



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE ANDROLOGIA ANIMAL (ANDROLAB) NA  
UFRPE, MUNICÍPIO DE RECIFE-PE, BRASIL**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS: ANÁLISE COMPARATIVA DE  
MÉTODOS DE PLAQUETOMETRIA**

**GIOVANNA ISABELLA DE SOUZA COUTO**

**RECIFE, 2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS: ANÁLISE COMPARATIVA DE  
MÉTODOS DE PLAQUETOMETRIA**

**GIOVANNA ISABELLA DE SOUZA COUTO**

**Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório  
realizado como exigência parcial para a obtenção  
do grau de Bacharela em Medicina Veterinária, sob  
Orientação do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro.**

**RECIFE, 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C871p

Couto, Giovanna Isabella de Souza

Plasma rico em plaquetas de equinos: análise comparativa de métodos de plaquetometria / Giovanna Isabella de Souza Couto. - 2023.

35 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.

Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Medicina Veterinária, Recife, 2023.

1. Contagem de plaquetas. 2. PRP. 3. Fatores de crescimento. I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.089

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINOS: ANÁLISE COMPARATIVA DE  
MÉTODOS DE PLAQUETOMETRIA**

Relatório elaborado por  
**GIOVANNA ISABELLA DE SOUZA COUTO**

Aprovado em 31/08/2023

**BANCA AVALIADORA**

---

**Prof Dr. Gustavo Ferrer Carneiro**  
**Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dra<sup>a</sup> Grazielle Anahy de Sousa Aleixo Cavalcanti**  
**Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE**

---

**Prof<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Gilvannya Gonçalves de Sobral**  
**Departamento de Medicina Veterinária da UNIFACOL**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Vera Lúcia e ao meu pai Jodalvo Couto (*in memoriam*), essa conquista foi moldada pelo apoio e amor que me proporcionaram.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, à minha família que é sinônimo de apoio e dedicação. Em especial à minha mãe, Vera, pela vida, amor, carinho e dedicação. Sem ela, não seria possível ter alcançado essa conquista. Ao meu pai Jodalvo (*in memoriam*) que mesmo nos poucos anos compartilhados me ensinou tanto, foi exemplo, me deu orgulho e tornou possível que eu me tornasse quem eu sou;

Aos meus irmãos, em especial Gabriel, meu eterno bebê, por sempre ser motivo de risos, obrigada pelos momentos de diversão e alegria, foram essenciais durante esse período. Ao meu irmão Jodalvo Filho, pelo suporte e assistência que foram fundamentais para que eu finalizasse esse período;

Ao meu companheiro, parceiro de vida, amigo e amor, Gilcifran Andrade, com o qual tenho explorado a profundidade de um amor tão bonito e intenso. Obrigada por ser meu alicerce, pelas inspirações e encorajamento. Sou grata pelo suporte e paciência, sobretudo durante a realização do ESO. Não existem palavras que expressem toda a gratidão que sinto por você. A vida e todas as minhas conquistas são mais bonitas ao seu lado;

Ao meu grande companheiro e fiel amigo de quatro patas, Pitoco, que trouxe alegria, conforto e risadas nos momentos mais desafiadores deste percurso acadêmico;

Aos meus amigos que compartilharam essa jornada ao meu lado, a minha mais profunda gratidão. Parceiros da SV1, a turma que mais ocupou espaço nessa universidade, tenho um profundo carinho por cada um de vocês, a nossa rotina juntos faz e sempre fará falta;

A Caio Vinícius, meu amigo-irmão, que compartilha comigo esta jornada desde a escola. Somos tão parecidos que às vezes chega a assustar. Muito obrigada por toda a ajuda, pelos momentos que compartilhamos, pelo acolhimento e pela amizade. A Adryell Emanuel, um grande amigo que a Rural me presenteou, gratidão pelas risadas e por tudo que partilhamos juntos. Externo meus agradecimentos também a Matheus Lopes e Matheus Magalhães, amigos importantes durante essa trajetória;

Aos meus parceiros do Ibama, em particular aos que junto comigo compõe os “5 elementos”. Ana Maria, Ângelo Tagore, Elton Marques e Priscila

Lemos. Gratidão pela amizade e todos os momentos compartilhados. Á Cristina Fonseca, minha chefe, amiga e parceira da fauna, obrigada por ser inspiração, força e suporte. A Manoel Edson, Felipe Guimarães e Carla Marques, colegas que tanto me ajudaram durante os dias difíceis em que era necessário conciliar a rotina intensa de trabalho e aulas. A todos os meus estimados companheiros do Núcleo de Biodiversidade, que compartilham comigo o compromisso diário na incansável batalha pela preservação dos recursos naturais;

Á Gabriela Reis por toda a ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho, seu auxílio foi essencial para a conclusão dessa etapa. Á Gilvannya Sobral pela colaboração e auxílio na realização do trabalho. Às duas pelo compartilhamento de ideias e conhecimento;

Ao professor Gustavo Ferrer, agradeço por toda a orientação, não apenas durante o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), mas outras pesquisas e durante todo o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Sou grata por toda sua dedicação e empenho no desenvolvimento de sua função, fica claro para todos a sua paixão por compartilhar conhecimento. Minha eterna admiração e gratidão.;

Expresso minha antecipada gratidão aos membros da banca examinadora, pela generosidade em dedicar seu tempo, pela atenção dispensada e pelas valiosas contribuições, não há dúvidas de que são de suma importância para o meu contínuo desenvolvimento. Á Universidade Federal Rural de Pernambuco e tantos outros professores que tornaram essa conquista possível;

Expresso minha profunda gratidão a todos os animais que desempenharam um papel fundamental em minha jornada formativa. Desejo honrar e agradecer a cada um deles pelo seu impacto significativo em minha vida;

Guardarei para sempre no meu coração aqueles que foram indispensáveis na minha trajetória rumo à profissão de Médica Veterinária. Expresso com profunda gratidão o meu sincero agradecimento a todos.

