



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

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO CENTRO DE EQUINOS DE PERNAMBUCO, NO MUNICÍPIO DE  
GRAVATÁ – PE, E NA CLÍNICA VETERINÁRIA BIXO’S, NO MUNICÍPIO DE  
JABOATÃO DOS GUARARAPES – PE.**

**ATIVÇÃO PLAQUETÁRIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS OBTIDOS E  
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO.**

**KAMILLA MARIA BARKOKEBAS DUTRA DOS SANTOS**

**RECIFE  
2025**



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

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO CENTRO DE EQUINOS DE PERNAMBUCO, NO MUNICÍPIO DE  
GRAVATÁ – PE, E NA CLÍNICA VETERINÁRIA BIXO’S, NO MUNICÍPIO DE  
JABOATÃO DOS GUARARAPES – PE.**

**ATIVÇÃO PLAQUETÁRIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS OBTIDOS E  
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO.**

**KAMILLA MARIA BARKOKEBAS DUTRA DOS SANTOS**

Relatório apresentado junto à disciplina Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), do curso de bacharelado em Medicina Veterinária, do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), relativo ao Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária, sob Orientação do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro.

**RECIFE**

**2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Bibliotecário(a): Auxiliadora Cunha – CRB-4 1134

S237a Santos, Kamilla Maria Barkokebas Dutra dos.  
Ativação plaquetária do plasma rico em plaquetas obtidos e submetidos à criopreservação e liofilização: Relatório do estágio supervisionado obrigatório(eso), realizado no centro de equinos de Pernambuco, no Município de Gravatá - PE, e na Clínica Veterinária Bixo's, no Município de Jaboatão Dos Guararapes -PE / Kamilla Maria Barkokebas Dutra dos Santos. - Recife, 2025.

81 f.; il.

Orientador(a): Gustavo Ferrer Carneiro.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Medicina Veterinária, Recife, BR-PE, 2025.

Inclui referências.

1. Anemia infecciosa eqüina. 2. Veterinária - Diagnóstico. 3. Testes laboratoriais veterinários. I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.089



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

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO CENTRO DE EQUINOS DE PERNAMBUCO, NO MUNICÍPIO DE  
GRAVATÁ – PE, E NA CLÍNICA VETERINÁRIA BIXO’S, NO MUNICÍPIO DE  
JABOATÃO DOS GUARARAPES – PE.**

**ATIVÇÃO PLAQUETÁRIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS OBTIDOS E  
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO.**

**Trabalho de Conclusão de Curso elaborado por:  
KAMILA MARIA BARKOKEBAS DUTRA DOS SANTOS**

**Aprovado em:  
03/02/2025**

**BANCA AVALIADORA**

---

**Profº Gustavo Ferrer Carneiro  
Departamento de Medicina Veterinária UFRPE**

---

**MV. Gilvannya Gonçalves de Sobral  
Mestre e Doutora em biociência animal pela UFRPE**

---

**MV. Anderson Ramos da Silva  
Responsável técnico da Clínica Veterinária Bixo’s**

## AGRADECIMENTOS

Eu passei horas refletindo sobre como agradecer por tudo o que vivi. Deus me mostrou a minha força quando eu não acreditava mais em mim. Hoje, tudo o que estou vivendo é permissão Dele, que plantou o sonho no meu coração. A Ele, minha eterna gratidão pelos milagres na minha vida.

À minha família, especialmente aos meus pais, Carmita e Valdenio, que estiveram ao meu lado em cada passo dessa jornada. Sem vocês, nada disso seria possível. Vocês são minha grande inspiração, e como vocês sempre dizem: 'Finalmente, chegou a época da colheita.' Amo vocês eternamente.

Ao meu orientador, Gustavo Ferrer, por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava de mim mesma, e por reacender minha paixão pelos equinos. Sou imensamente grata por nunca ter me deixado sozinha e por ser uma grande inspiração na minha vida.

A toda a equipe Bixo's, minha base sólida, que me incentivou, me ensinou e me formou como profissional. Gratidão eterna a cada um de vocês: Dr. Anderson, dona Cláudia, Dra. Yasmim, Dra. Mirna, Ana, Dra. Izadora e Rhay. Obrigada por todo o aprendizado compartilhado e por todo o companheirismo.

Aos meus amores Dafnni, Layla, Bárbara, Amandinha, Larissa e Mateus, que tornaram todo o processo mais leve e me apoiaram com tanto carinho, sempre ao meu lado em cada desafio da faculdade. E Marcos, meu namorado, que com sua paciência, incentivo e apoio incondicional me ajudou desde o começo da graduação, sempre me apoiando a crescer a cada dia.

E, por fim, ao meu pequeno grande guerreiro, Reck Barkokebas. Você foi o meu maior incentivo, me acompanhando em cada momento com amor e força. Juntos, superamos essa jornada.

Grata por todas as bênçãos de Deus e por todos que fizeram parte desse meu sonho. Vocês são essenciais na minha vida.

## EPÍGRAFE

*"Entregue ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos."*

– Provérbios 16:3

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fachada do Centro de Equinos de Pernambuco LTDA.....	18
<b>Figura 2.</b> Escopo de credenciamento do laboratório Centro de Equinos de Pernambuco Ltda... 19	
<b>Figura 3:</b> A) Entrada; B) Recepção; C) Administração e almoxarifado; D) Sala de reunião; E) Laboratório E) Laboratório F) Laboratório G) Sala de lavagem e esterilização H) Copa. 21	
<b>Figura 4 e 5.</b> Figura 4 a esquerda, requisição de exame para o diagnóstico do mormo. A direita, figura 5, Técnica de separação e manuseio de amostras biológicas para extração de soro sanguíneo em ambiente laboratorial.....	22
<b>Figura 6.</b> Kit de imunodifusão utilizado para o diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina (AIE), contendo antígeno e soro padrão em apresentação líquida.....	22
<b>Figura 7.</b> Lacre de segurança com código de identificação utilizado para amostras de AIE...23	
<b>Figura 8.</b> Reagentes e materiais utilizados na preparação do gel 1%.....	24
<b>Figura 10.</b> A) Processo de elaboração de lâminas com micropipeta em laboratório. B) Lâminas cortadas em formato de roseta distribuídas uniformemente e um adaptador para corte.....	25
<b>Figura 11.</b> Protocolo laboratorial de análise para AIE: A) Preparo das lâminas; B) Incubação em condições controladas; C) Utilização de caixa de fundo preto; D) Visualização dos resultados após 48 horas.....	25
<b>Figura 12.</b> Resultado positivo para Anemia Infecciosa Equina (AIE) demonstrado pela formação de linhas de precipitação utilizando a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).....	26
<b>Figura 13.</b> Lacre de segurança com código de identificação utilizado para amostras de	

Mormo.....	27
<b>Figura 14.</b> Kit de ensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizado no diagnóstico laboratorial de Mormo.....	28
<b>Figura 15.</b> Materiais utilizados no preparo da solução de lavagem para ensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	29
<b>Figura 16.</b> A) Leitor de microplacas utilizado no ensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); B) Exemplo de resultado obtido com a leitura das microplacas.....	30
<b>Figura 17.</b> Resultados do teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com identificação de controles positivos e negativos e amostras reagentes.....	31
<b>Figura 18.</b> Fachada da Clínica Veterinária Bixo's: estrutura externa do estabelecimento.....	33
<b>Figura 19.</b> Entrada do laboratório da Clínica Veterinária Bixo's: acesso à área de realização de análises laboratoriais.....	34
<b>Figura 20.</b> Estrutura interna do laboratório da Clínica Veterinária Bixo's: organização e disposição de equipamentos para análises laboratoriais.....	35
<b>Figura 21.</b> Acondicionamento de amostras biológicas: organização e armazenamento adequado para análise laboratorial.....	36
<b>Figura 22.</b> A) Corante Panótico Rápido para coloração diferencial de amostras biológicas; B) Lâmina corada utilizada para observação das estruturas celulares; C) Contador hematológico automático utilizado para análise de parâmetros sanguíneos.....	37
<b>Figura 23.</b> Corante Azul de Cresil Brillhante: utilizado para a coloração diferencial de reticulócitos em amostras sanguíneas.....	39
<b>Figura 24.</b> Achados microscópicos em esfregaços sanguíneos caninos: A) Inclusões sugestivas de gametócitos de Hepatozoon sp.; B) Basófilo identificado em esfregaço sanguíneo; C) Microfilária visualizada em esfregaço sanguíneo.....	40

<b>Figura 25.</b> Analisador bioquímico semiautomático Bio Plus Bio 2000®: equipamento utilizado para a determinação de parâmetros bioquímicos em amostras biológicas.....	41
<b>Figura 26.</b> A) Analisador bioquímico automático IDEXX Catalyst One®. B) Analisador de Eletrólitos Electrolyte.....	42
<b>Figura 27.</b> Oocistos de <i>Cystoisospora</i> sp. observados em exame coproparasitológico de amostra fecal de canino.....	43
<b>Figura 28.</b> Testes imunocromatográficos: A) Teste IDEXX SNAP 4DX para detecção de <i>Ehrlichia</i> sp., <i>Anaplasma</i> sp., <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Borrelia burgdorferi</i> , apresentando resultado positivo para <i>Anaplasma</i> sp.; B) Teste IDEXX SNAP 4DX com resultado positivo para <i>Ehrlichia</i> sp.; C) Teste Alere para diagnóstico de <i>Giardia</i> , mostrando resultado positivo....	45
<b>Figura 29.</b> Coleta de amostra de sangue por venopunção da veia jugular externa em equino: A) Preparação antisséptica do local; B) Realização da tricotomia na área de punção; C) Coleta do sangue na veia jugular externa.....	58
<b>Figura 30.</b> Centrifugação de amostras biológicas realizada em centrífuga Megafuge 16 (Datamed): etapa essencial para a separação de componentes sanguíneos para obtenção do PRP.....	59
<b>Figura 31.</b> Resultado das amostras biológicas após a primeira centrifugação, com separação das camadas: plasma pobre em plaquetas, plasma rico em plaquetas e células vermelhas.....	60
<b>Figura 32.</b> Microdiluição realizada pelo método de Brecher: técnica aplicada para quantificação de plaquetas.....	61
<b>Figura 33.</b> Observação de plaquetas na câmara de Neubauer pelo método de Brecher, com ampliação de 40x: técnica utilizada para a contagem manual de plaquetas em amostras biológicas.....	61

**Figura 34.** Observação de plaqueta ativada com emissão de pseudópodes: registro microscópico evidenciando a morfologia característica durante o processo de ativação plaquetária..... 62

**Figura 35.** Equipamento Alpha 1-4 LD Plus Christ: sistema utilizado para liofilização de amostras biológicas..... 64

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição percentual dos exames laboratoriais realizados para AIE e Mormo..	33
<b>Tabela 1.</b> Quantificação de amostras positivas e negativas obtidas nos testes de AIE por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e Mormo por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	33
<b>Tabela 2.</b> Frequência de solicitação das principais análises histológicas realizadas na rotina clínica da clínica veterinária Bixo 's.....	47
<b>Tabela 3.</b> Frequência de solicitação dos principais testes bioquímicos realizados na rotina clínica da Clínica Veterinária Bixo's.....	48
<b>Gráfico 2.</b> Distribuição percentual dos testes imunocromatográficos.....	49
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros hematológicos utilizados na avaliação e seleção dos animais.....	59
<b>Tabela 5.</b> Resultados da contagem de plaquetas no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP) pelo método manual de Brecher.....	67
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos na avaliação morfológica do PRP avaliado à fresco.....	67
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos na avaliação morfológica do PRP avaliado após 6 horas de refrigeração.....	67
<b>Tabela 8.</b> Estatística descritiva dos dados obtidos para PRP normais em 6 equinos de diferentes grupos e tratamentos.....	73
<b>Tabela 9.</b> Estatística para comparação entre os diferentes tratamentos e o grupo “a fresco”, evidenciando as plaquetas normais, incertas e ativadas em 6 equinos, através do teste t pareado.....	74
<b>Tabela 10.</b> Estatística para comparação de plaquetas normais entre todos os tratamentos de 6 equinos por teste post hoc Tukey HSD.....	74

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ALT - Alanina Aminotransferase  
AST - Aspartato Aminotransferase  
AIE - Anemia Infecciosa Equina  
CRMV– Conselho Regional de Medicina Veterinária  
ESO - Estágio Supervisionado Obrigatório  
ELISA – enzyme linked immunosorbent assay  
FA - Fosfatase Alcalina  
FeLV - Vírus da Leucemia Felina  
FIV - Vírus da Imunodeficiência  
GGT - Gamaglutamil Transferase  
IGG- Imunoglobulina G  
IGM - Imunoglobulina M  
IDGA – imunodifusão em gel de Agar  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
PRP- Plasma rico em plaquetas  
SDMA - Dimetilarginina  
TGO - Transaminase Oxalacética  
TGP - Transaminase glutâmica Pirúvica

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

°C - Graus  
μL - Microlitros

## RESUMO

O presente trabalho descreve as atividades desenvolvidas no Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), disciplina obrigatória da grade curricular do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com carga horária total de 420 horas. O estágio foi realizado, inicialmente, no Centro de Equinos de Pernambuco, localizado no município de Gravatá – PE, e, posteriormente, no Laboratório de Patologia Clínica da Clínica Veterinária Bixo's, no município de Jaboatão dos Guararapes – PE, sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, durante o período de 1º de novembro de 2024 a 21 de janeiro de 2025. Ao longo do estágio, realizado no Centro de Equinos de Pernambuco, foi possível participar ativamente da rotina laboratorial, acompanhando e auxiliando na realização de exames para diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina e Mormo Equino. Além disso, no Laboratório de Patologia Clínica, tive a oportunidade de participar de diversas análises laboratoriais, incluindo exames hematológicos e bioquímicos, urinálises, exames parasitológicos de fezes, testes imunocromatográficos e citologias dermatológicas. Adicionalmente, colaborei na confecção dos respectivos laudos ao final das análises, contribuindo para a interpretação dos resultados. Este relatório inclui, ainda, a apresentação de um artigo que aborda a ativação plaquetária do plasma rico em plaquetas obtidos e submetidos à criopreservação e liofilização. O estudo foi realizado no Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, sendo parcialmente desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Patologia Clínica da Clínica Bixo's.

