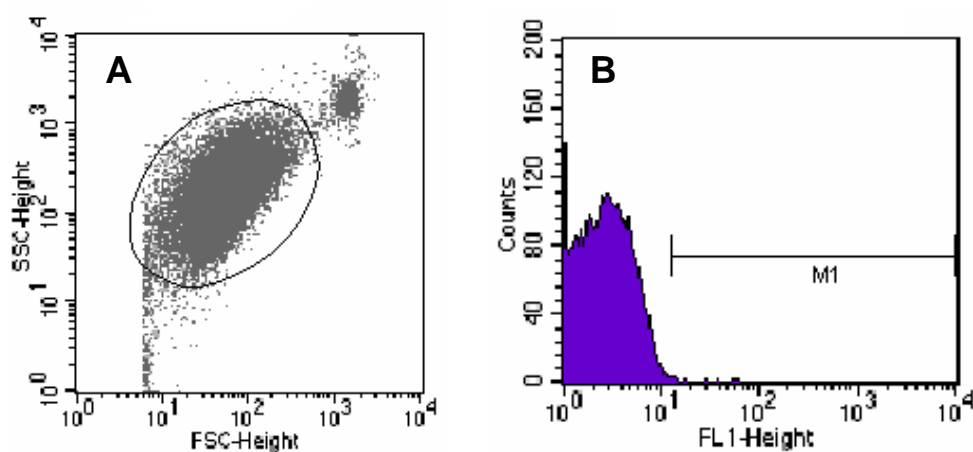


FIGURA 3: A) Histograma da população de plaquetas selecionada (“gate”), em gráfico de tamanho (FSC-Height) e granulosidade (SSC-Height), obtido a partir do concentrado de plaquetas canino. B) Histograma representando a autofluorescência da população plaquetária, obtido a partir do concentrado de plaquetas canino.