## EPÍGRAFE

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”*

(Leonardo da Vinci)



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 01	Sala de microscopia .....	15
ILUSTRAÇÃO 02	Sistema computadorizado de análise (CASA) .....	16
ILUSTRAÇÃO 03	Aparelho de citometria de fluxo .....	16
ILUSTRAÇÃO 04	Bancada com pHmetro, microscópios, máquina de congelamento e abaixo botijões de nitrogênio .....	17
ILUSTRAÇÃO 05	Bancada com banhos-maria, balança de precisão e osmômetro .....	18
ILUSTRAÇÃO 06	Plaqueta (seta preta) exibida em 40x (A) refringência plaquetária (seta preta) exibida em 40x (B) .....	30
ILUSTRAÇÃO 07	Plaqueta corada (seta preta) exibidas em 40x .....	31
ILUSTRAÇÃO 08	Plaqueta (seta preta) exibida em 40x (A) refringência plaquetária (seta preta) exibida em 40x (B) .....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Espécies animais avaliadas durante o período de ESO .....	19
TABELA 2	Atividades desenvolvidas/acompanhadas durante o período de ESO .....	19
TABELA 3	Resultados obtidos com a contagem de plaquetas no sangue total e nos diferentes protocolos testados .....	27
TABELA 4	Médias e desvios padrões dos valores da contagem de plaquetas no ST e nos diferentes protocolos testados .....	28

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Correlação entre o método de Brecher e o método G&S .	29
GRÁFICO 2	Correlação entre o método de Brecher e o método Rees-Hecker modificado .....	29

## RESUMO

O presente trabalho tem o propósito de descrever as atividades realizadas durante o estágio supervisionado obrigatório (ESO), disciplina obrigatória para conclusão do curso de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O estágio foi realizado na Área de Reprodução Animal no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizado na Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, em Dois Irmãos, Recife-PE. Sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro e supervisão da Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra durante o período de 29/05/2023 a 11/08/2023. Ao longo do estágio foi possível participar da rotina do laboratório de Andrologia Animal, acompanhando e auxiliando na realização de exames andrológicos; coleta e avaliação de sêmen; realização de testes para determinar a capacidade de congelamento do sêmen, avaliação de morfologia espermática e de potencial reprodutivo objetivando avaliação final do potencial reprodutivo dos animais avaliados. Além disso, também foi possível acompanhar as atividades de pesquisa desenvolvidas no local do estágio. A partir da experiência vivida, foi possível o desenvolvimento de estudos comparativos, com o objetivo de aperfeiçoar as técnicas atualmente empregadas para a avaliação de PRP no Androlab, após o experimento foi redigido um artigo científico abordando uma análise comparativa do uso de diferentes métodos manuais com adição de corantes para a contagem de plaquetas em plasma rico em plaquetas (PRP) de equinos.

**Palavras-chaves:** Reprodução Animal; Andrologia animal; Fatores de crescimento.

## ABSTRACT

The present work aims to describe the activities carried out during the mandatory supervised internship (ESO), a mandatory discipline for completion of the Veterinary Medicine course at the Federal Rural University of Pernambuco. The internship was carried out in the Animal Reproduction Area of the Department of Veterinary Medicine of the Federal Rural University of Pernambuco, located on Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, in Dois Irmãos, Recife-PE. Under the guidance of Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro and supervision of Prof. Dr. Maria Madalena Pessoa Guerra during the period from 05/29/2023 to 08/11/2023. Throughout the internship it was possible to participate in the routine of the Animal Andrology laboratory, accompanying and assisting in the performance of andrological examinations; semen collection and evaluation; Conducting tests to determine the freezing capacity of semen, evaluation of sperm morphology and reproductive potential aiming at final evaluation of the reproductive potential of the animals evaluated. In addition, it was also possible to follow the research activities developed at the internship site. From the lived experience, it was possible to develop comparative studies, with the objective of improving the techniques currently employed for the evaluation of PRP in Androlab, after the experiment a scientific article was written addressing a comparative analysis of the use of different manual methods with the addition of dyes for platelet count in platelet-rich plasma (PRP) of horses.

**Keywords:** Animal Reproduction; Animal Andrology; Growth factors.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	Introdução sobre o ESO .....	14
<b>1.2</b>	Descrição do local do estágio .....	15
<b>1.3</b>	Descrição das atividades .....	19
<b>1.4</b>	Discussão das atividades desenvolvidas .....	21
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	Artigo científico .....	23
	Resumo .....	23
	Introdução .....	24
	Material e métodos .....	25
	Resultados e discussão .....	27
	Conclusão .....	32
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>

## **1. CAPÍTULO I**

### **1.1 Introdução sobre o ESO**

Durante a vivência em sala de aula é comum que o estudante desperte maior interesse em uma determinada área da Medicina Veterinária, por meio do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) é possível que o aluno pratique e vivencie por um período de tempo a área de interesse adquirindo experiência e conhecimento. O ESO é um componente obrigatório da grade curricular para todos os discentes de bacharelado em Medicina Veterinária com uma carga horária de 420h.

O presente ESO foi desenvolvido durante o período de 29/05/2023 a 11/08/2023, totalizando as 420h necessárias. Foi realizado na área de Reprodução Animal no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizado na Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, em Dois Irmãos, Recife-PE. O ESO foi orientado pelo Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro e supervisionado pela Prof<sup>ª</sup>. Dra Maria Madalena Pessoa Guerra.

Objetivou-se acompanhar e auxiliar na realização de exames andrológicos, testes de congelamento de sêmen e outras atividades, visando avaliar a capacidade reprodutiva dos animais avaliados.

## 1.2 Descrição do local do estágio

O ESO foi realizado nas dependências do Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) e do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

O ANDROLAB é composto por duas áreas, uma exclusivamente destinada a análises através de microscópio de epifluorescência e outra onde existem os demais equipamentos destinados as atividades de pesquisa com sêmen, especialmente de ovinos, caprinos e equinos. O laboratório é coordenado pelo Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra. A equipe conta com sete alunos de pós-graduação, dois estagiários e três discentes de projeto de iniciação científica.

Estruturalmente, a sala de microscopia (Ilustração 01) dispõe de um microscópio de epifluorescência Carl Zeiss, Germany, 400x acoplado a uma fonte de alimentação Zeiss mbq 52 AC.



**Ilustração 01.** Sala de microscopia. Fonte: Couto (2023).

O laboratório de Andrologia Animal possui o sistema computadorizado de análise (CASA) disponível para a visualização, digitalização e análise de imagens sucessivas que fornece informações precisas a respeito de células espermáticas avaliadas (Ilustração 02) e também um aparelho de citometria de fluxo (Ilustração 03).