**Palavras-chave:** Exames; Diagnóstico; Plasma rico em plaquetas; Fatores de crescimento.

## ABSTRACT

This paper describes the activities developed in the Mandatory Supervised Internship (ESO), a mandatory discipline in the curriculum of the Veterinary Medicine course at the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), with a total workload of 420 hours. The internship was initially carried out at the Pernambuco Equine Center, located in the city of Gravatá - PE, and later at the Clinical Pathology Laboratory of the Bixo's Veterinary Clinic, in the city of Jaboatão dos Guararapes - PE, under the guidance of Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, during the period from November 1, 2024 to January 21, 2025. During the internship, carried out at the Pernambuco Equine Center, it was possible to actively participate in the laboratory routine, monitoring and assisting in the performance of tests for the diagnosis of Equine Infectious Anemia and Equine Glanders. In addition, at the Clinical Pathology Laboratory, I had the opportunity to participate in several laboratory analyses, including hematological and biochemical tests, urinalysis, parasitological fecal examinations, immunochromatographic tests and dermatological cytology. In addition, I collaborated in the preparation of the respective reports at the end of the analyses, contributing to the interpretation of the results. This report also includes the presentation of an article that addresses platelet activation of platelet-rich plasma obtained and subjected to cryopreservation and lyophilization. The study was carried out at the Andrology Laboratory (ANDROLAB) of the Department of Veterinary Medicine at UFRPE, and was partially developed in collaboration with the Clinical Pathology Laboratory of Clínica Bixo's.

**Keywords:** Exams; Diagnosis; Platelet-rich plasma; Growth factors.

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO I</b>	<b>17</b>
1.1 Introdução sobre o ESO	17
1.2 Descrição do local do estágio	19
1.2.1 Centro de Equinos de Pernambuco, em Gravatá-PE	19
1.3 Descrição das atividades realizadas	22
1.3.1 Recebimento das amostras	22
1.3.2 Processamento das amostras para Anemia Infecciosa Equina (AIE)	24
1.3.3 Processamento das amostras para Mormo	29
1.4 Discussão das atividades realizadas	33
1.4.1 Casuística laboratorial	33
1.4.2 Considerações Finais	34
2. Descrição do local do estágio	36
2.1. Laboratório de Patologia Clínica Bixo's	36
2.2 Recebimento das amostras	38
2.3 Descrição das atividades realizadas	39
2.3.1 Processamento das amostras	39
2.3.2 Hematologia	39
2.3.3 Testes bioquímicos	42
2.3.4 Coproparasitológico de fezes	44
2.3.5 Urinálise	45
2.3.6 Testes imunocromatográficos	46
2.3.7 Citologias	47
2.4 Discussão das atividades realizadas	48
2.4.1 Casuística laboratorial	48
2.4.2 Considerações finais	48
3. REFERÊNCIAS	49

<b>CAPÍTULO II</b>	<b>50</b>
<b>ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS OBTIDOS E SUBMETIDO À LIOFILIZAÇÃO.</b>	<b>50</b>
1. RESUMO	51
2. INTRODUÇÃO GERAL	52
3. OBJETIVOS	55
3.1 Geral	55
3.2 Específicos	55
4. METODOLOGIA	56
4.1 Seleção de animais	56
4.2 Coleta de Sangue	57
4.3 Processamento e padronização das amostras	58
4.4 Contagem Manual de Plaquetas	60
4.5 Avaliação Morfológica das plaquetas	61
4.6 Criopreservação e congelamento das amostras	62
4.7 Liofilização das amostras	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	71
6.1 Resultados das análises estatísticas	72
7. CONCLUSÃO	76
8. REFERÊNCIAS	77

## **CAPÍTULO I**

### **RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO**

## **1. CAPÍTULO I**

### **1.1 INTRODUÇÃO SOBRE O ESO**

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) é uma disciplina obrigatória do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Ele proporciona aos estudantes experiências práticas na Medicina Veterinária, com o objetivo de prepará-los para a realidade profissional, sob a supervisão de profissionais qualificados. Dessa forma, o ESO promove vivências que aproximam os alunos da prática da profissão, consolidando os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo da graduação.

O presente estágio foi realizado no período de 1º de novembro de 2024 a 21 de janeiro de 2025, totalizando as 420 horas exigidas para a conclusão desse componente curricular. As atividades foram divididas em dois períodos e locais distintos. Inicialmente, o estágio ocorreu entre 1º novembro a 02 de dezembro de 2024, no Centro de Equinos de Pernambuco, localizado no Município de Gravatá – PE, sob a supervisão do Médico Veterinário Dr. Oswaldo Christiano Gomes Neto. Posteriormente, entre 03 de dezembro de 2024 a 21 de janeiro de 2025, as atividades foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Clínica Veterinária Bixo's, sob a supervisão da Médica Veterinária Dr<sup>a</sup>. Mirna Juliana Mendonça.

No Centro de Equinos de Pernambuco, o estágio teve como objetivo principal o acompanhamento e a realização de exames relacionados à rotina clínica de equinos, incluindo exames para Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Mormo, patologias de alta relevância para a equinocultura e que são de notificação obrigatória (Mapa, 2024). No caso dos exames de Anemia Infecciosa Equina e Mormo, as amostras recebidas no laboratório eram provenientes de pacientes externos. Essas amostras são coletadas por médicos veterinários devidamente registrados no Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV), contudo, para as amostras destinadas ao diagnóstico de Mormo, era exigida a habilitação dos veterinários pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Após a coleta, os animais eram cadastrados em um sistema, onde todas as informações eram mantidas em sigilo, acessíveis exclusivamente aos veterinários responsáveis pela coleta.

No laboratório, as amostras passavam por um processo rigoroso de triagem, sendo selecionadas, separadas e registradas antes da execução dos exames. Após a primeira triagem, as amostras consideradas aptas para o processamento eram encaminhadas para a técnica diagnóstica propriamente dita. O diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina era

realizado pelo método de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), enquanto o diagnóstico de Mormo era conduzido utilizando o método de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

No Laboratório de Patologia Clínica da Clínica Veterinária Bixo's, as atividades práticas foram voltadas para o aprendizado e a execução de análises laboratoriais que auxiliam no diagnóstico e prognóstico de animais domésticos, com ênfase em cães e gatos. As atividades realizadas no laboratório incluíram análises hematológicas e bioquímicas, urinálises, exames parasitológicos de fezes, testes imunocromatográficos, citologias dermatológicas, entre outras. O fluxo do laboratório compreende a recepção das amostras, a triagem para avaliação de sua viabilidade e acondicionamento, o processamento das amostras, a análise técnica e a elaboração dos laudos diagnósticos, além da interpretação dos resultados. Vale ressaltar que as amostras recebidas no laboratório são provenientes de pacientes atendidos na própria clínica.

## 1.2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO

### 1.2.1 CENTRO DE EQUINOS DE PERNAMBUCO, EM GRAVATÁ-PE

O primeiro momento do estágio supervisionado obrigatório, foi realizado no Centro de Equinos de Pernambuco, localizado na Rua Dom Carlos Coelho, nº 54, Prado, Gravatá – PE, no período de 01 de novembro a 02 de dezembro de 2024 (Figura 1).

A escolha do Centro de Equinos de Pernambuco como primeira instituição para a realização do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi motivada pelo objetivo de ampliar a formação prática em uma área da Medicina Veterinária ainda não abordada durante a graduação. O estágio teve como finalidade proporcionar uma vivência prática no diagnóstico de doenças em equídeos, com ênfase no aprimoramento dos conhecimentos sobre métodos diagnósticos e preventivos aplicados à AIE e ao Mormo, essenciais para o transporte seguro e adequado de equinos, garantindo a saúde e o bem-estar dos animais.

O laboratório funciona de segunda a sexta-feira, das 7:30 às 17:00 e conta com uma equipe composta por uma gerente de qualidade, um responsável técnico, um responsável técnico substituto e uma recepcionista.



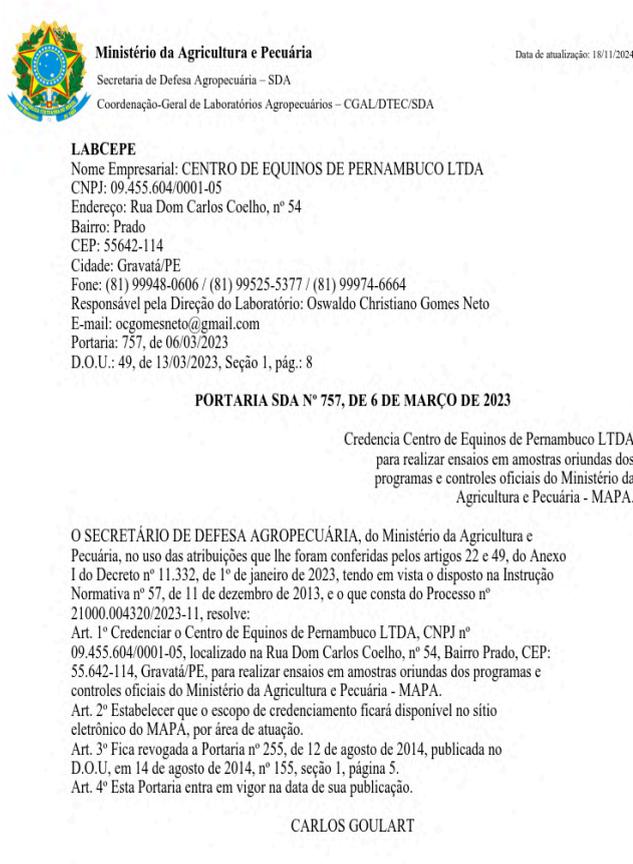
**Figura 1.** Fachada do Centro de Equinos de Pernambuco LTDA.

Fonte: Arquivo Pessoal, (2025).

Os laboratórios responsáveis pela realização de exames para diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Mormo devem ser devidamente credenciados, conforme as normativas estabelecidas. Essas normas garantem que os laboratórios atendam aos requisitos técnicos necessários e assegurem a validade dos resultados obtidos para o diagnóstico dessas patologias. Para o diagnóstico de AIE, os laboratórios devem ser credenciados conforme a Instrução Normativa SDA nº 45, de 15 de junho de 2004, que estabelece as normas para a

prevenção e controle dessa enfermidade. Já para o diagnóstico de Mormo, a Instrução Normativa MAPA nº 06, de 16 de janeiro de 2018, com alterações pela Portaria nº 593, de 30 de junho de 2023, detalha as diretrizes para o controle, prevenção e erradicação do Mormo, incluindo os requisitos de credenciamento dos laboratórios. Além disso, a Portaria SDA nº 84, de 19 de outubro de 1992, regulamenta o credenciamento e monitoramento dos laboratórios que atuam na área de diagnóstico, reforçando a necessidade de garantir a competência técnica nos laboratórios responsáveis pelas análises

Com isso, conforme a Portaria SDA nº 757, de 6 de março de 2023, o Centro de Equinos de Pernambuco LTDA foi credenciado para realizar ensaios em amostras oriundas de programas e controles oficiais do MAPA ( Figura 2).



**Figura 2.** Escopo de credenciamento do laboratório Centro de Equinos de Pernambuco Ltda

Fonte: Ministério da Agricultura e Pecuária (2024).

A estrutura do laboratório é composta pelas seguintes áreas: entrada/recepção, almoxarifado, administração, sala de reuniões, laboratório, sala de lavagem e esterilização, e copa. A recepção é o local onde são realizados os atendimentos e a triagem de amostras e

documentos. O almoxarifado é responsável pelo armazenamento de materiais e documentações, enquanto o setor de administração gerencia atividades como controle financeiro, documentação e conformidade regulatória. A sala de reuniões é utilizada para encontros internos, discussões estratégicas e auditorias (Figura 3)

O laboratório é local destinado ao processamento das amostras, sendo o mesmo equipado para a realização de análises, seguindo normas de biossegurança, e conta com uma sala de lavagem e esterilização para a higienização de materiais. Entre os equipamentos disponíveis para realização das análises, destacam-se uma estufa, leitor de microplacas, centrífuga, pipetas para análises moleculares calibradas, uma câmara úmida, uma balança de precisão e uma caixa de fundo preto. O laboratório também dispõe de bancadas específicas para o processamento de amostras, uma pia, um refrigerador, um freezer e um computador.



**Figura 3:** A) Entrada; B) Recepção; C) Administração e almoxarifado; D) Sala de reunião; E) Laboratório E) Laboratório F) Laboratório G) Sala de lavagem e esterilização H) Copa

Fonte: Arquivo pessoal, (2024)

### 1.3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS

#### 1.3.1 RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas, são acondicionadas em tubos com ativador de coágulos e acondicionadas em caixas isotérmicas sob refrigeração. Em seguida, são enviadas ao laboratório do Centro de Equinos de Pernambuco (CEPE), juntamente com as resenhas e formulários de requisições, devidamente preenchidos, assinados e carimbado (Figura 5).

Vale salientar que, para os exames de AIE, a coleta deve ser realizada exclusivamente por médicos veterinários devidamente registrados no Conselho Regional de Medicina Veterinária (MAPA, 2004). No caso de exames para diagnóstico de Mormo, os requisitos de envio são semelhantes aos de AIE, mas o médico veterinário responsável deve estar habilitado pela Secretaria de Agricultura da Unidade Federativa (UF) correspondente e ter seu nome incluído na lista oficial do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).

Por fim, as amostras aprovadas na triagem são cadastradas no sistema estabelecido pela empresa e, em seguida, encaminhadas para o processamento. Posteriormente, as amostras são divididas obrigatoriamente em duas alíquotas de volumes iguais, suficientes para a realização dos exames de prova e contraprova.