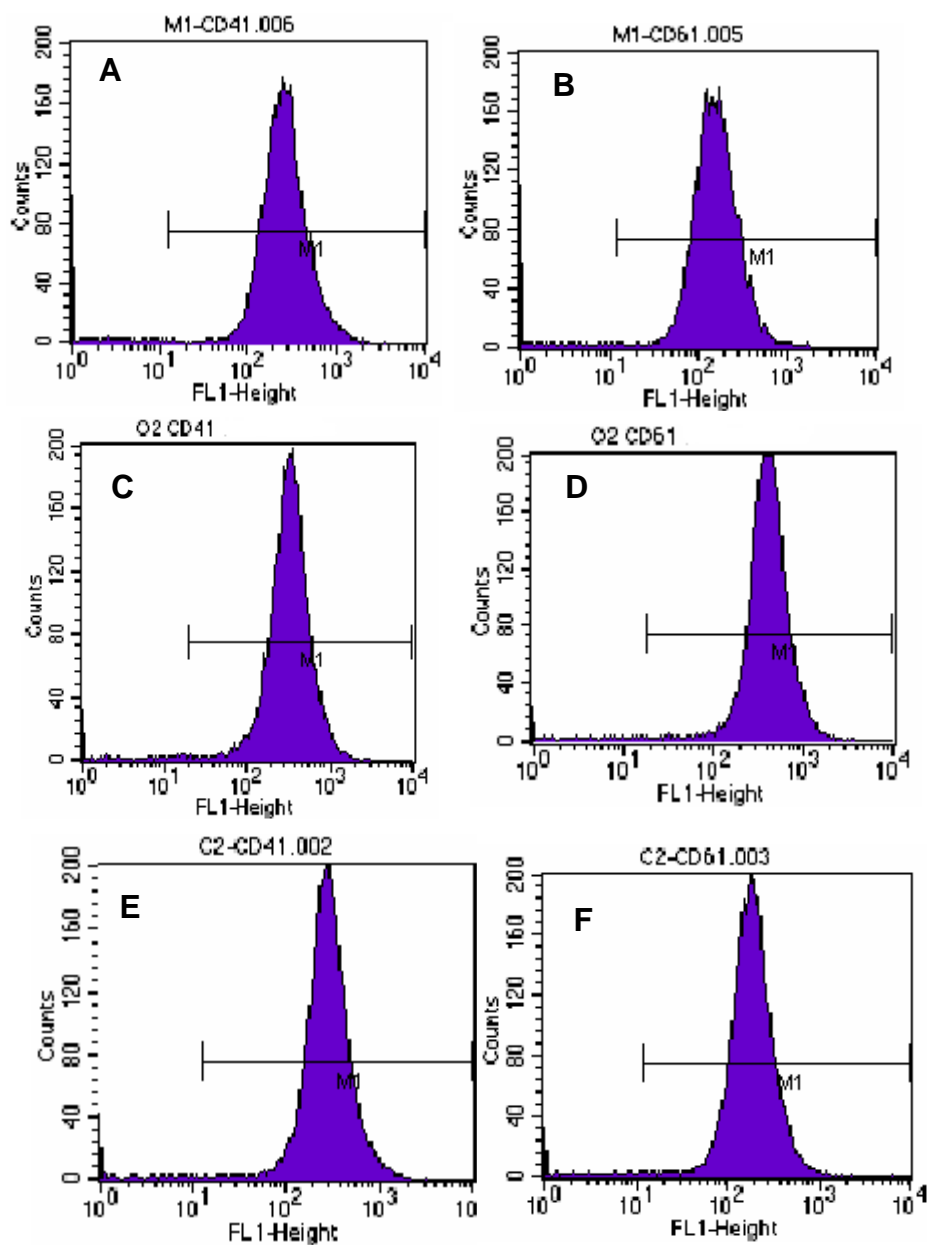


FIGURA 4: Histogramas representando a população plaquetária positiva para a marcação dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61, obtidos a partir do concentrado de plaquetas canino dos Grupos I e II, no momento controle (A - CD41; B - CD61), no 5º dia (C - CD41; D - CD61) e 7º dia de estocagem (E - CD41; F - CD61).

Normas Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária (Capítulo 3)

ISSN 0102-0935 *versão impressa*

ISSN 1678-4162 *versão online*

Tipo de artigo aceito para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa. Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética. Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Submissão dos trabalhos

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico www.abmvz.org.br

Normas Veterinary Clinical Pathology (Capítulo 3)

Print ISSN: 0275-6382

Online ISSN: 1939-165X

Frequency: Quarterly

Current Volume: 39 / 2010

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2009: Veterinary Sciences: 66 / 141

Impact Factor: 0.793

AUTHOR GUIDELINES

Veterinary Clinical Pathology now uses Manuscript Central for the online submission of manuscripts. Please go to the journal's website at <http://mc.manuscriptcentral.com/vcp> and click on 'new user' to set up an account. Once logged in, follow instructions for submitting your manuscript, figure files, and cover letter. Using your user ID and password, you may enter the Author Center at any time to follow the review process.

Scope and Mission of the Journal

Veterinary Clinical Pathology is the leading international journal in veterinary and comparative laboratory medicine. The mission of VCP is to provide a forum to communicate and discuss new developments that advance laboratory diagnosis in domestic and laboratory animals and in avian, wildlife, and special species through publication of authoritative reviews; experimental and clinical research; special reports on clinical laboratory practice, policy, and education; novel case reports; and editorials and letters. VCP welcomes the submission of original manuscripts involving acid-base and electrolytes; biomarkers of disease; blood-banking and transfusion medicine; clinical chemistry; coagulation, platelets, and hemostasis; cytopathology, including effusions and body fluids; experimental and pathophysiologic studies that emphasize clinical pathology; genetic blood and biochemical disorders; hematopathology, including blood cells, hemoparasites, iron metabolism, bone marrow, and hematopoietic neoplasia; hormonal analysis and endocrine disease; infectious diseases of blood and bone marrow; inflammation and inflammatory mediators; instrumentation and diagnostics, including point-of-care testing, assay validation, method comparison, and molecular diagnostics; lipids and lipoproteins; quality assurance and laboratory statistics; telepathology and digital imaging; and toxicologic clinical pathology.

Author Agreements

Manuscripts will be considered with the understanding that they have not been published elsewhere (except in abstract form) and are not concurrently under review by any other publication. Authorship implies substantial contribution and approval of the manuscript by each author. At the time of acceptance of a manuscript or letter, all authors will be required to sign a written transfer of copyright to the ASVCP. Requests to copy, reprint, or use portions of published material (including information in figures and tables) should be addressed to Wiley-Blackwell at Journalsrights@wiley.com. Authors are expected to acknowledge all sources of funding or support and to disclose any financial interest with companies that manufacture products that are the subject of their research or with companies that manufacture competing products. Veterinary Clinical Pathology reserves the right to reject manuscripts if it appears that experimental animals have been subjected to unacceptable stress or pain, or if the use of experimental

animals does not appear to be justified by the significance of the knowledge gained. Investigations involving research animals must be done in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals or equivalent guidelines.