**Ilustração 02.** Sistema computadorizado de análise (CASA). Fonte: Couto (2023).



**Ilustração 03.** Aparelho de citometria de fluxo. Fonte: Couto (2023).



O local ainda dispõe de equipamentos utilizados para os demais processamentos de amostras, como três microscópios ópticos (dois com contraste de fase e um convencional), um agitador vórtex, uma centrífuga, uma placa aquecedora, duas máquinas de congelamento de sêmen, um pHmêtro, um osmômetro, dois banhos-maria e uma balança de precisão. Possui ainda duas pias, uma geladeira e um freezer vertical.

Sete botijões de nitrogênio são acondicionados abaixo da bancada onde são mantidos os microscópios, sendo regularmente inspecionados quanto a seu nível de nitrogênio para a manutenção das amostras armazenadas (Ilustração 04).



**Ilustração 04.** Bancada com pHmêtro, microscópios, máquina de congelamento e abaixo botijões de nitrogênio. Fonte: Couto (2023).

Estrategicamente próximo ao computador onde são realizadas as avaliações no Sistema computadorizado de análise (CASA) é mantido o banho-maria em bancada equipada com outros equipamentos necessários para a rotina (ilustração 05).



**Ilustração 05.** Bancada com banhos-maria, balança de precisão e osmômetro. Fonte: Couto (2023).

### 1.3 Descrição das atividades

Durante o período de realização do ESO foram realizadas diversas atividades de rotina no Laboratório de Andrologia Animal por meio do acompanhamento principalmente de projetos de pesquisas e aulas práticas. A tabela a seguir representa a porcentagem entre espécies atendidas em diferentes atividades realizadas no ANDROLAB (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies animais avaliadas durante o período de ESO.

<b>Espécie Animal</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Percentual (%)</b>
Equino	26	61,90%
Caprino	9	21,43%
Ovino	7	16,67%
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>100%</b>

No decorrer do tempo de estágio ocorriam experimentos de pesquisas desenvolvidos no laboratório, foi possível o acompanhamento de atividades desenvolvidas em dias determinados. Algumas práticas são realizadas em conjunto através de microscópio de fluorescência e outras são dependentes como a avaliação de motilidade, vigor e concentração espermática para a realização do congelamento de

sêmen. As atividades realizadas e acompanhadas durante o ESO podem ser consultadas a seguir, quanto a frequência e percentual (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atividades desenvolvidas/acompanhadas durante o período de ESO.

<b>Atividade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual (%)</b>
Coleta de sangue	8	4,54%
Coleta de sêmen	2	1,82%
Processamento para obtenção de PRP	15	13,64%
Contagem manual de plaquetas	15	13,64%
Avaliação de sêmen quanto a motilidade e vigor	12	10,91%
Avaliação no CASA	30	27,28%
Avaliação da Integridade de membrana	7	6,36%
Avaliação de potencial de membrana mitocondrial	7	6,36%
Avaliação de integridade de acrossoma	7	6,36%
Congelamento de sêmen	2	1,82%
Refrigeração de sêmen	5	4,54%
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100%</b>

#### **1.4 Discussão das atividades desenvolvidas**

Mediantes os dados apresentados nas tabelas é possível inferir que a maior parte das atividades acompanhadas durante o período de estágio ocorreu na espécie equina (61,90%), sendo a atividade predominante a de avaliação de sêmen no sistema computadorizado de análise (CASA).

O CASA é um software que de forma automática analisa a cinética espermática quanto aos parâmetros de motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear progressiva ( $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média da trajetória

( $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (%), retilinearidade (%), oscilação (%), amplitude de deslocamento lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ ) e frequência do batimento flagelar cruzado (Hz). Os parâmetros relacionados ao deslocamento cinético avaliados auxiliam de forma efetiva na avaliação espermática, produzindo um laudo completo quanto à qualidade do sêmen.

Outras avaliações como avaliação de motilidade e vigor visualmente através de microscopia óptica foram realizadas anteriormente aos processamentos de congelamento e refrigeração. As análises de integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridade da membrana acrossomal foram desempenhadas em sala de microscopia escura, com utilização de diferentes fluorocromos e filtros de emissão em microscópio de epifluorescência. Todas as análises somadas proporcionam uma efetiva conclusão quanto ao potencial reprodutivo da amostra de sêmen analisada.

A Reprodução Animal é um campo em constante expansão e altamente requisitado dentro da Medicina Veterinária, desempenhando um papel fundamental para rebanhos produtores, como bovinos, caprinos e ovinos, além de animais esportivos como os equinos. Com a utilização de biotécnicas e manejo reprodutivo apropriado, é possível aprimorar significativamente a produtividade dos animais nas mais diversas atividades.

Entretanto, a Reprodução Animal não se restringe apenas a avaliações andrológicas e ginecológicas, se estende também para a busca de métodos inovadores que solucionem problemáticas enfrentadas pelos veterinários de campo. Dentre as pesquisas realizadas no ANDROLAB durante o período de ESO foi possível o acompanhamento de estudos com plasma rico em plaquetas (PRP) de equinos, especialmente quanto a sua obtenção, avaliação e métodos de armazenamento.

O PRP é um aglomerado de plaquetas obtido através do sangue do próprio paciente por meio de diferentes protocolos instituídos na medicina humana e veterinária, que objetiva reunir o maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma. Na Medicina Veterinária equina o PRP é estudado para o tratamento de diferentes patologias, como as osteoartrites (Carmona et al., 2009), feridas cutâneas (De Rossi, 2009; Carter et al., 2003), tendinites (Maia et al., 2009) e endometrite persistente (Reghini, 2013) com resultados benéficos. A ampla gama de benefícios atrelados a utilização de PRP desperta continuamente o interesse em pesquisas sobre o assunto.

As atividades que envolveram a coleta de sangue, processamento para obtenção do PRP e sua avaliação propiciaram diversas perspectivas quanto a inovações e novas propostas de pesquisa que possibilitaram a elaboração de um artigo científico. Toda a experiência vivenciada durante o período foi engrandecedora e capaz de impulsionar novas ideias e perspectivas futuras.