REQUISIÇÃO DE EXAME PARA O DIAGNÓSTICO DO MORMO			
PELO MÉTODO: ( ) FC (✓) ELISA		SÉRIE	
FINALIDADE DO EXAME: ( ) TRANSITO NACIONAL ( ) TRANSITO INTERNACIONAL		Nº:	
Proprietário do Animal:		CPF/CNPJ:	
Endereço:			
Cidade:		UF:	Fone:
Médico Veterinário Requirente:		CPF:	CRM/VUF:
Email:		Portaria de Habilitação nº:	Fone:
Endereço:			
Cidade:		UF:	
Nome do Animal:		Registro nº / Marca:	
Especie:	Raça:	Sexo:	Idade:
<input type="checkbox"/> Equina <input type="checkbox"/> Asina <input type="checkbox"/> Mur		<input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Propriedade onde se encontra (endereço completo):			
Classificação:		Nº de Cadastro da Propriedade no Órgão de Defesa Sanitária Estadual:	
<input type="checkbox"/> JC <input type="checkbox"/> SH <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> PC <input type="checkbox"/> UM <input type="checkbox"/> OUTRA:			
Coordenadas Geográficas:		Nº de equinos existentes:	
Cidade:		UF:	
Pelagem			
Descrição do Animal:			
A coleta da amostra e resenha deste animal são de minha responsabilidade.			
Município		Data da coleta	Assinatura e Carimbo do Médico Veterinário Requirente

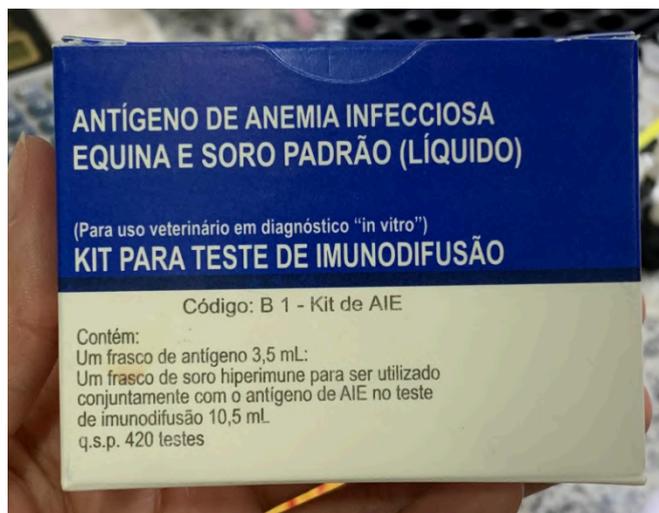


**Figura 4 e 5.** Figura 4 a esquerda, requisição de exame para o diagnóstico do mormo. A direita, figura 5, Técnica de separação e manuseio de amostras biológicas para extração de soro sanguíneo em ambiente laboratorial.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

### **1.3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (AIE)**

O processamento das amostras para o diagnóstico de AIE deve ser realizado de acordo com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Apenas antígenos (Ag) e soros controle devidamente registrados no MAPA podem ser utilizados, sendo essencial verificar o prazo de validade desses materiais antes de serem utilizados, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados.



**Figura 6.** Kit de imunodifusão utilizado para o diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina (AIE), contendo antígeno e soro padrão em apresentação líquida.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

Após as amostras serem divididas em duas alíquotas, uma destinada à realização do teste e outra reservada para um possível contraprova, as mesmas são organizadas e separadas de acordo com a rodada de análise. Cada conjunto de exames é acondicionado em lacres numerados, invioláveis, com identificação numérica para cada rodada. Para as amostras para AIE, os lacres utilizados possuem coloração amarela, com objetivo de diferenciar o lacre das amostras de Mormo, que possuem lacres na coloração vermelha.



**Figura 7.** Lacre de segurança com código de identificação utilizado para amostras de AIE.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

Os testes de diagnóstico para AIE realizados no laboratório incluem a prova sorológica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). O Teste de IDGA, é o método considerado confirmatório, no qual, apresenta alta especificidade e sensibilidade para a detecção de anticorpos, porém em contrapartida, possui um tempo de processamento maior, podendo levar até 48 horas para liberação do seu resultado (Franco,2011; Paes, 2011). Com isso, vale ressaltar que a técnica de IDGA apresenta uma vantagem frente às outras técnicas diagnósticas, pelo fato da sua capacidade de diferenciar especificamente antígenos molecularmente muito próximos, onde a proteína P26 que é utilizada é estável e específica nas análises de AIE (Silva,2007).

Inicialmente, algumas técnicas são necessários para a elaboração do gel para o IDGA, como o gel a 1%, preparado com 1g de ágar noble e 100ml do tampão borato posteriormente aquecido em microondas até completar a fusão. O tampão borato também é preparado no laboratório, com 2g de hidróxido de sódio (NaOH), 9g de ácido bórico (H3BO3) e 1000ml de água destilada.



**Figura 8.** Reagentes e materiais utilizados na preparação do gel 1%.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).



**Figura 9.** Materiais e reagentes empregados na formulação do tampão borato, incluindo ácido bórico, agar noble e hidróxido de sódio P.A.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

Após a preparação do gel a 1%, é realizada a divisão em alíquotas de aproximadamente 20 a 30mL e armazenado sob refrigeração para posterior utilização. Para a elaboração das lâminas, utiliza-se cerca de 5mL de gel que após sua solidificação em temperatura ambiente, devem ser armazenadas em geladeira entre 5°C e 8°C e protegidas em recipientes adequados para evitar o ressecamento, com o intuito de facilitar o manuseio durante o corte das rosetas nas lâminas de vidro (Figura 10).



**Figura 10.** A) Processo de elaboração de lâminas com micropipeta em laboratório. B) Lâminas cortadas em formato de roseta distribuídas uniformemente e um adaptador para corte.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024)

Subsequentemente a preparação das lâminas e o corte das rosetas, contendo 7 furos de tamanho padrão, com 4 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre eles, é realizada a técnica diagnóstica utilizando kits de imunodifusão, que contém 1 frasco de antígeno para AIE e 1 frasco de soro hiperimune. Durante a execução da técnica, são adicionados alternadamente nos poços 25 microlitros do soro do equino a ser testado e 25 microlitros do soro controle positivo, e na região central, são adicionados 25 microlitros de antígeno presente no kit. As lâminas são posteriormente incubadas em câmara úmida a uma temperatura entre 18°C e 26°C, por 48 horas. Após esse período é possível realizar a interpretação do resultado utilizando um sistema de iluminação de fundo escuro (Figura 11).

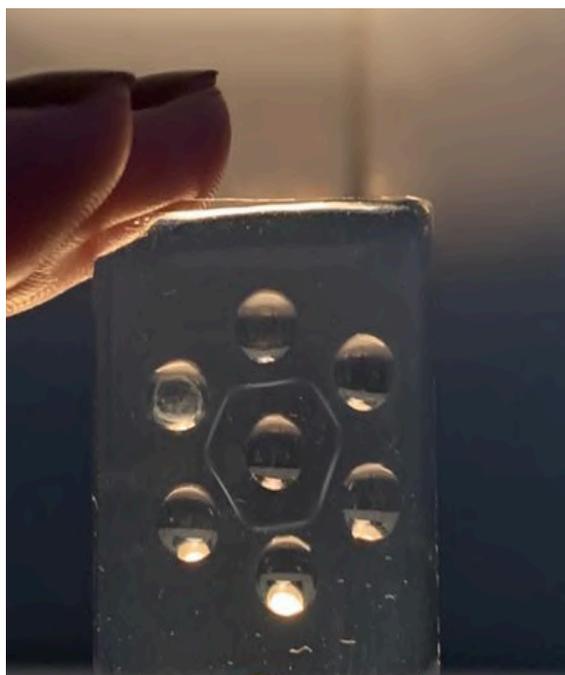


**Figura 11.** Protocolo laboratorial de análise para AIE: A) Preparo das lâminas; B) Incubação em condições controladas; C) Utilização de caixa de fundo preto; D) Visualização dos resultados após 48 horas.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

Nos casos em que o animal apresenta resultado positivo para Anemia Infecciosa

Equina (AIE), observa-se a formação de uma linha de precipitação entre o soro controle positivo e o antígeno presentes na roseta. Nesses casos, a amostra é submetida a uma contraprova utilizando a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), realizada em triplicata na mesma roseta, com o objetivo de confirmar o resultado. Se o resultado do exame for positivo, é obrigatório encaminhar uma cópia do relatório de ensaio ao Órgão Estadual de Sanidade Animal (OESA) e outra à Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SFA/MAPA) na unidade do Ministério da Agricultura e Pecuária correspondente ao estado de origem da amostra. Esse envio deve ser realizado no prazo máximo de 24 horas (Figura 12).



**Figura 12.** Resultado positivo para Anemia Infecciosa Equina (AIE) demonstrado pela formação de linhas de precipitação utilizando a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

As alíquotas para fins de contraprovas são devidamente identificadas, lacradas e estocadas em freezer a - 20° C por um período de 60 dias, o tempo de validade do resultado do exame negativo. Após esse prazo as amostras poderão ser descartadas.

### **1.3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MORMO**

Assim como as amostras de teste para AIE, as amostras de soro para Mormo devem ser enviadas a um laboratório credenciado. Elas precisam estar devidamente identificadas, acondicionadas em tubos com ativador de coágulo e mantidas sob refrigeração. Além disso,

devem ser acompanhadas de um formulário de requisição de exame de Mormo e das respectivas resenhas, devidamente preenchidas e assinadas.

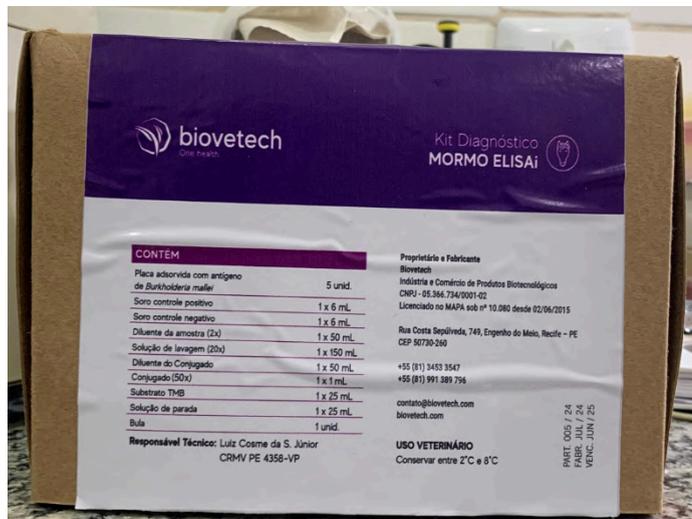
A responsabilidade pela coleta e envio das amostras é do Médico Veterinário habilitado, que deve estar registrado no Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV). Esse profissional também deve ter sido aprovado em capacitação específica sobre o Programa Nacional de Sanidade Equina (PNSE) e ter seu nome incluído na lista de veterinários autorizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2018). Ao chegarem ao laboratório, as amostras passam por uma triagem inicial, e aquelas que estão aptas para processamento são cadastradas no sistema e, em seguida, encaminhadas para análise. No laboratório, as amostras são divididas em duas alíquotas: uma destinada à realização do teste e a outra à uma possível contraprova. Posteriormente, as amostras são organizadas e separadas em lacres numerados e invioláveis, com identificação numérica específica para cada rodada de análise. ( Figura 13)



**Figura 13.** Lacre de segurança com código de identificação utilizado para amostras de Mormo.

Fonte: Arquivo pessoal,(2024).

Como método diagnóstico de triagem para o Mormo, o Centro de Equinos de Pernambuco utiliza o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Para a sua realização, são usados kits registrados e aprovados pelo MAPA conforme a legislação (citar a legislação entre aspas). Só é permitido usar os kits ELISA quando a leitura dos resultados é realizada em espectrofotômetro para microplacas. A função desses kits é detectar a presença de anticorpos contra *Burkholderia mallei*, principal agente causador da enfermidade, em amostra de soro sanguíneo de equídeos, garantindo a precisão e a confiabilidade nos resultados diagnósticos.



**Figura 14.** Kit de ensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizado no diagnóstico laboratorial de Mormo.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024)

A técnica utilizada é o ELISA indireto, que emprega uma fase sólida de microplacas adsorvidas com o antígeno da *Burkholderia mallei*. Quando há anticorpos presentes nas amostras analisadas, eles se ligam ao antígeno na fase sólida, formando o complexo denominado antígeno-anticorpo (Teles *et al.*, 2012). É importante ressaltar que esta técnica envolve várias etapas que devem ser seguidas rigorosamente. Entre elas, destacam-se as lavagens, as técnicas de pipetagem e o tempo de incubação. Além disso, cada componente deve ser retirado da geladeira apenas no momento do uso e, em seguida, retornado imediatamente à temperatura entre 5°C e 8°C.

Inicialmente, o soro da amostra é homogeneizado e diluído na proporção de 4 microlitros de soro equino para 196 microlitros de diluente, procedimento realizado em uma placa auxiliar. O diluente é previamente preparado com base na quantidade de amostras a serem testadas e o cálculo para o preparo do diluente é feito multiplicando 196 microlitros do diluente pelo número de amostras, dividindo-se o resultado por dois e utilizando esse valor para preparar uma solução de diluente na proporção de 1:1 com água destilada.