Manuscript Review, Editing, and Publication

At least 2-3 anonymous peer reviewers and a Section Editor will evaluate each manuscript. Authors are asked to respond to reviewer suggestions within 60 days. Revised manuscripts may be re-reviewed. Upon acceptance, manuscripts will undergo editorial review, and authors may be asked to respond to additional editorial and reviewer comments. Copyediting will be done according to Veterinary Clinical Pathology style. Proofs will be sent to the author for final approval. Articles will be published online early in EarlyView, prior to print publication.

Article Categories

Articles are welcome in the following categories:

- Original Articles - Peer-reviewed, prospective or retrospective research investigations that include a structured Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion.

Manuscripts should be written in American English and double-spaced throughout, including the abstract, references, tables and figures legends. Pages and line numbers should be numbered consecutively, starting with the title page and continuing through the end of the text. Numbers should use decimals instead of commas. Authors should refer to a recent issue of the journal for general style and format.

Abbreviations should be kept to a minimum. All nonstandard abbreviations should be defined the first time they are used in the text. The following standard abbreviations may be used (except in titles) without first being spelled out: ANOVA, ATP, CBC, DNA, EDTA, ELISA, HCT, MCV, MCH, MCHC, PCV, RBC, RNA, SD, WBC, and H&E.

- Title Page - The first page of the manuscript should include the full title of the article and a short title of less than 50 characters to be used as a running header. Include the authors' first and last names and the name and location of the institution(s) of the authors at the time the work was done. Indicate the corresponding author's e-mail address. Up to 6 alphabetized Key Words should be included for indexing the article.
- Abstract - The abstract (250-word limit) should be structured using the following headings: Background, Objectives, Methods, Results, and Conclusions. Case Reports do not require a structured abstract, but should include an abstract that summarizes the case. What Is Your Diagnosis? articles no longer include abstracts.
- Introduction - The Introduction should provide sufficient background information to justify the rationale for the study and why it is important, should state the hypothesis or research question, and state the objective(s) or specific aims of the study.

- Materials and Methods - Methods should include, as appropriate, a description of study design, experimental animals, analytical methods, and statistical analysis. Products (eg, instruments, reagents, stains, drugs) should be referred to by their generic or chemical names, followed by the model or trade name, and the name and location of the manufacturer in parentheses. Use of metric or SI units is strongly encouraged.
- Results - Tables and figures should be referred to in parentheses at the end of a sentence referring to the results. Data in tables and figures should not be duplicated in the text. Results should not repeat the rationale for the methods used.
- Discussion - The Discussion should succinctly summarize the most important findings as related to the study objectives and discuss the results in the context of other studies. Only discussion relevant to the results should be included. Repetition of results should be avoided.
- Acknowledgments - Funding, grant support, or provision of supplies used in the study and individuals providing other forms of assistance (eg, statistical review, manuscript preparation, technical assistance) may be acknowledged.
- References - References should be limited to pertinent literature and formatted according to American Medical Association guidelines, as shown in the examples below. Non-peer-reviewed references (eg, book chapters, proceedings) should be kept to a minimum. References should be listed and numbered in the order in which they first appear in the text, and should be identified in the text by superscript Arabic numbers. Journal abbreviations should be those used in Index Medicus. References with more than 6 authors should list the first 3 authors followed by et al.
- Figure Legends - A list of figure legends should follow the references in the main document. Figure legends should be double-spaced, numbered consecutively with Arabic numbers, and include a brief description of the image, graph, or diagram. The stain should be indicated when appropriate, and decimal points in figures should be indicated by a period (.) and not a comma. For magnification, internal scale bars are strongly preferred; otherwise, indicate the objective lens used (eg, X10 objective). Legends for unknown images in What Is Your Diagnosis? reports should include only the source of the image, stain, and magnification, without a description.
- Tables - Tables should be numbered consecutively with Arabic numbers and have a brief descriptive title. Tables should be double-spaced and contain no vertical lines. Decimal points should be indicated by a period (.) and not a comma.
- Images - Black and white graphs and line drawings should be scanned at 1200 ppi and uploaded as TIFF files. Color and gray-scale photographs and photomicrographs should be acquired or scanned at a minimum of 300 ppi, saved as TIFF files, and uploaded. Color images should be saved in CMYK mode. There is no charge for color figures. Excel and PowerPoint files may also be acceptable in some cases. At the time of publication, figures may be cropped. The size of most figures will be 1-column width.

OFFPRINTS: Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Wiley-Blackwell's Author Services. Please register to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> to register.