## **2. CAPÍTULO II**

### **2.1 Artigo científico**

#### **Plasma rico em plaquetas de equinos: análise comparativa de métodos de plaquetometria**

##### **Resumo**

Dada a importância econômica e social da criação de equinos, essa área encontra-se em constante evolução, devido a isso é imprescindível o progresso no uso de novas terapêuticas que auxiliam no tratamento de afecções que acometem esses animais. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um hemoderivado obtido através de centrifugação, rico em fatores de crescimento e associado ao tratamento de inúmeras patologias. Objetivou-se com esse trabalho analisar os impactos de distintos métodos manuais com adição de corantes na contagem de plaquetas no PRP de cavalos. Para tal foram utilizados cinco equinos hígidos, o sangue foi coletado através de venopunção. As amostras foram processadas para obtenção do PRP com o uso de um protocolo de dupla centrifugação. Para contagem manual de plaquetas foram utilizados os métodos de Brecher, o método G&S com azul de metileno HAMA e o método Rees-Hecker modificado. Os resultados foram avaliados estatisticamente usando o one way ANOVA e pelo teste de t de Student, a correlação foi realizada pelo teste de correlação de Pearson. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os métodos de contagem avaliados, porém a correlação entre os métodos de Brecher e o método G&S foi positiva e entre o primeiro e o método Rees-Hecker modificado foi ligeiramente negativa, o que no último caso indicou uma falta de associação entre os valores de plaquetas observados nos protocolos. Dessa forma, concluiu-se que o método G&S possui um grau de confiabilidade semelhante ao método de Brecher, facilitando a visualização de plaquetas no plasma rico em plaquetas de cavalos. Isso se deve à correlação entre os protocolos. Mais avaliações são requeridas para confirmar a confiabilidade equivalente do método Rees-Hecker modificado, assim como sua padronização.

**Palavras chaves:** Contagem de plaquetas; PRP; Fatores de crescimento.

## **Introdução**

De acordo com o IBGE, em 2021, o Brasil possuía cerca de 5.777.046 equinos em todo o território nacional, sendo 22,4% desse número pertencente a região Nordeste. Associado a esse expressivo rebanho está a importância econômica dessa espécie, que gera milhares de empregos e movimenta cerca de R\$ 16,15 bilhões (Brasil, 2016).

A criação de equinos possui importância desde as civilizações mais antigas, pois com a utilização desses animais era possível o deslocamento e tração de cargas, atualmente sua contribuição se estende principalmente aos esportes e ao lazer (Sales, 2018). O panorama atual da criação de equinos e sua constante evolução torna essencial a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapêuticas, que solucionem algumas patologias associadas a esses animais.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do sangue (Garcia et al., 2005; Uebel, 2006), obtido por meio da centrifugação com o propósito de se obter uma dose plaquetária hiperfisiológica e uma grande concentração de fatores de crescimento (Fitzpatrick et al., 2017) em um pequeno volume de plasma como produto final (Vendramin et al., 2006).

Os fatores de crescimento estão armazenados em grande quantidade nas plaquetas e são responsáveis pela regulação do metabolismo celular através de vias de sinalização de um complexo de receptores de superfície celular (Vendruscolo et al., 2012). Esse processo é responsável pelo aumento da transcrição dos fatores e a produção de proteínas que estimulam a proliferação e diferenciação celular, além de impulsionar a produção da matriz extracelular (Dahlgren et al., 2001). Isso, junto com o estímulo à neovascularização, auxilia no processo de reparação tecidual (Bosch et al., 2010).

No âmbito da Medicina Veterinária, o PRP tem sido utilizado em diferentes casos com sucesso, como no tratamento de desmíte e osteoartrite (Carmona et al., 2009), de lesões cutâneas (Carter et al., 2003; López e Carmona, 2014; Souza et al., 2014), úlceras de córnea (Merlini et al., 2014; Teixeira, 2014), laminite em equinos (Carmona et al., 2012) e endometrites persistentes (Reghini, 2013).

É importante ressaltar que o tratamento utilizando PRP geralmente requer múltiplas aplicações e a preparação do produto antes de cada uso. Assim, é essencial

aprofundar os métodos de obtenção e avaliação do PRP. O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos de diferentes métodos na contagem de plaquetas em plasma rico em plaquetas de equinos.

### **Material e métodos**

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) sob nº 1747200622. Utilizou-se cinco equinos hígidos, com idade média de 6 anos e pesando em média 400kg, cujos parâmetros clínicos foram previamente avaliados. Os equinos foram mantidos em baias individuais e alimentados com ração comercial, volumoso e água *ad libitum*.

O sangue foi coletado através de venopunção da veia jugular externa, com tricotomia e cuidados prévios de preparação antisséptica do local, utilizando agulhas a vácuo 21G e tubos com anticoagulante citrato de sódio a 3,2%. Para as avaliações, utilizou-se 5 tubos por protocolo para cada animal, obtendo 18 ml de sangue. Quatro tubos foram reunidos em tubo falcon de 15 ml, para uma faixa de PRP maior e um foi separado para a avaliação de sangue total.

As amostras coletadas de cada animal foram processadas para a obtenção do PRP através do protocolo de Muthu et al. (2022) com duas centrifugações de 100G por 15 minutos e 1600G por 20 minutos, respectivamente, com um intervalo de 25 minutos entre os dois momentos de centrifugação e ao final com o objetivo de diminuir a ativação plaquetária (Seidel, 2019). Após a primeira centrifugação e repouso foi descartado aproximadamente 5 ml do plasma pobre em plaquetas (PPP), o tubo com o volume restante passou pela segunda centrifugação e descanso e por fim descartou-se 1/3 do tubo, pipetando 1 ml acima da capa leucocitária e 2-6 mm abaixo. Todo o processamento das amostras foi realizado em temperatura ambiente.

Os métodos escolhidos para contagem manual de plaquetas em câmara hematómica de Neubauer foram o método de Brecher, o método G&S com azul de metileno HAMA (Ramirez-Ubillus, 2020) e o método Rees-Hecker modificado (Rees e Ecker, 1923).

O primeiro protocolo utilizado foi o de Brecher (P1), usado na avaliação do sangue total, realizado com o objetivo de comparar a concentração plaquetária inicial, e do PRP. O método de Brecher se baseia na contagem de plaquetas, no qual adicionou-



se em um tubo de ensaio 2 ml de oxalato de amônio a 1% e 20 microlitros de amostra em análise. Após a homogeneização da solução, a câmara de Neubauer foi preenchida e encubada em câmara úmida por 10 minutos, a contagem foi realizada após esse período em microscópio de campo claro, na objetiva de 40x.