Após a diluição (196 microlitros de diluente, 4 microlitros de soro da amostra), 100

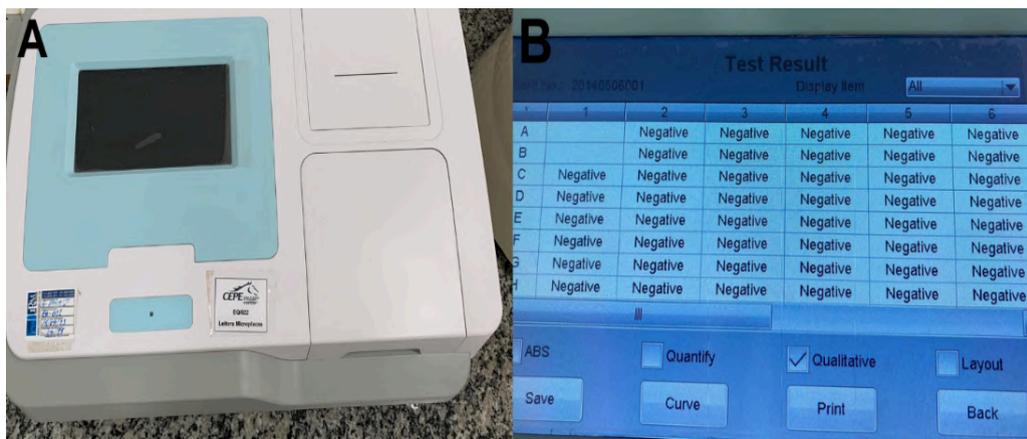
microlitros da amostra diluída, 100 microlitros de soro positivo e 100 microlitros de soro negativo são adicionados aos poços da placa de ELISA. A placa é então coberta e incubada por 60 minutos a 37°C e após a incubação, realiza-se a lavagem dos poços três vezes, utilizando aproximadamente 300 microlitros de solução de lavagem em cada etapa. Essa solução é previamente preparada no laboratório. Em seguida, prepara-se o conjugado. O cálculo necessário para determinar a quantidade de diluente do conjugado é feito multiplicando o número de poços por 100 microlitros, obtendo-se a quantidade de diluente. Esse valor é multiplicado por 20 microlitros para determinar a quantidade de conjugado a ser utilizada. Com o conjugado preparado, adiciona-se 100 microlitros em cada poço, cobrindo a placa e incubando-a por 45 minutos a 37°C (Figura 15).

Após essa incubação, realiza-se uma segunda lavagem, repetindo o processo quatro vezes. Por fim, 50 microlitros de substrato são adicionados a cada poço, e a placa é incubada sob proteção da luz por 15 minutos. Sem remover o conteúdo da placa, 50 microlitros de solução de parada são adicionados a cada poço. A leitura final é realizada no leitor de microplacas, seguida pela interpretação e liberação dos resultados. Os resultados obtidos por meio da técnica de ELISA permitem que sejam liberados no mesmo dia, após a finalização da rodada (Figura 16).



**Figura 15.** Materiais utilizados no preparo da solução de lavagem para ensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

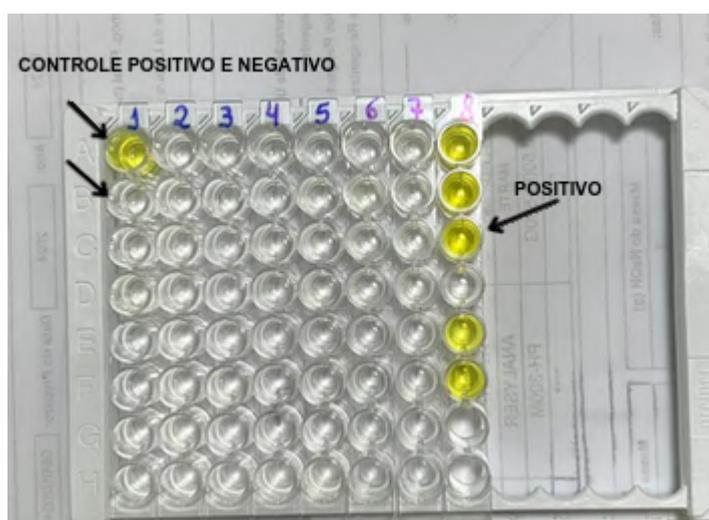
Fonte: Arquivo pessoal, (2024).



**Figura 16.** A) Leitor de microplacas utilizado no ensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); B) Exemplo de resultado obtido com a leitura das microplacas.

Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

Em caso de teste positivo, uma contraprova é realizada para confirmar o diagnóstico. Para isso, o laboratório credenciado utiliza uma alíquota da amostra, a qual está devidamente lacrada. Caso a confirmação seja positiva, a notificação do resultado é imediata e deve ser encaminhada ao Serviço Veterinário Oficial. Nos casos em que o resultado é negativo, a validade do exame é determinada a partir da data de coleta da amostra, com um período de validade de 60 dias (Figura 17).



**Figura 17.** Resultados do teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com identificação de controles positivos e negativos e amostras reagentes.

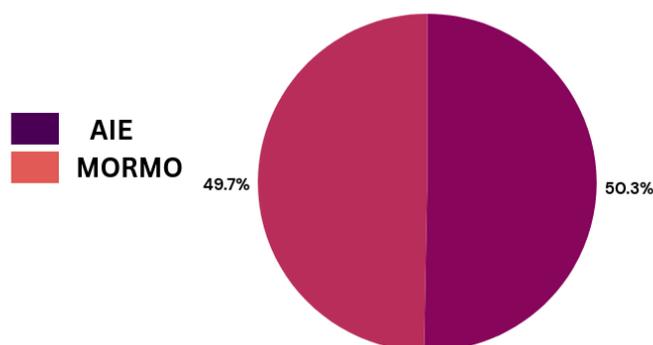
Fonte: Arquivo pessoal, (2024).

## 1.4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS

### 1.4.1 CASUÍSTICA LABORATORIAL

Durante o período de 01 de novembro de 2024 a 2 de dezembro de 2024, foram realizados exames para o diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina e Mormo em amostras de diferentes animais. No total, 256 exames foram realizados para Anemia Infecciosa Equina, enquanto 253 exames foram realizados para o diagnóstico de Mormo. Assim, a distribuição dos exames resultou em uma porcentagem de 50,3% para Anemia Infecciosa Equina e 49,7% para Mormo.

**Gráfico 1.** Distribuição percentual dos exames laboratoriais realizados para AIE e Mormo.



Do total de exames realizados, dois animais apresentaram resultados positivos para Anemia Infecciosa Equina (AIE). No caso do Mormo, apenas um animal obteve resultado positivo.

**Tabela 1.** Quantificação de amostras positivas e negativas obtidas nos testes de AIE por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e Mormo por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
AIE	2	254	256
MORMO	1	252	253
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>506</b>	<b>509</b>

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

## 1.4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do Estágio Obrigatório Supervisionado (ESO) em sua fase inicial, no Centro de Equinos de Pernambuco, constituiu uma experiência altamente enriquecedora. Durante o estágio, foi possível não apenas acompanhar a execução de exames essenciais para o diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Mormo, mas também compreender a importância desses testes para a saúde animal e para a saúde pública.

A realização dos testes diagnósticos para Mormo e AIE é de extrema relevância, especialmente devido ao risco zoonótico do Mormo. Esses exames são obrigatórios para o trânsito de animais, permitindo sua participação em eventos esportivos, exposições e cavalgadas. Destaca-se que, para a autorização do trânsito de animais, é necessária a apresentação da Guia de Trânsito Animal (GTA), que é emitida após a comprovação de que os animais estão negativados para essas doenças. Esse procedimento visa garantir a segurança no transporte e prevenir a disseminação dessas enfermidades.

## 2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO

### 2.1. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA BIXO'S

A segunda etapa do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizada no laboratório de patologia clínica da Clínica Veterinária Bixo's, localizado no bairro de Piedade, Município de Jaboatão dos Guararapes - PE, Avenida Ayrton Senna, nº 751, no período de 03 de dezembro de 2024 a 21 de janeiro de 2025 (Figura 18).

A escolha para o desenvolvimento do presente relatório na área de Patologia Clínica Veterinária teve como finalidade a realização de análises laboratoriais, com o propósito de auxiliar o clínico no diagnóstico de diversas enfermidades, assim como estabelecer o prognóstico do paciente. Essas análises são fundamentais para fornecer informações que contribuem para a tomada de decisões sobre o tratamento e a evolução clínica dos pacientes.



**Figura 18.** Fachada da Clínica Veterinária Bixo's: estrutura externa do estabelecimento.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

O laboratório funciona de segunda a sexta-feira e finais de semana, das 8:00 às 17:00 , enquanto a clínica permanece aberta 24 horas por dia. O local oferece serviços de

atendimento clínico e de emergência, além de contar com áreas de internamento e intensivismo. Também oferece atendimentos especializados em diversas áreas, como Dermatologia, Oftalmologia, Ortopedia, Oncologia, Neurologia, Nefrologia, Medicina Felina Especializada, Cirurgia Geral, e Diagnóstico por Imagem (Figura 19).



**Figura 19.** Entrada do laboratório da Clínica Veterinária Bixo's: acesso à área de realização de análises laboratoriais.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

O laboratório conta com uma estrutura completa e adequada para a realização de diversos exames. Dentre os equipamentos disponíveis, destacam-se o contador automático hematológico, banho-maria, centrífuga, microscópio e analisadores bioquímicos, tanto semiautomático quanto automático. Há também, máquina de eletrólitos, pipetas devidamente calibradas e um contador de células sanguíneas. Além disso, o laboratório dispõe de bancadas específicas para o processamento de amostras, duas pias, um refrigerador e um computador para a liberação dos laudos (Figura ).



**Figura 20.** Estrutura interna do laboratório da Clínica Veterinária Bixo's: organização e disposição de equipamentos para análises laboratoriais.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

## 2.2 RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS

O laboratório funciona de segunda a sexta-feira, além de finais de semana, das 8:00 às 17:00 sob a supervisão da Médica Veterinária especialista em patologia clínica, M.V. Mirna Juliana Mendonça de Lima. As amostras biológicas que são encaminhadas para análise, são coletadas pelos médicos veterinários responsáveis pela rotina da clínica e enviadas ao laboratório devidamente identificadas, acompanhadas de requisições preenchidas e assinadas.

Ao chegar ao laboratório, as amostras são registradas no caderno controle e avaliadas o quanto antes aos requisitos pré-analíticos, verificando-se há a presença de coágulos, fibrinas, hemólise, icterícia e lipemia, fatores que podem influenciar nos resultados das análises.

Também é verificado se as amostras estão acondicionadas nos tubos de coleta específicos para a análise solicitada. Após a primeira triagem e confirmação de que as amostras estão aptas para análise, são armazenadas na geladeira sob refrigeração para a posterior realização dos exames (Figura 21).



**Figura 21.** Acondicionamento de amostras biológicas: organização e armazenamento adequado para análise laboratorial.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

## **2.3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS**

### **2.3.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS**

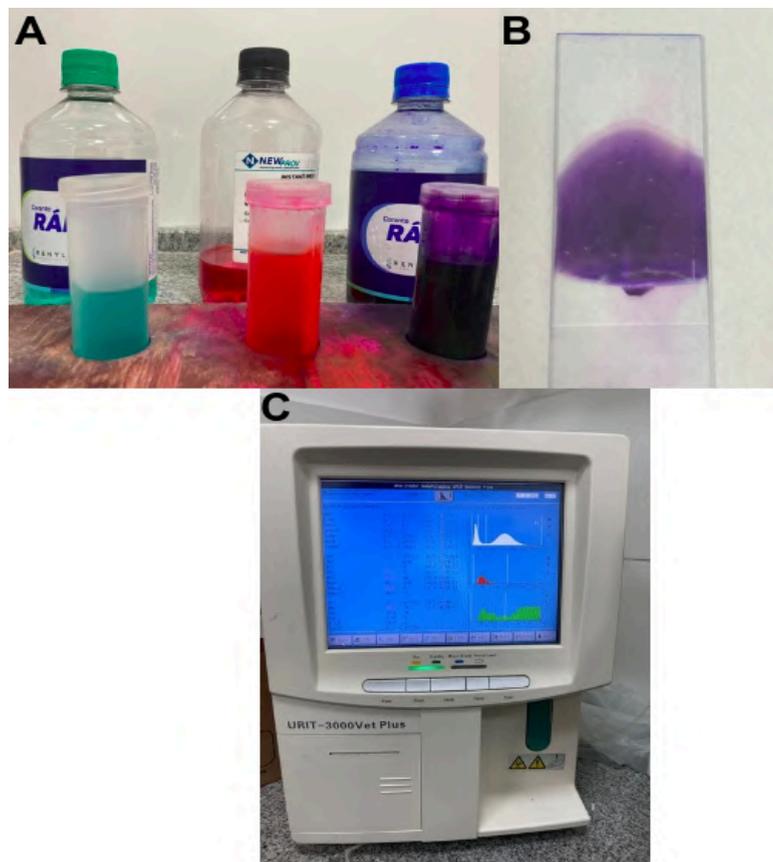
#### **2.3.2 HEMATOLOGIA**

Na área de hematologia, alguns exames são realizados rotineiramente, como hemograma simples, hemograma completo com pesquisa para hematozoários, hemograma com pesquisa de inclusões virais, contagem de plaquetas, coagulograma e contagem de reticulócitos. Dentre esses, o hemograma é o exame complementar mais solicitado pelos médicos veterinários em suas consultas, devido à sua grande relevância no auxílio do diagnóstico das enfermidades, bem como, no acompanhamento do tratamento e no prognóstico (Carmo *et al*, 2020).

O hemograma completo é uma ferramenta crucial, pois fornece informações sobre as

células sanguíneas circulantes no organismo e sobre o funcionamento da medula óssea, responsável por produzir essas células (Carmo *et al*, 2020). Para a realização do hemograma, a amostra é ser recebida pelo laboratório, acondicionada em tubo com anticoagulante EDTA, registrada no sistema e mantida sob refrigeração por no máximo 24 horas.

Posteriormente, a amostra é homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador automático e, em seguida, realizado o esfregaço sanguíneo e capilar para a mensuração do hematócrito e a dosagem da proteína plasmática total, utilizando o refratômetro. Os esfregaços sanguíneos são corados pelo método panótico, no qual possui os corantes 1, 2 e 3. A partir disso é possível realizar a análise morfológica das células, a contagem diferencial de leucócitos e a pesquisa de hematozoários. Contudo, a amostra também passa pelo contador automático hematológico, onde são analisadas toda a série vermelha, a série branca e a plaquetometria (Figura 22).