Para a utilização da metodologia G&S proposta por Ramirez-Ubillus et al. (2020), que preconiza facilitar o reconhecimento de plaquetas na câmara de Neubauer devido a modificação de sua cor, foi necessário preparar o corante azul de metileno HAMA, conforme metodologia do mesmo autor. Para tal, utilizou-se 1 g de azul de metileno diluído em 100 ml de água destilada e adicionado de 1 g de bicarbonato de sódio. A solução obtida foi fervida a 100°C por 20 minutos em constante homogeneização e mantida em temperatura ambiente para em seguida ser filtrada com o uso de membrana de filtração éster celulose, 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro.

No protocolo de G&S (P2) utilizou-se 425 µl de oxalato de amônio a 1% e 20 microlitros da amostra em análise. Após misturar lentamente por 20 segundos a amostra foi mantida por 18 minutos de incubação à temperatura ambiente e em seguida 15 µl do azul de metileno HAMA foi acrescentado. O preenchimento da câmara de Neubauer foi realizado logo após com encubação por 2 minutos em câmara úmida. A contagem ocorreu em microscópio de campo claro, na objetiva de 40x, o condensador totalmente abaixado e o diafragma quase completamente fechado. Nesse método as plaquetas devem ser visualizadas e distintas de outros elementos devido a sua intensa cor azul, refringência e formato típico.

Para o terceiro protocolo testado (P3) foi usado uma substância corante empregada com o intuito de promover a visualização facilitada de plaquetas composta de 3,8g de citrato de Sódio; 2 ml de formol à 40%; 0,05 g de azul de cresil brilhante e água destilada q.s.p. 100 ml (Rees e Ecker, 1923), no presente trabalho intitulada líquido de Rees. Para isso se acrescentou 450 µl de oxalato de amônio a 1% e 20 microlitros da amostra em análise. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente acrescentou-se 20 µl do líquido de Rees. O preenchimento da câmara de Neubauer foi realizado logo após com encubação por 10 minutos em câmara úmida. A contagem ocorreu em microscópio de campo claro, na objetiva de 40x.

A contagem em câmara de Neubauer foi realizada em cinco quadrados do retículo central (cantos externos e centro) de cada lado da câmara, totalizando dez áreas de contagem. Após a soma o valor final foi multiplicado por 2500 conforme

metodologia preconizada por Jain (1986), o número obtido é o total de plaquetas por  $\mu\text{l}$  de sangue. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o one way ANOVA e a comparação múltipla entre as médias das concentrações plaquetárias foi realizada pelo teste de  $t$  de Student com nível de significância de 5%, a correlação entre os métodos foi realizada pelo teste de correlação de Pearson entre as médias das concentrações plaquetárias.

### Resultados e discussão

Na tabela 3 estão apresentados os valores de plaquetas por  $\mu\text{l}$  de amostra avaliada, é possível observar que a metodologia realizada para produção do PRP foi efetiva, visto que existe de forma geral a tendência multiplicativa dos dados quando comparadas as contagens de plaquetas no sangue total e do PRP nos diferentes protocolos.

**Tabela 3.** Resultados obtidos com a contagem de plaquetas no sangue total e nos diferentes protocolos testados.

	ST ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	P1 ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	P2 ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	P3( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )
<b>Cavalo 1</b>	135	272,5	252,5	270
<b>Cavalo 2</b>	62,5	207,5	185	260
<b>Cavalo 3</b>	110	300	267,5	252,5
<b>Cavalo 4</b>	135	292,5	227,5	310
<b>Cavalo 5</b>	127	247,5	257,5	342,5

ST: Sangue total; P1: Método de Brecher; P2: Método G&S; P3: Método Rees-Hecker modificado.

Essa tendência pode ser comprovada devido a diferença estatística observada entre a média dos valores de ST em relação a P1, P2 e P3 (Tabela 4). Isso demonstra que o processamento para obtenção de PRP por meio do protocolo de Muthu et al. (2022) foi efetivo para o experimento, pois obteve uma dose com grande concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma, independentemente do método utilizado para essa avaliação.

**Tabela 4.** Médias e desvios padrões dos valores da contagem de plaquetas no ST e nos diferentes protocolos testados.

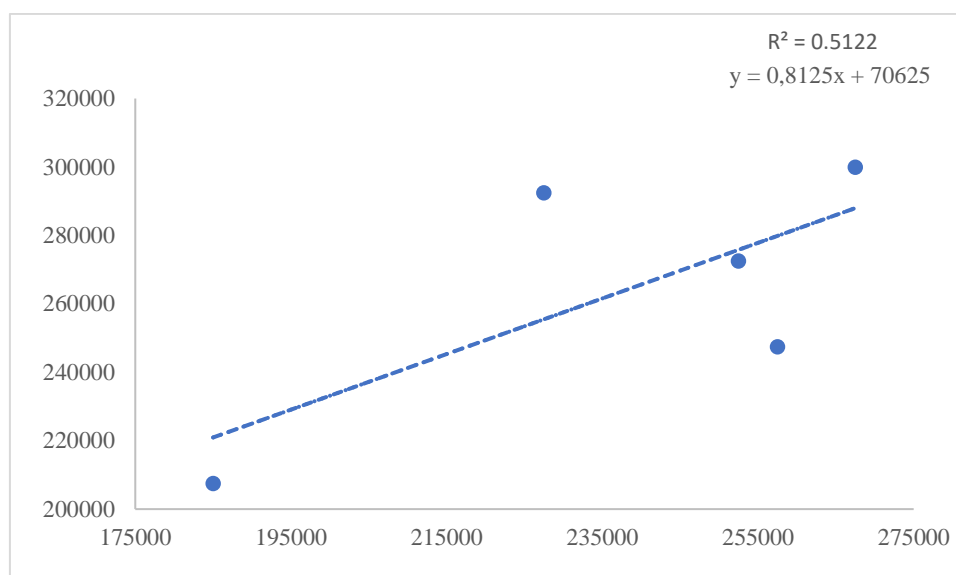
	<b>ST (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	<b>P1 (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	<b>P2 (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	<b>P3(x10<sup>3</sup>/μl)</b>
<b>Média</b>	114a	264b	238b	287b
<b>DP</b>	30,5	37,6	33,1	38,1

ST: Sangue total; P1: Método de Brecher; P2: Método G&S; P3: Método Rees-Hecker modificado.

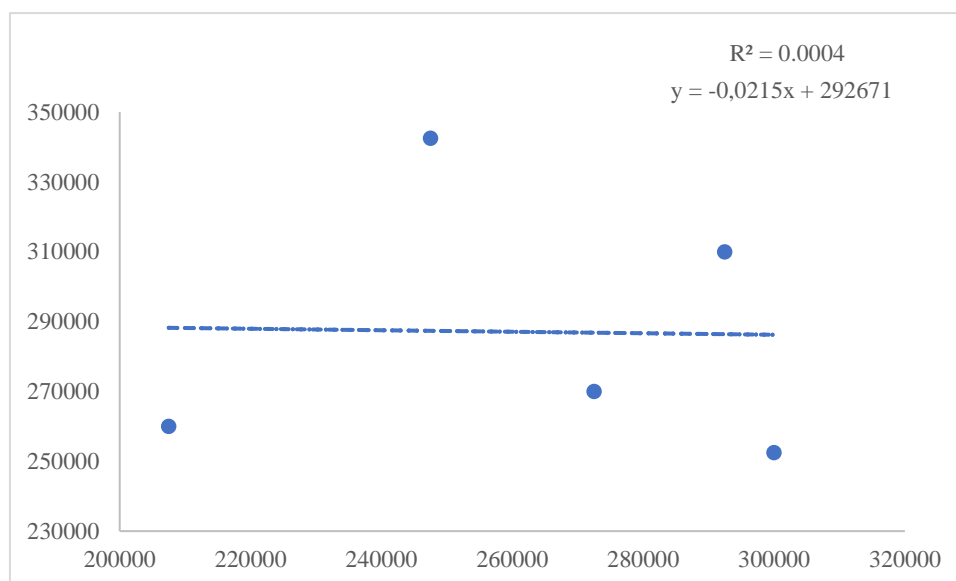
O método de Brecher foi utilizado como parâmetro nesta pesquisa em razão da credibilidade alcançado por essa metodologia que é recomendada pelo Conselho Internacional de Normalização em Hematologia e pela Sociedade Internacional de Hematologia Laboratorial, inclusive para amostras humanas com trombocitopenia (Harrison, 2001). Além disso, a contagem manual de plaquetas é um método que possibilita a avaliação individual de plaquetas, diferente dos métodos automáticos, que podem interpretar um agregado plaquetário como uma única plaqueta (Moreno e Menke, 2002).

Constatou-se ainda que não houve diferença significativa entre os métodos de contagem avaliados (Tabela 4), havendo, portanto, uma similaridade numérica das avaliações. Entretanto, quando comparados os protocolos P1 e P2 obtiveram boa correlação (Gráfico 1). A correlação propõe uma relação entre as duas variáveis, de maneira que quando uma varia a outra varia igualmente, logo os resultados observados sugerem uma similaridade entre os dados e uma segurança quanto ao uso do método G&S na avaliação de plaquetas no PRP. Resultado diferente foi observado na correlação entre os métodos P1 e P3 que foi ligeiramente negativa (Gráfico 2), o que indica uma falta de associação entre os valores de plaquetas observados nos protocolos.

**Gráfico 1.** Correlação entre o método de Brecher e o método G&S.



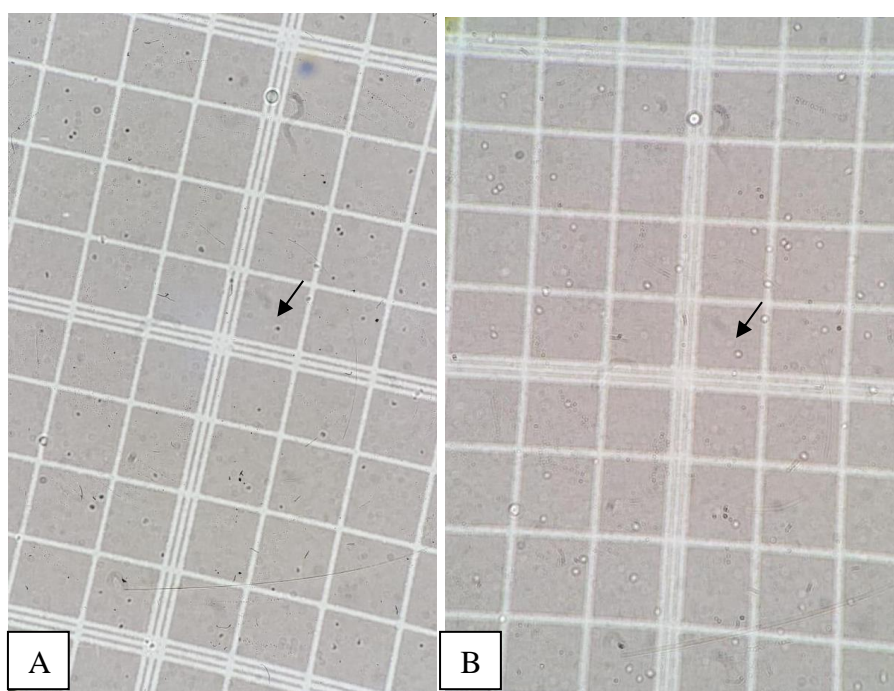
**Gráfico 2.** Correlação entre o método de Brecher e o método Rees-Hecker modificado.



A correlação entre protocolos de avaliação foi tomada como parâmetros em outros trabalhos com objetivo de comparar métodos de contagem de plaquetas em amostra de sangue humano, Ramirez-Ubillus et al. (2020) observou uma correlação positiva entre o método de Brecher, o método G&S, o método indireto e a contagem óptica de plaquetas, assim como Comar et al. (2009) que ao comparar diferentes métodos manuais de contagem manuais, também em amostras de sangue humano, observou uma boa correlação estatística entre os métodos de Fonio modificado,

Bárbara H. O'Connor, Nosanchuk e Chang & Bennett, assim como entre os métodos manuais com o automático.