**Figura 22.** A) Corante Panótico Rápido para coloração diferencial de amostras biológicas; B) Lâmina corada utilizada para observação das estruturas celulares; C) Contador hematológico automático utilizado para análise de parâmetros sanguíneos.

Fonte: Arquivo pessoal,(2025).

O hemograma completo é composto por três seções principais. A primeira é o eritrograma que avalia toda a série vermelha, incluindo hemácias, hemoglobina e hematócrito. A partir desses parâmetros, é possível identificar condições como anemia, caracterizada pela diminuição dessas células, ou hemoconcentração, que envolve o aumento das células vermelhas. Além disso, o esfregaço sanguíneo corado pela técnica de Panótico e visualizado em microscopia óptica, permite a análise das alterações morfológicas das células vermelhas. A segunda parte do hemograma envolve a contagem de plaquetas, que possibilita verificar se o animal apresenta trombocitopenia (diminuição) ou trombocitose (aumento) na contagem plaquetária. A microscopia óptica também permite a avaliação da morfologia das plaquetas e a identificação de plaquetas ativadas. Por fim, a contagem diferencial dos leucócitos é realizada após a confecção e coloração das lâminas, sendo analisados todos os leucócitos presentes na circulação e suas possíveis alterações.

Na área de hematologia do laboratório também é realizada a contagem de reticulócitos, um componente essencial na análise hematológica do sangue periférico dos animais. Através dessa avaliação, é possível verificar a resposta da medula óssea na produção de hemácias, além de ajudar a identificar o tipo e a gravidade de diferentes formas de anemia, uma vez que a contagem de reticulócitos pode ser utilizada como indicativo de regeneração medular (Pereira *et al*, 2016).

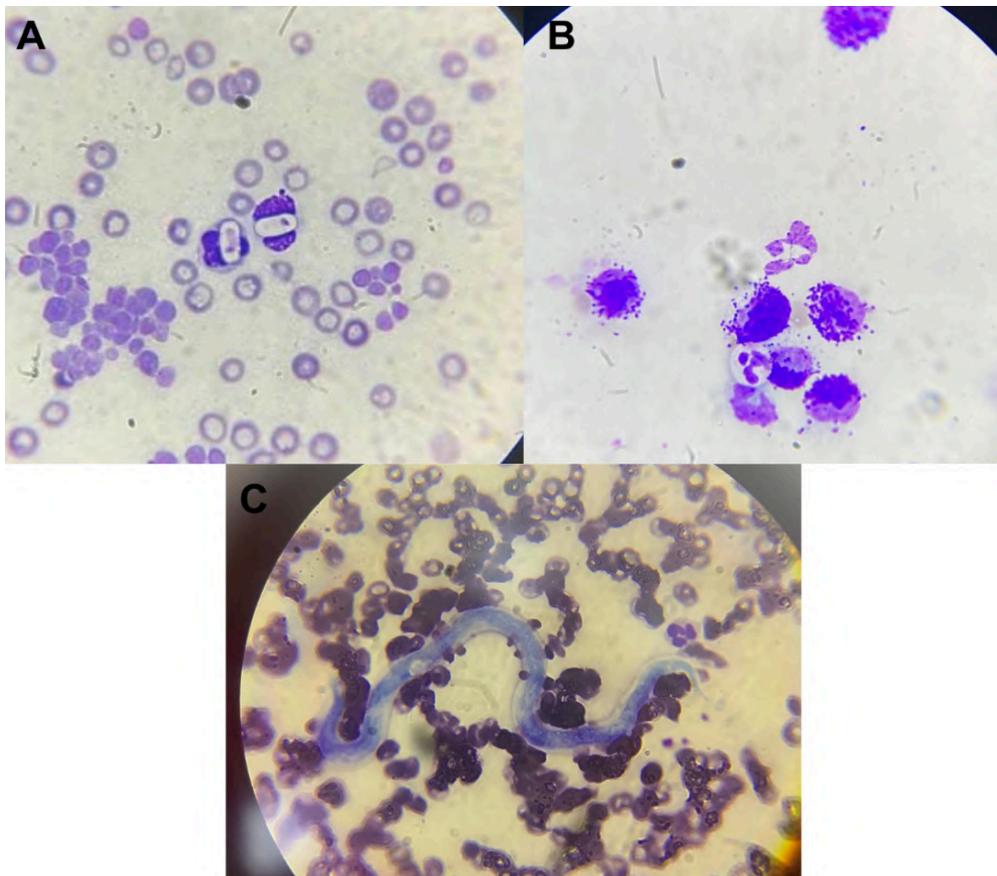
A metodologia empregada no laboratório para a avaliação dos reticulócitos é a contagem manual por meio de microscopia óptica. A amostra de sangue periférico é inicialmente homogeneizada e diluída em uma proporção de 1:1 com o corante azul de cresil brilhante (Figura 23), que pigmenta os vestígios de RNA presentes nos reticulócitos, possibilitando distingui-los dos eritrócitos maduros (Bodack, 2015). Após a diluição e homogeneização, a amostra é incubada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Em seguida, é realizado o esfregaço na lâmina de vidro, e as lâminas são novamente coradas utilizando-se o corante do tipo Panótico Rápido. Posteriormente, a lâmina é analisada em microscópio óptico, onde são contadas 1.000 células, classificando-as entre eritrócitos maduros e reticulócitos.



**Figura 23.** Corante Azul de Cresil Brilhante: utilizado para a coloração diferencial de reticulócitos em amostras sanguíneas

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

No decorrer do período de estágio supervisionado obrigatório (ESO), foram observados e registrados achados relevantes em esfregaços sanguíneos, os quais foram analisados por microscopia óptica (Figura 24).



**Figura 24.** Achados microscópicos em esfregaços sanguíneos caninos: A) Inclusões sugestivas de gametócitos de *Hepatozoon* sp.; B) Basófilo identificado em esfregaço sanguíneo; C) Microfilária visualizada em esfregaço sanguíneo.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

### 2.3.3 TESTES BIOQUÍMICOS

Os exames bioquímicos, após o hemograma, são os mais solicitados pelos clínicos na rotina laboratorial. Na veterinária, são exames essenciais para o diagnóstico, acompanhamento e prevenção de doenças em animais, permitindo avaliar o funcionamento de órgãos, como fígado, rins e pâncreas, além de identificar distúrbios metabólicos. Dentre as provas bioquímicas realizadas no laboratório, destaca-se o perfil renal e o perfil hepático, importantes para auxiliar no diagnóstico de determinadas doenças que acometem os animais.

Para a realização dos exames bioquímicos, as amostras são inicialmente recebidas e registradas no laboratório. As amostras utilizadas podem ser plasma ou soro, sendo o soro a amostra de eleição para o processamento. Após a coleta, é necessário esperar um período de aproximadamente 30 minutos para a formação do coágulo, em seguida, as amostras são centrifugadas por cerca de 10 minutos, com o objetivo de separar o soro do coágulo. Posteriormente a essa separação, o soro é transferido para tubos do tipo Eppendorf, sendo preparado para os testes bioquímicos.

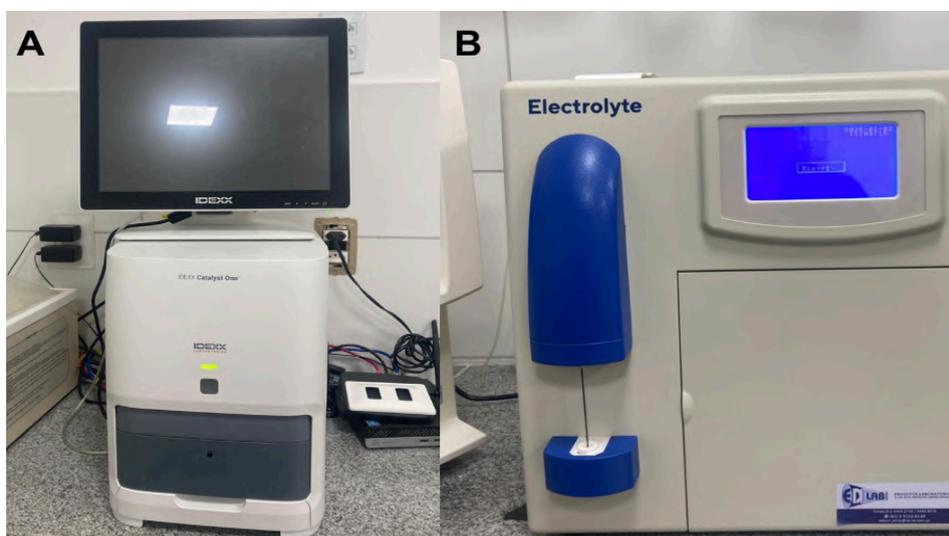
O laboratório utiliza o analisador bioquímico semiautomático Bio Plus, modelo Bio 2000 - Labtest® (Figura 25), que aplica a metodologia de análise espectrofotométrica para detectar reações específicas entre reagentes e o soro do animal. Esse equipamento permite a realização de exames bioquímicos, com precisão e eficiência, para avaliação de diversos parâmetros sanguíneos e metabólicos em animais. Contudo, para obtenção de resultados confiáveis e precisos é importante a realização de um controle de qualidade, que é realizado por meio de amostras controles em intervalos predeterminados.



**Figura 25.** Analisador bioquímico semiautomático Bio Plus Bio 2000®: equipamento utilizado para a determinação de parâmetros bioquímicos em amostras biológicas.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

O laboratório realiza uma variedade de análises bioquímicas utilizando diferentes equipamentos. No analisador bioquímico semiautomático Bio Plus, modelo Bio 2000, são realizados os seguintes exames: Ureia, Creatinina, TGP/ALT, TGO/AST, Fosfatase Alcalina, GGT, Proteína Total, Albumina, Glicose, Ácido Úrico, Amilase, Colesterol Total, Triglicerídeos, Cálcio e Fósforo. Além disso, o laboratório conta com o analisador bioquímico automático IDEXX Catalyst One®, utilizado para realizar os exames de Lipase, T4 Total, Proteína C Reativa, SDMA, Frutosamina e Amônia. O laboratório também dispõe de um analisador de eletrólitos, responsável pela análise de Potássio, Sódio e Cloro. (Figura 26 ).



**Figura 26.** A) Analisador bioquímico automático IDEXX Catalyst One®. B) Analisador de Eletrólitos Electrolyte.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

### **2.3.4 COPROPARASITOLÓGICO DE FEZES**

O exame coproparasitológico consiste na análise das fezes, tanto de forma macroscópica quanto microscópica, com o objetivo de identificar a presença de parasitas gastrointestinais, além de auxiliar na detecção de infecções intestinais em cães e gatos, sendo essencial para a determinação de tratamentos adequados e para o controle de zoonoses (Funada *et al.*, 2007).

As amostras coletadas pelo tutor são, inicialmente, recepcionadas e registradas no laboratório. Porém, para que seja garantida a qualidade dos resultados, as amostras devem ser enviadas imediatamente para análise e recomenda-se que as mesmas sejam mantidas sob refrigeração até a realização dos exames. No caso de um coproparasitológico simples, é registrada apenas uma amostra, enquanto para um coproparasitológico completo, são registradas três amostras, as quais devem ser coletadas em dias alternados.

Para a realização de um exame coproparasitológico, diversos métodos de preparação de amostras podem ser utilizados. No laboratório no qual o estágio supervisionado obrigatório (ESO) foi realizado, emprega-se a técnica de flutuação de Willis-Mollay, que é eficaz na detecção de ovos de parasitas com densidade inferior à de uma solução saturada de açúcar (Taylor *et al.*, 2010). Essa técnica consiste em misturar uma pequena quantidade de fezes com uma solução de água destilada e açúcar, deixando-a descansar. Após esse processo, a parte flutuante é coletada, colocada sob uma lâmina e lamínula e examinada (Figura 27). Esse procedimento de flutuação aumenta a sensibilidade do exame, permitindo a concentração dos ovos da lâmina e facilitando sua identificação (Taylor *et al.*, 2010).



**Figura 27.** Oocistos de *Cystoisospora* sp. observados em exame coproparasitológico de amostra fecal de canino.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

### 2.3.5 URINÁLISE

A urinálise é um exame complementar solicitado é um exame complementar solicitado pelo clínico veterinário ou por um especialista em nefrologia. Esse exame fornece informações importantes sobre o trato urinário tanto inferior quanto superior. Para a sua realização, as amostras são previamente coletadas por meio de cistocentese, sondagem ou micção espontânea, utilizando seringas ou frascos esterilizados e devem ser protegidas da luz (Medeiros, 1993). Posteriormente, as amostras são enviadas ao laboratório, para seguir com o processamento.

A urina é altamente sensível à temperatura ambiente e deve ser analisada no máximo 2 horas após a coleta, caso esteja mantida fora de refrigeração. Caso não seja analisada dentro desse intervalo de tempo, a amostra deve ser acondicionada a 4°C no máximo por 12 horas (Meyer & Harvey 1998). Contudo, é importante ressaltar que, antes de analisar uma amostra refrigerada, ela deve retornar à temperatura ambiente, pois a refrigeração pode promover a cristalização de certas substâncias presentes na urina (Sturgess *et al.*, 2001).

A análise da urina é dividida em três etapas: exame físico, exame químico e exame do sedimento. Primeiramente, realiza-se o exame físico da urina, que consiste na avaliação do volume, cor, aspecto, odor e densidade urinária. Em seguida, é realizado o exame químico,

utilizando uma fita reagente que permite a análise semi quantitativa da presença de leucócitos, sangue, nitrito, urobilinogênio, cetonas, bilirrubina e glicose na amostra e a última etapa consiste na centrifugação da urina a 2.000 RPM por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado e o restante é homogeneizado. Em seguida, realiza-se a análise do sedimento por meio de microscopia óptica, utilizando uma câmara de Neubauer. Nesta fase, é possível avaliar e quantificar a presença de hemácias, leucócitos, células epiteliais da uretra, vesícula urinária, ureteres e trato urinário superior, cristais, cilindros, bactérias e leveduras (Araújo, 2011).