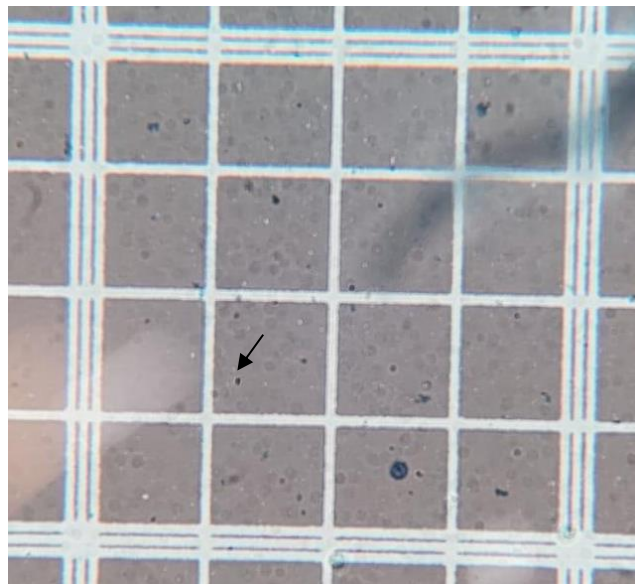
O método de Brecher utiliza oxalato de amônio a 1%, um líquido diluente que possui efeitos na plasmólise de hemácias, degeneração nuclear de leucócitos e ainda evita a adesão de plaquetas a outros elementos e a formação de agregados plaquetários (Lynch et al., 1972; Lewis et al., 2008). Com a diluição da amostra avaliada é possível observar as plaquetas sem a presença de outros elementos sanguíneos, entretanto a identificação plaquetária é feita apenas por sua morfologia e capacidade de refringência (Ilustração 06).



**Ilustração 06.** Plaqueta (seta preta) exibida em 40x (A) refringência plaquetária (seta preta) exibida em 40x (B) Fonte: Couto (2023).

Em contrapartida, o método proposto por Ramirez-Ubillus et al. (2020) utiliza não apenas o oxalato de amônio, com o objetivo de lise das hemácias, mas também azul de metileno HAMA, substância que possui bicarbonato de sódio em sua composição. O bicarbonato de sódio é responsável por oxidar o azul de metileno por ebulição, o que produz derivados com um número menor de grupos metil, esses por sua vez possuem atração eletrostática com as moléculas de glicosaminoglicano presentes na membrana plaquetária (Lillie, 1969), e por meio disso é possível que durante a contagem plaquetária as plaquetas possam ser visualizadas e diferenciadas

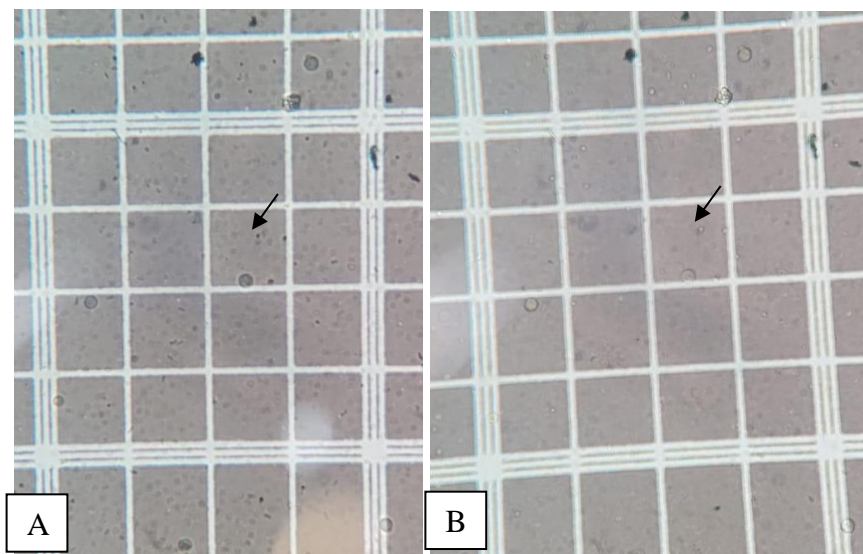
através da refringência, morfologia e coloração azulada (Ilustração 7), o que facilita a identificação.



**Ilustração 07.** Plaqueta corada (seta preta) exibida em 40x. Fonte: Couto (2023).

Por sua vez, o método de Rees-Ecker usa uma solução tamponada de citrato-formaldeído com azul de cresil brilhante. Esse líquido possibilita a fixação e preserva os eritrócitos e as plaquetas, além de possibilitar a observação dessas estruturas altamente refringentes e coradas em azul. Entretanto, o método original proposto por Rees e Ecker (1923) não possui uma substância que lise hemácias ou degenere outras células presentes na amostra avaliada, o que pode dificultar caso o objetivo seja apenas a visualização de plaquetas. Com isso em mente, no presente estudo o método Rees-Ecker foi modificado com o acréscimo de 450  $\mu$ l de oxalato de amônio a 1%.

O azul de cresil brilhante é considerada uma coloração supravital, ou seja, é capaz de corar células removidas de um organismo vivo antes de cessar as atividades celulares, é um corante que possui alta afinidade por RNA mensageiro e ribossomal, e devido a isso é capaz de corar filamentos e grânulos de RNA (Koepke, 1998). Após a modificação do método foi possível observar as plaquetas ligeiramente coradas em azul (Ilustração 08), entretanto a modificação da cor não foi tão intensa quanto a observada com o uso do azul de metileno HAMA, o que dificultou a visualização do avaliador.



**Ilustração 08.** Plaqueta (seta preta) exibida em 40x (A) refringência plaquetária (seta preta) exibida em 40x (B). Fonte: Couto (2023).

A menor visualização das plaquetas observada no método Rees-Ecker modificado pode esclarecer a correlação negativa observada entre esse protocolo e o método de Brecher. Resultados diferentes foram observados por Lasmar et al. (2003) que constatou uma correlação positiva e forte entre o método de Rees-Hecker e a contagem automática utilizando amostras de sangue humano.

### **Conclusão**

A partir dos resultados obtidos nas análises é possível verificar que o a utilização do método G&S é uma alternativa confiável, assim como o método de Brecher, sendo útil para auxiliar na melhor visualização de plaquetas no plasma rico em plaquetas de equinos, devido a correlação encontrada entre os protocolos. Avaliações adicionais são necessárias para averiguar se o método Rees-Ecker modificado possui o mesmo nível de confiabilidade, assim como para definir uma padronização eficiente para o uso do protocolo.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O período de estágio supervisionado obrigatório é um momento essencial para a finalização da graduação, pois através dele o discente desenvolve a capacidade de pôr em prática o conhecimento adquirido durante o curso. É possível nesse momento que o aluno crie habilidades de raciocínio clínico, tomada de decisões e desenvolvimento técnico, pessoal e interpessoal com colegas da futura profissão. Através das vivências proporcionadas durante o ESO o graduando ainda tem possibilidade de desenvolver a comunicação, organização e abordagem aos clientes e pacientes.

Durante o estágio na área de escolha foi factível o aprofundamento em técnicas de reprodução animal, como o avanço na habilidade de utilização de equipamentos e técnicas essenciais da área, assim como a determinação da capacidade reprodutiva de um animal. Além disso, com a experimentação e participação em projetos de pesquisa e o desenvolvimento de um artigo científico as competências quanto ao estudo científico foram ampliadas o que proporcionou possibilidades de pesquisas futuras.

Dessa forma, infere-se que o estágio é essencial para o progresso profissional e a conclusão do ciclo acadêmico.



#### 4. REFERÊNCIAS

BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P.R.; VAN SCHIE, H.T.M. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 21, n. 4, p. 554-561, ago. 2010.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías em caballos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 41, n. 2, p. 175-179, 2009.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; SAMUDIO, I. J. Autologous Platelet Concentrates as an Adjunctive Treatment for Chronic Laminitis in a Mare with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 191–195, mar. 2013.

CARTER, C.A.; JOLLY, D. G.; WONDEN, C.E.; HENDREN, D.G.; KANE, C.J.M. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, N. 3, p. 244-255, jun. 2003.

COMAR, S. R.; DANCHURA, H. S. M.; SILVA, P. H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 431–436, ago. 2009.

DAHLGREN, L.A.; NIXON, A.J.; BROWER-TOLAND, B.D. Effect of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 10, p. 1557-1562, out. 2001.

DEROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 276–281, ago. 2009.

FITZPATRICK, J; BULSARA, M.; ZHENG, M. H. The effectiveness of platelet-rich plasma in the treatment of tendinopathy. **The American Journal of Sports Medicine**. New York, v. 45, n. 1, p. 226-233, jan. 2017.

GARCIA, R.L.L.; COSTA, J.R.S.; PINHEIRO, S.S.; TORRIANI M.A. Plasma rico em plaquetas: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes**. Rio Grande do Sul, v. 12, n. 47-48, p. 216-219, dez. 2005

HARRISON, P. et al. An Interlaboratory Study of a Candidate Reference Method for Platelet Counting. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 115, n. 3, p. 448–459, mar. 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE 2021: Equinos (Cavalos) - Tamanho do rebanho. Rio de Janeiro, 2021.

JAIN, N. C. The platelets: structural, biochemical and functional aspects. In: OSCAR WILLIAM SCHALM et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1986.

KOEPKE, J.A. Laboratory evaluation of platelets. In: Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger, C.A; Koepke, J.A. **Clinical Hematology**. 2. ed. New York: Lippincott 1998.

LEWIS, S.; BAIN, B.; BATES, I. Hematología en laboratorios de recursos escasos. In: Elsevier España (Ed.) **Dacie y Lewis hematología práctica**. España: Elsevier; p. 580-581, 2008.

LILLIE, R. Quinone-iminedyes. In: CONN, H. J.; HOROBIN, R. W.; KIERNAN, J. A. **Conn's biological stains: a handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine**. Oxford: Published for the Biological Stain Commission by BIOS, 1969. p. 430.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016.

LÓPEZ, C.; CARMONA, J. U. Platelet-Rich Plasma as an Adjunctive Therapy for the Management of a Severe Chronic Distal Limb Wound in a Foal. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 9, p. 1128–1133, set. 2014.

LYNCH, M. et al. Obtención de muestras de sangre y citometría hemática. In: Folch R. (Ed.) **Métodos de laboratorio**. México: Nueva Editorial Interamericana, p. 713, 1972.

MERLINI, N.B.; FONZAR, J.F.; PERCHES, C.S. et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1742–1750, dez. 2014.

MORENO, A.; MENKE, D. Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 22, n. 1, p. 193–213, mar. 2002.

MUTHU, S.; KRISHNAN, A.; RAMANATHAN, K.R. Standardization and validation of a conventional high yield platelet-rich plasma preparation protocol. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 82, p. 1-13, out. 2022.

RAMIREZ-UBILLUS, G.C.; NEIRA-MONTOYA, C.R.; SEDANO-GELVET, E.E.; VERONA-CUEVA, J.F. Validation of a new method for estimating low platelet counts: G&S method. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, P. 1-7, maio 2020.

REGHINI, M.F.S. **Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas em éguas resistentes e suscetíveis à endometrites persistente após inseminação natural**. São Paulo, 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2013.

RESS, H.M.; ECKER, E E. An improved method of counting blood platelets. **JAMA**, v. 80, n. 9, p. 621–621, mar. 1923.

SALES, A. A. S. **O complexo do agronegócio do cavalo: uma análise sistêmica da equinocultura e tendências de mercado**. Monografia (Bacharelado em Gestão do Agronegócio) Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SEIDEL, S.R.T. et al. Does Double Centrifugation Lead to Premature Platelet Aggregation and Decreased TGF- $\beta$ 1 Concentrations in Equine Platelet-Rich Plasma? **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 3, p. 68, ago. 2019.

SOUZA, M.V. et al. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 599-612, jun. 2014.

TEIXEIRA, K. **Uso de plasma rico em plaquetas no tratamento de ulcerações corneanas superficiais em equinos**. Belo Horizonte, 2014. 71p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

UEBEL C. O. **Ação do plasma rico em plaquetas e seus fatores de crescimento na cirurgia dos microimplantes capilares**. Rio Grande do Sul. Tese (Doutorado em Medicina) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2006.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRA, M.S; FRANCO, T.R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 24-28, fev. 2006.

VENDRUSCOLO, C.P.; WATANABE, M.A.; MAIA, L.; CARVALHO, A.M.; ALVES, A.L.G. Plasma rico em plaquetas: Uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 33-43, mar. 2012.