### 2.3.6 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS

Os testes imunocromatográficos, também conhecidos como testes rápidos, desempenham um papel crucial na rotina de médicos veterinários, uma vez que permitem a detecção de enfermidades de maneira rápida, segura e eficaz. A escolha do teste imunocromatográfico depende da suspeita clínica, considerando o agente patológico suspeito e a fase da doença, uma vez que foram desenvolvidos para identificar antígenos ou anticorpos. Entre os principais testes realizados, estão o SNAP 4DX, FIV/FeLV, Giardia, Parvovirose, Coronavirose canina, Lipase pancreática em canino e felino, Cinomose e Dirofilariose.

Ao longo do período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), foram realizados testes imunocromatográficos, nos quais foram observados achados relevantes, apresentados a seguir (Figura 28).



**Figura 28.** Testes imunocromatográficos: A) Teste IDEXX SNAP 4DX para detecção de *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp., *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi*, apresentando resultado positivo para *Anaplasma* sp.; B) Teste IDEXX SNAP 4DX com resultado positivo para *Ehrlichia* sp.; C) Teste Alere para diagnóstico de *Giardia*, mostrando resultado positivo.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

### 2.3.7 CITOLOGIAS

As citologias de pele e otológicas nos animais são essenciais para o diagnóstico de infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias. Através desse exame, é possível identificar por meio da visualização em microscópio óptico células inflamatórias e agentes, como bactérias e leveduras, auxiliando o médico veterinário no diagnóstico, tratamento e prognóstico de doenças dermatológicas de forma precisa, minimamente invasiva e com baixo custo (Bayou,2017).

## 2.4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS

### 2.4.1 CASUÍSTICA LABORATORIAL

Entre 03 de dezembro de 2024 e 21 de janeiro de 2025, foram realizados exames laboratoriais conforme a rotina estabelecida no laboratório. Dentre os procedimentos realizados, os mais solicitados na prática clínica foram o hemograma e as análises bioquímicas, com destaque para os perfis hepático e renal. A seguir, serão apresentadas as frequências das principais análises laboratoriais realizadas durante todo o período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO).

No âmbito das análises hematológicas realizadas durante o estágio, destaca-se a predominância dos hemogramas. Entre eles, o hemograma com pesquisa de hemoparasitas e inclusões virais foi mais frequente em comparação ao hemograma simples.

**Tabela 2.** Frequência de solicitação das principais análises histológicas realizadas na rotina clínica da clínica veterinária Bixo 's.

ANÁLISE SOLICITADA	FREQUÊNCIA ABSOLUTA
HEMOGRAMA SIMPLES	41
HEMOGRAMA COM PESQUISA	137
TOTAL	178

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Em relação aos testes bioquímicos realizados na rotina laboratorial, observa-se que os exames voltados para a avaliação da função renal e hepática foram os mais frequentes em comparação com as demais análises.

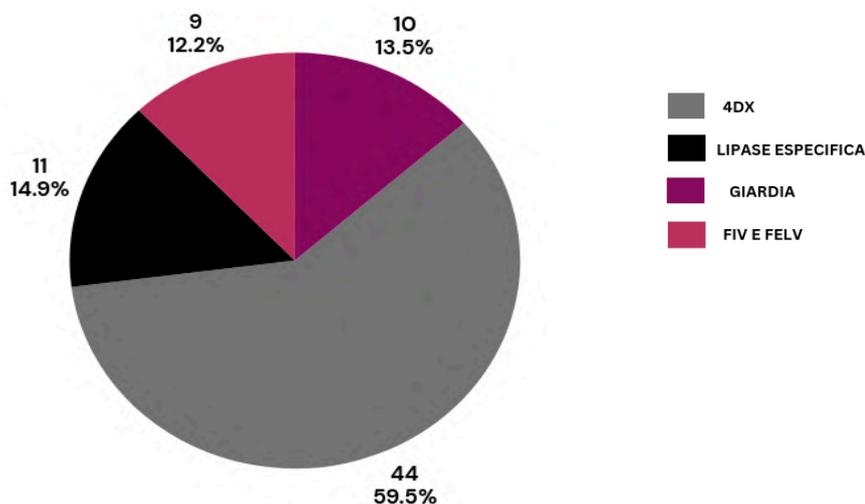
**Tabela 3.** Frequência de solicitação dos principais testes bioquímicos realizados na rotina clínica da Clínica Veterinária Bixo's.

REAGENTE	FREQUÊNCIA ABSOLUTA
UREIA	137
CREATININA	142
TGP	108
TGO	57
FA	96
GGT	95
GLICOSE	58
PROTEÍNA	20
ALBUMINA	46
GLOBULINA	20
TRIGLICERÍDEOS	11
COLESTEROL	16
AMILASE	16
LIPASE	17
POTÁSSIO	51
CORO	30
SÓDIO	37
FÓSFORO	35

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Por fim, os testes imunocromatográficos realizados durante o período foram representados em um gráfico percentual. Dentre esses testes, destacou-se a predominância do teste 4Dx, amplamente utilizado na triagem de doenças transmitidas por ectoparasitas em cães.

**Gráfico 2 .** Distribuição percentual dos testes imunocromatográficos.



#### **2.4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A realização da segunda parte do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) no Laboratório de Patologia Clínica da Clínica Veterinária Bixo's foi extremamente enriquecedora. Durante esse período, além de acompanhar a realização de exames essenciais para o diagnóstico, monitoramento e tratamento de enfermidades, tive a oportunidade de manter contato direto com os médicos veterinários responsáveis, que estiveram presentes ao longo de todo o estágio, orientando e explicando os procedimentos realizados nos pacientes. Esse acompanhamento foi fundamental para o meu aprendizado. Essa experiência se mostrou crucial na fase final da graduação, promovendo meu crescimento profissional, proporcionando vivências práticas, inserindo-me na rotina profissional e preparando-me para o mercado de trabalho.

### 3. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P. **Urinálise como instrumento auxiliar no diagnóstico de enfermidades em pequenos ruminantes.** 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Mapa nº 593, de 30 de junho de 2023.**

BODACK, C. D. N. **Análises das Diferentes Metodologias de Contagem de Reticulócitos e seu Impacto na Interpretação Laboratorial dos Resultados.**2015.

BAYOU, Kibruyesfa. **Cytodiagnosis of common skin lesions in dog and cat: a review.** *Global Veterinaria*, Nekemte, v. 19, n. 3, p. 539-548, 2017.

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C.. **Anemia infecciosa equina.** *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 2, p. 197-207, 2011.

CARMO, B. M. B. et al. **Hemograma completo: ferramenta de diagnóstico na medicina veterinária.** *Brazilian Journal of Development*, DOI: 10.34117/bjdv6n7-594, 2020.

FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. **Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 2, p. 63-68, 2007.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Sanidade de equídeos. Brasília, DF, 2023.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Instrução Normativa nº 45, de 15 de junho de 2004. Brasília, DF, 2004.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Instrução Normativa nº 6, de 16 de janeiro de 2018. Brasília, DF, 2018.

MEDEIROS, A. S. **Semiologia Urológica,** Rio de Janeiro: Medsi. 1993.

MEYER, D. J.; HARVEY J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis. 2 ed.**Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998.

PEREIRA, M. A. et al. **Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos.** Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 68, n. 5, p. 1151-1157, 2016.

SILVIA; A. R.S. **Diagnóstico da Anemia Infeciosa Eqüina: análise comparativa de sistemas comerciais de diagnóstico por imunodifusão.** 2007.

STURGESS, C. P. *et al.* **An investigation into the effects of storage on the diagnosis of crystalluria in cats.** Journal of Feline Medicine & Surgery, v. 3, p. 81-85, 2001.

TELES, J. A. A. **Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos.** 2012.

TAYLOR, M.A.; Coop, R.L. & Wall, R.L. **Parasitologia Veterinária. Tradução da 3ª edição (2007).** Editora Guanabara Koogan. 2010.

## **CAPÍTULO II**

### **ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS OBTIDOS E SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO.**

## RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um hemoderivado caracterizado por elevadas concentrações de plaquetas, obtido mediante um processo de centrifugação do sangue total. Esse procedimento visa alcançar uma concentração plaquetária hiperfisiológica com uma grande concentração de fatores de crescimento. Este hemoderivado potencializa a reparação e regeneração tecidual, sendo aplicado principalmente em patologias como tendinite, desmíte, osteoartrite, cicatrização de feridas e endometrite em éguas. Esta última é uma das principais enfermidades que afetam o sistema reprodutivo dos equinos, sendo uma das principais causas de subfertilidade e infertilidade. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi realizar a avaliação morfológica das plaquetas em diferentes momentos de criopreservação, visando avaliar a preservação da viabilidade plaquetária. Para tanto, foram selecionados seis equinos hípidos com contagem de plaquetas superior a 100.000 plaquetas  $\mu\text{L}^{-1}$ . O protocolo adotado para a obtenção do PRP consistiu em uma primeira centrifugação a 100G/15 min, seguida de uma segunda centrifugação a 1.600G/20min. As análises morfológicas das amostras foram conduzidas em etapas distintas: fresco (imediatamente após a coleta), refrigerado (6 horas após a coleta – REF6), congelado (com – C20S e sem crioprotetor – C20D) e liofilizado. A avaliação morfológica foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos ou esfregaços de PRP corados pela técnica de Romanowski (Panótico, Laborclin, Brasil) e posteriormente observados em microscopia óptica com objetiva de 100x. Os resultados obtidos sugerem que o PRP refrigerado pode ser utilizado com eficiência por até 6 horas, assim como as amostras congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , independentemente do uso de crioprotetor. Em contrapartida, no processo de liofilização, apenas 12,67% das plaquetas mantiveram-se em estado normal, indicando uma perda de qualidade considerável. Isso ressalta a importância de monitorar cuidadosamente os métodos de armazenamento para preservar a viabilidade e a funcionalidade das plaquetas, garantindo a qualidade do PRP para aplicações clínicas.

**Palavras-chave:** Plasma rico em plaquetas; Viabilidade; Armazenamento; Morfologia plaquetária.

## ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP) is a blood derivative characterized by high platelet concentrations, obtained through a whole blood centrifugation process. This procedure aims to achieve a hyperphysiological platelet concentration with a high concentration of growth factors. This blood derivative enhances tissue repair and regeneration, and is mainly applied in pathologies such as tendonitis, desmitis, osteoarthritis, wound healing and endometritis in mares. The latter is one of the main diseases that affect the reproductive system of horses, being one of the main causes of subfertility and infertility. In this context, the objective of this study was to perform the morphological evaluation of platelets at different times of cryopreservation, aiming to evaluate the preservation of platelet viability. For this purpose, six healthy horses with platelet counts greater than 100,000 platelets  $\mu\text{L}^{-1}$  were selected. The protocol adopted to obtain PRP consisted of a first centrifugation at 100G/15 min, followed by a second centrifugation at 1,600G/20min. Morphological analyses of the samples were conducted in different stages: fresh (immediately after collection), refrigerated (6 hours after collection – REF6), frozen (with – C20S and without cryoprotectant – C20D) and lyophilized. Morphological evaluation was performed using blood smears or PRP smears stained using the Romanowski technique (Panótico, Laborclin, Brazil) and subsequently observed under optical microscopy with a 100x objective. The results obtained suggest that refrigerated PRP can be used efficiently for up to 6 hours, as can samples frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ , regardless of the use of cryoprotectant. In contrast, in the lyophilization process, only 12.67% of the platelets remained in a normal state, indicating a considerable loss of quality. This highlights the importance of carefully monitoring storage methods to preserve platelet viability and functionality, ensuring the quality of PRP for clinical applications.

**Keywords:** Platelet-rich plasma; Viability; Storage; Platelet morphology.

## 1. INTRODUÇÃO

Considerando o atual contexto da equideocultura, é notável a sua relevância em escala global, especialmente em virtude do setor agropecuário no Brasil, que é responsável pela geração de cerca de 600 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos (NRC, 2007).

Há cerca de 5.000 anos, iniciou-se uma interação entre os equinos e a civilização, inicialmente direcionada para o consumo de sua carne. Entretanto, logo se observou que esses animais apresentavam características como comportamento ativo e força motriz, o que os tornava versáteis para diversas atividades, incluindo práticas esportivas, locomoção, tração e até mesmo para abate (Naviaux, 1988). Devido à exposição a esforços intensos, como tração e exercícios vigorosos, os equinos estão mais suscetíveis a lesões traumáticas. Nesse sentido, o uso de novas terapias biológicas tem ganhado popularidade, impulsionando a descoberta, pesquisa e avanço de novas técnicas terapêuticas, como a do plasma rico em plaquetas (PRP). Esta alternativa terapêutica, pouco invasiva e com bom custo-benefício, promove uma aceleração no processo de recuperação do tecido ou órgão afetado.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um hemoderivado que possui altas concentrações de plaquetas no qual é obtido por meio de um processo de centrifugação do sangue total, com objetivo de se obter uma dose plaquetária hiper fisiológica e com uma grande concentração de fatores de crescimento (Fitzpatrick *et al.*, 2017) e reduzido volume de plasma como produto final (Vendramin *et al.*, 2006). O PRP é utilizado terapeuticamente devido a sua fácil obtenção, e boa relação custo e benefício, além de boa eficácia para se alcançar elevadas concentrações de fatores de crescimento, resultando na melhoria na recuperação e regeneração de tecidos (Nikolidakis & Janses 2008), sendo predominantemente utilizado em situações patológicas como tendinopatia (Maia *et al.* 2009), desmodrose, osteoartrite (Carmona *et al.*, 2009) e processo de cicatrização (De Rossi *et al.* 2009).

O PRP, quando sujeito a estímulos, desencadeia a ativação das plaquetas. Uma vez ativadas, as plaquetas degranulam e liberam diversos fatores de crescimento no local da lesão, promovendo efeitos farmacológicos quimiotáticos, neovasculares e mitogênicos o que, por sua vez, favorece uma melhor regeneração tecidual, incluindo regeneração óssea, ligamentar, tendínea, muscular e epitelial (Parisi *et al.*, 2017), estimulando a angiogênese e a reparação tecidual e culminando na redução da resposta inflamatória local e na promoção de uma regeneração mais eficaz (Miranda, 2018; Cavallo *et al.*, 2016).

As plaquetas expressam uma diversidade de fatores de crescimento, os quais são peptídeos sinalizadores encarregados de regular o metabolismo celular. Esta regulação ocorre através das vias de sinalização intracelular ao interagir com um complexo organizado de receptores de superfície celular. Tal interação resulta no aumento da transcrição dos fatores e na produção de proteínas que iniciam a proliferação e diferenciação celular, além de aumentar a produção da matriz extracelular (Dahlgren *et al.* 2001) e estimular a angiogênese, facilitando o processo de reparação tecidual (Bosch *et al.* 2010). No contexto da reparação tecidual e na cicatrização de feridas, as plaquetas desempenham um papel crucial, graças à sua função hemostática e a presença de citocinas e fatores de crescimento (Chicharro - Alcántara D, *et al.*, 2018). No entanto, as plaquetas possuem microtúbulos, microfilamentos de actina e miosina, glicogênio, lisossomo, grânulos alfa ( $\alpha$ -grânulos) e grânulos densos, localizados no citoplasma. Assim,  $\alpha$ -grânulos possuem fatores de coagulação e de crescimento e outras proteínas (Zucker-franklin *et al.*, 1988), dessa forma, as plaquetas são capazes de excretar diversos fatores de crescimento (Lins *et al.*, 2010), dentre eles fator transformador do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator plaquetário 4 (PF-4), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), angiopoietinas, fator derivado de células estromais (SCGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Dusse *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2015). O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) desempenha um papel crucial e essencial na proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação celular e angiogênese (Schmidt mb, *et al.*, 2006). Desta forma, o aumento da proliferação celular facilita uma melhor cicatrização dos tecidos através do PRP. Além disso, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) contribui para a fase inflamatória e proliferativa dos ferimentos, promovendo a proliferação dos fibroblastos no local da lesão, otimizando a síntese de colágeno (Molly, *et al* 2003). O fator transformador do crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) controla a mitogênese das células epiteliais, fibroblásticas e osteoplásticas, além de regular a síntese de colágeno (Maia *et al.*, 2009).

A observação da ativação plaquetária permite detectar alterações que podem comprometer a viabilidade das plaquetas durante o armazenamento. No entanto, durante os processos de coleta, produção e armazenamento desse hemoderivado, as plaquetas são submetidas a diversos estímulos mecânicos e químicos que podem desencadear sua ativação. Além disso, ao longo do período de armazenamento, um número crescente de plaquetas atinge o fim de sua vida útil, que é de 7 a 10 dias na circulação sanguínea. Após esse período,

as plaquetas envelhecidas são removidas da circulação principalmente pelo baço, onde são fagocitadas por macrófagos. Contribui para esse processo a progressiva produção de metabólitos durante o armazenamento, criando um ambiente desfavorável para a viabilidade plaquetária. (Nurden *et al.*, 2008)

Dessa forma, a ativação das plaquetas é caracterizada pela alteração na morfologia, observada visualmente por microscopia óptica em resposta a um estresse hipotônico. Esse processo pode ocorrer em questão de segundos e é acompanhado pela liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários (Klinger, 1997). Em condições normais, as plaquetas permanecem inativas (Everts *et al.*, 2006) e possuem diversos receptores que desempenham papel crucial em sua agregação (Boudreaux, 2010). Quando ativadas, as plaquetas alteram sua forma de elíptica para arredondada e emitem pseudópodes (Pietrzak; Eppley, 2005). Além disso, as plaquetas ativadas liberam uma variedade de substâncias bioativas, como mediadores químicos, fatores de crescimento e citocinas, que desempenham papéis importantes na reparação tecidual, na inflamação e em outros processos fisiológicos.

Atualmente, o PRP vem sendo utilizado imediatamente após sua preparação devido à vida útil muito limitada das plaquetas (Nurden *et al.*, 2008). Por esse motivo, ao longo dos anos, vários métodos de armazenamento têm sido estudados para prolongar a sobrevivência das plaquetas. A refrigeração, criopreservação e liofilização das plaquetas são algumas técnicas que têm sido estudadas com o objetivo de prolongar o tempo de armazenamento, preservar a viabilidade e funcionalidade do PRP após períodos prolongados de armazenamento. (Kwirant, l.a.a.,2013)

No entanto, é importante destacar que esses processos podem acarretar em implicações para a viabilidade plaquetária devido às mudanças bruscas na temperatura, podendo interferir na permeabilidade da membrana plasmática, resultando em uma apoptose celular (Massumoto *et al.*, 1997; Silva, 2006). Estudos indicam que a perda de viabilidade e função plaquetária ocorre principalmente durante períodos prolongados de resfriamento (Connor *et al.*, 1996) ou congelamento (Handin e Valeri, 1972). Assim, plaquetas armazenadas nessas condições apresentam diminuição na capacidade de agregação em resposta ao estresse hipotônico, bem como na retração do coágulo e em sua sobrevivência (Handin e Valeri, 1972; Connor *et al.*, 1996). Em decorrência dessas alterações, as plaquetas mudam sua morfologia de forma discoidal para esférica e emitindo pseudópodes (Reid *et al.*, 1999).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

- Avaliar o efeito da criopreservação (resfriamento e congelamento) e liofilização na ativação plaquetária com o objetivo de preservar a viabilidade das plaquetas para se obter um PRP de qualidade e com longevidade.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Determinar a diferença de plaquetas ativadas antes e após a criopreservação e liofilização, considerando todos os fatores pré-analíticos, analíticos e pós analíticos.
- Avaliar as alterações morfológicas e integridade nas plaquetas do PRP em estudo após a coleta, durante o processamento e após estocagem da amostra analisada.
- Avaliar a morfologia plaquetária através da emissão de pseudópodes durante o processo de ativação plaquetária antes e após a criopreservação.
- Avaliar a detecção da ativação plaquetária durante o preparo e estocagem e após a criopreservação e liofilização do PRP.
- Determinar o fator que promoveu maior modulação da ativação plaquetária.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 SELEÇÃO DE ANIMAIS

O estudo foi realizado no Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob aprovação do Comitê de ética e Uso Animal, CEUA nº 1747200622.

Foram utilizados seis equinos hípidos, sendo três fêmeas e três machos, com idade entre 3 e 21 anos, pesando em média 500kg. Os parâmetros sanguíneos e clínicos desses animais foram previamente examinados. Foram selecionados para o estudo os animais cuja contagem de plaquetas no sangue total foi superior a 100.000 plaquetas por microlitro. Os cavalos foram alojados individualmente em estábulos sendo alimentados com feno de capim Tifton, 3kg de ração comercial, além de água e sal mineral ad libitum. As análises laboratoriais foram conduzidas em colaboração em um Laboratório de Patologia Clínica privado, utilizando um contador hematológico automático e métodos manuais para avaliação hematológica.

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos utilizados na avaliação e seleção dos animais.

<b>Animais</b>	<b>Hemoglobina (8,0 -15,0 g/dL)</b>	<b>Hematócrito (32-53%)</b>	<b>Proteína Total (5,8-8,7 g/ dL)</b>	<b>Leucócitos Totais (5.400 - 14.500)</b>	<b>Plaquetas (100-350x10<sup>3</sup>/µL)</b>
<b>Equino 1</b>	12,1	35	7,0	7.000	130
<b>Equino 2</b>	12,5	35	7,0	6.650	247
<b>Equino 3</b>	9,6	32	6,5	5.850	205
<b>Equino 4</b>	11,1	35	7,5	9.000	217
<b>Equino 5</b>	12	34	6,5	10.350	275
<b>Equino 6</b>	9,1	32	6,5	7.000	180

Fonte: Schalm's Veterinary Hematology (2000)

#### 3.2 COLETA DE SANGUE

O sangue foi coletado por venopunção da jugular externa, após a área ter sido previamente preparada com tricotomia e antissepsia. Utilizaram-se agulhas a vácuo 21G e tubos contendo anticoagulante de citrato de sódio a 3,2%. Para as análises, cada animal foi submetido à coleta de sangue em 17 tubos, sendo um reservado para os exames laboratoriais.

Aproximadamente 60 ml de sangue total foram obtidos de cada animal e reunidos em tubos falcon de 15 ml para posterior centrifugação, para obtenção de uma maior concentração de plasma rico em plaquetas (PRP).



**Figura 29.** Coleta de amostra de sangue por venopunção da veia jugular externa em equino: A) Preparação antisséptica do local; B) Realização da tricotomia na área de punção; C) Coleta do sangue na veia jugular externa.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

### 3.3 PROCESSAMENTO E PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras obtidas de cada animal foram submetidas ao procedimento de obtenção de PRP conforme descrito no protocolo de Muthu *et al.* (2022). Protocolo: 1ª Centrifugação 100G/15 min e 2ª Centrifugação 1.600G/20min. O PRP é obtido através de um processo de centrifugação, no qual a aceleração da velocidade é ajustada para sedimentar componentes específicos, levando em conta as diferentes densidades dos constituintes do sangue total (leucócitos, hemácias e plaquetas) (Dhurat; Sukesh, 2014).

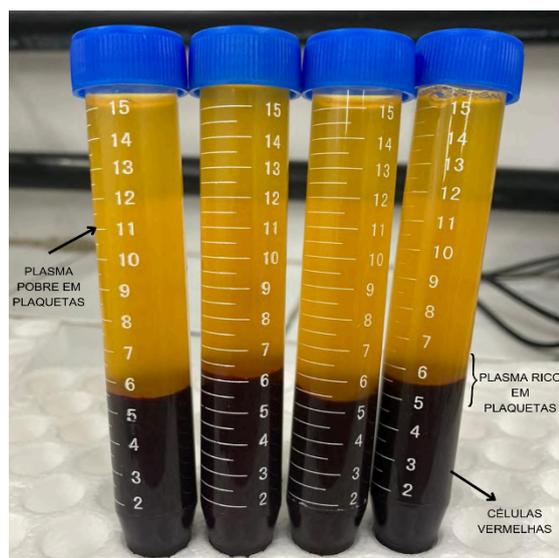
O processamento das amostras é baseado em duas centrifugações, onde os tubos

Falcons ( 15 ml) com sangue total foram centrifugados pela primeira vez (Figura 31) com intuito de separar o sangue em três fases heterogêneas. Respectivamente após cada centrifugação é respeitado um período de descanso de 25 minutos, onde segundo Seidel (2019) quando esse descanso é incluído entre as centrifugações observa-se uma menor ativação plaquetária ao final do processo. Após a conclusão da primeira centrifugação, o tubo foi deixado em repouso por 25 minutos, e aproximadamente 5 ml do plasma pobre em plaquetas (PPP) foram removidos. O restante do volume no tubo foi então submetido a uma segunda centrifugação, visando concentrar o maior número possível de plaquetas na porção intermediária, entre o PPP e as células sanguíneas. Após a segunda centrifugação, houve um intervalo de repouso de 25 minutos, após o qual aproximadamente 1/3 do volume total do tubo foi descartado. Em seguida, 1 ml foi aspirado acima da camada leucocitária e 2- 6mm abaixo da mesma. Por fim, as amostras de PRP foram colocadas em tubos Eppendorf para serem avaliadas morfológicamente em fresco. Posteriormente, foram submetidas a diferentes condições de armazenamento, incluindo refrigeração após 6 horas de coleta, congelamento a -80 °C com 3% de DMSO, congelamento a -80 °C sem DMSO, congelamento a -25 °C com 3% de DMSO, congelamento a -25 °C sem DMSO e liofilização, com o propósito de avaliação morfológica subsequente.



**Figura 30.** Centrifugação de amostras biológicas realizada em centrífuga Megafuge 16 (Datamed): etapa essencial para a separação de componentes sanguíneos para obtenção do PRP.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).



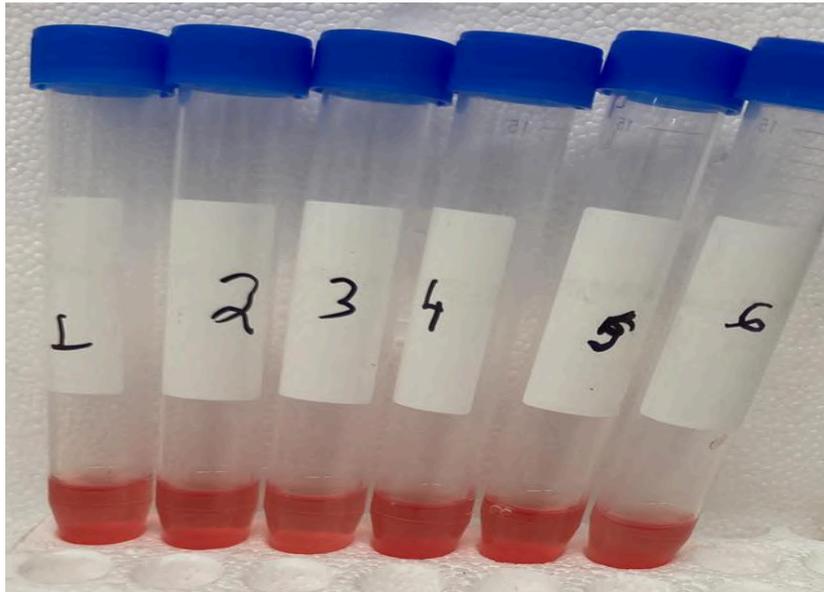
**Figura 31.** Resultado das amostras biológicas após a primeira centrifugação, com separação das camadas: plasma pobre em plaquetas, plasma rico em plaquetas e células vermelhas.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

### 3.4 CONTAGEM MANUAL DE PLAQUETAS

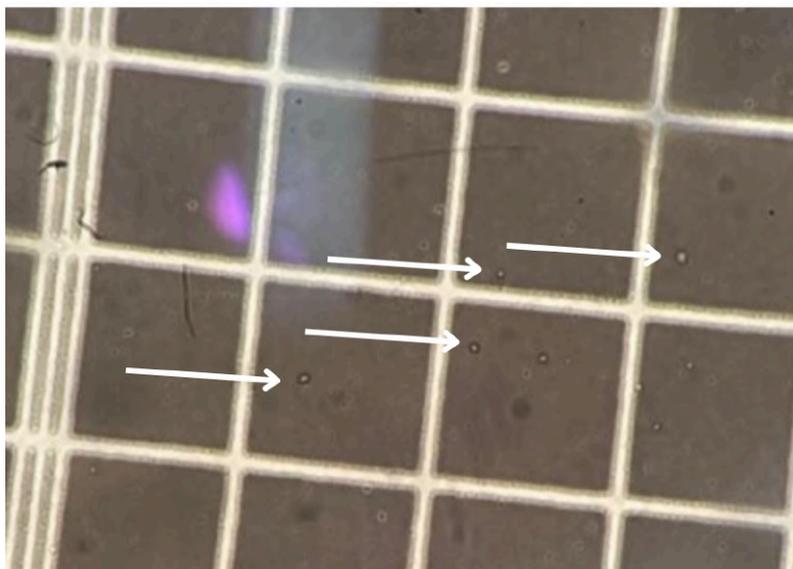
Apesar de atualmente serem utilizados contadores automatizados para realização da contagem de plaquetas, tal metodologia apresenta desvantagens devido ao fato de um potencial risco para a contagem erroneamente baixas ou altas de plaquetas, devido a possibilidade de não ser possível observar alterações que possam causar interferências nos resultados, tais como, agregados plaquetários, macroplaquetas e plaquetas gigantes que podem levar a resultados falsamente diminuídos na contagem automatizada das plaquetas. (Van Der Meer *et al*, 2003; Moreno & Menke, 2002)

Portanto, a contagem das plaquetas foi realizada pelo método manual de Brecher, por meio de câmara hematómica de Neubauer utilizando o líquido de Brecher (Oxalato de amônio a 1%) como diluente (Thrall 2007). Esse método de brecher baseia-se na contagem de plaquetas no qual adiciona-se em um tubo de ensaio 2 ml de oxalato de amônio a 1% e 20 microlitros de amostra em análise (Figura 32). Após a homogeneização da solução, preenche-se a câmara de Neubauer e incuba-se em câmara úmida por 10 minutos, e a contagem é realizada após esse período em microscópio óptico, na objetiva de 40x (Figura 33).



**Figura 32.** Microdiluição realizada pelo método de Brecher: técnica aplicada para quantificação de plaquetas.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).



**Figura 33.** Observação de plaquetas na câmara de Neubauer pelo método de Brecher, com ampliação de 40x: técnica utilizada para a contagem manual de plaquetas em amostras biológicas.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

#### **4.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS PLAQUETAS**

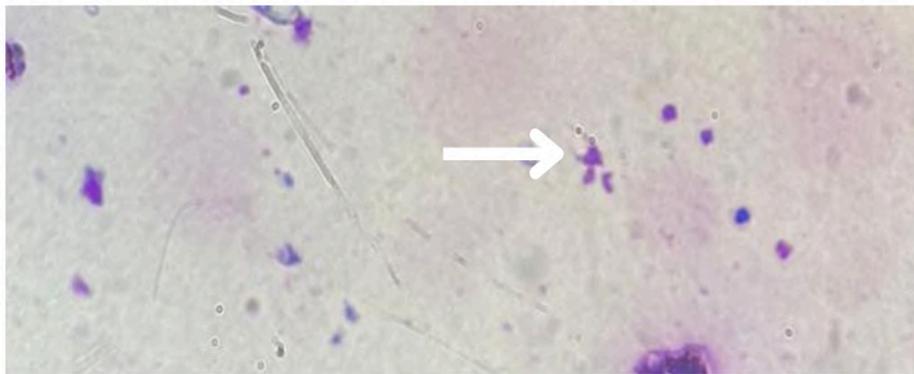
A análise morfológica das amostras foram realizadas em etapas, que são elas, a fresco, refrigerados, criopreservados e liofilizados, a avaliação foi realizada por meio de um esfregaço sanguíneo ou esfregaço de PRP coradas pela técnica de Romanowski (Panótico,

Laborclin, Brasil) e observadas por meio de microscopia óptica na objetiva de 100x para posterior avaliação morfológica ( Figura 34 ).

As alterações morfológicas das plaquetas foram classificadas em três estados morfológicos, segundo adaptado da classificação Wurzinger e Schmid Schönbein (1990), em:

- Estado normal: Ligeiramente oval, alongadas;
- Estado incerto: estado de ativação brando ou incerto (plaquetas arredondadas) sem emissão de pseudópodes;
- Ativada: forma oval irregular e emissão de pseudópodes.

A avaliação morfológica das plaquetas foi realizada em porcentagem, por meio da contagem total de 100 células de cada amostra de cada animal, sob microscopia óptica.



**Figura 34.** Observação de plaqueta ativada com emissão de pseudópodes: registro microscópico evidenciando a morfologia característica durante o processo de ativação plaquetária.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

#### **4.6 CRIOPRESERVAÇÃO E CONGELAMENTO DAS AMOSTRAS**

A criopreservação das amostras tem como objetivo promover o armazenamento do plasma rico em plaquetas (PRP) dentro de um período prolongado.

De acordo com Shrivastava (2009), a qualidade das plaquetas é comprometida pelo armazenamento devido a alterações prejudiciais na estrutura e função das mesmas, conhecidas como "lesões plaquetárias de armazenamento", as quais limitam a vida útil das plaquetas. Por esse motivo, várias pesquisas vêm sendo realizadas objetivando um método eficaz de armazenar plaquetas, principalmente através da criopreservação. Com isso, a pesquisa em questão teve como objetivo avaliar a viabilidade das plaquetas em diferentes formas de criopreservação. A análise morfológica das plaquetas foi realizada com intuito de

avaliar percentualmente a viabilidade das plaquetas, o estudo também realizou a análise da concentração plaquetária, na qual foi realizada manualmente, por meio do método de Brecher, em câmara de Neubauer, onde as plaquetas são analisadas de forma individual. Além disso, foi possível a observação de formação de agregados plaquetários através da análise morfológica em esfregaço de PRP, que foram analisadas individualmente. Contudo, ao decorrer do projeto foram realizadas análises prévias em diferentes espécies animais, de forma que permitisse um treinamento prévio do pesquisador.

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi o crioprotetor selecionado para o experimento devido à sua comprovada eficácia na prevenção de danos irreversíveis às plaquetas durante o processo de criopreservação. Sua atuação é essencial para viabilizar o armazenamento do PRP, pois aumenta a permeabilidade da membrana plasmática das células, reduz a energia de ativação necessária para o transporte de água durante o congelamento e interfere na formação de cristais de gelo no interior celular (Stoll & Wolkers, 2011).

Por fim, as amostras foram submetidas a quatro diferentes protocolos de criopreservação, sendo devidamente separadas em tubos do tipo Eppendorf. Os protocolos incluíram o congelamento em freezer convencional, a aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ , com divisão em dois grupos, um contendo 3% de DMSO e outro sem o crioprotetor. Além disso, as amostras também foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , igualmente divididas em dois grupos, um com 3% de DMSO e outro sem DMSO. Esses protocolos permitiram a avaliação comparativa dos efeitos das diferentes temperaturas de armazenamento

#### **4.7 LIOFILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS**

O processo de liofilização foi realizado no Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CENAPESQ-UFRPE). Inicialmente, as amostras de PRP foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, e em seguida, foram processadas conforme o manual do liofilizador (Figura 35). Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma temperatura de  $-27^{\circ}\text{C}$  na câmara de secagem, com vácuo de 0,52 mbar, por um período de 24 horas. O PRP liofilizado obtido foi armazenado em tubos de eppendorfs bem vedados e mantidos em temperatura ambiente, até sua reconstituição. A reconstituição do PRP foi realizada utilizando solução fisiológica como diluente, na mesma proporção da quantidade de PRP fresco antes do processamento de liofilização. (Campos, R.A., 2018)



**Figura 35.** Equipamento Alpha 1-4 LD Plus Christ: sistema utilizado para liofilização de amostras biológicas.

Fonte: Arquivo pessoal, (2025).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados dos hemogramas realizados nos animais revelaram que todas as análises estavam dentro dos parâmetros de normalidade estabelecidos para equinos. Além disso, foram selecionados animais cujas concentrações totais de plaquetas excedem 100.000  $\mu\text{L}$ .

Na Tabela 5, são apresentados os valores de plaquetas por microlitro ( $\mu\text{l}$ ) de amostra de sangue total e de plasma rico em plaquetas (PRP). Observa-se que a metodologia empregada para a produção do PRP foi eficaz, uma vez que, de modo geral, houve um aumento na concentração de plaquetas no PRP em comparação com o sangue total, de 1,20 a 2,82 vezes em relação à concentração inicial das plaquetas no sangue total, conforme demonstrado nos resultados da Tabela 5, os quais foram obtidos por meio da comparação entre a contagem manual realizada em câmara de Neubauer para o sangue total e o PRP. É pertinente destacar que a contagem manual de plaquetas representa um método que permite a avaliação individualizada das plaquetas, ao contrário dos métodos automáticos, os quais podem interpretar um agregado plaquetário como uma única unidade, como mencionado por

Moreno e Menke (2002).

**Tabela 5.** Resultados da contagem de plaquetas no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP) pelo método manual de Brecher.

<b>Animais</b>	<b>ST (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	<b>PRP (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	<b>Aumento (x)</b>
<b>Equino 1</b>	130	367	2,82
<b>Equino 2</b>	247	462	1,87
<b>Equino 3</b>	205	315	1,54
<b>Equino 4</b>	217	300	1,38
<b>Equino 5</b>	275	332	1,20
<b>Equino 6</b>	180	382	2,10

**ST** ( Sangue total); **PRP** ( Plasma rico em plaquetas).

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

**Tabela 6.** Resultados obtidos na avaliação morfológica do PRP avaliado à fresco.

<b>Animais</b>	<b>Normal ( %)</b>	<b>Incerto (%)</b>	<b>Ativado ( %)</b>
<b>Equino 1</b>	83	7	10
<b>Equino 2</b>	85	7	8
<b>Equino 3</b>	82	7	11
<b>Equino 4</b>	87	7	10
<b>Equino 5</b>	87	2	11
<b>Equino 6</b>	78	8	14

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

**Tabela 7.** Resultados obtidos na avaliação morfológica do PRP avaliado após 6 horas de refrigeração.

<b>Animais</b>	<b>Normal ( %)</b>	<b>Incerto ( %)</b>	<b>Ativado (%)</b>
<b>Equino 1</b>	69	7	24
<b>Equino 2</b>	68	9	23
<b>Equino 3</b>	68	9	23

<b>Equino 4</b>	65	15	20
<b>Equino 5</b>	67	12	21
<b>Equino 6</b>	64	15	21

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Para classificar as plaquetas quanto à sua morfologia, utilizou-se a metodologia adaptada de Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990). As plaquetas foram consideradas inativadas quando exibiam uma forma ligeiramente oval ou alongada; incertas quando houvesse uma mudança para uma forma esférica e ausência emissão de pseudópodes, e ativadas se apresentassem emissões de pseudópodes. Essa avaliação, por microscopia óptica, permitiu estimar o percentual de plaquetas que iniciou o processo de ativação e aquelas cuja ativação são irreversíveis, no qual, as plaquetas em estado incerto de ativação mostram uma alteração reversível, pois estas ainda podem liberar o conteúdo de seus grânulos. (Wurzinger e Schmid-Schönbein, 1990).

Na Tabela 6, ao analisar morfologicamente as plaquetas do PRP fresco, observou-se um percentual superior de plaquetas em estado normal de ativação em comparação aos outros dois estados analisados no experimento. De forma semelhante, conforme detalhado na Tabela 7, após 6 horas de refrigeração, constatou-se um maior percentual de plaquetas em estado normal. Nessa etapa, também foi identificado um aumento no percentual de ativação plaquetária, no entanto, as plaquetas em estado normal permaneceram predominantemente superiores em relação aos estados incertos e ativos. Esses resultados evidenciam uma preservação adequada das plaquetas durante o processamento e armazenamento sob refrigeração, por um período estimado de 6 horas.

Ao analisar comparativamente as informações apresentadas nas Tabelas 6 e 7, destaca-se um aumento no percentual de ativação plaquetária, juntamente com um incremento no percentual de plaquetas em estado incerto. No entanto, observou-se uma diminuição no percentual de plaquetas em estado normal ou inativado, cujos resultados diferiram dos observados no PRP fresco. Assim, é possível afirmar que o armazenamento do PRP em refrigerador promoveu um aumento da ativação plaquetária, porém, é importante destacar que ambos os grupos estudados demonstraram uma proporção superior a 60% de plaquetas aptas a liberarem os fatores de crescimento de seus grânulos durante a atuação terapêutica do PRP.

Merece destaque adicional a similaridade observada nos percentuais de estado

normal, incerto e ativado durante a avaliação a fresco e refrigerada entre os animais selecionados para a pesquisa. Tal similaridade constitui um aspecto relevante a ser considerado, sugerindo uma uniformidade nos perfis de atividade plaquetária entre os indivíduos avaliados.

## **CONGELAMENTO EM FREEZER -20 °C SEM DMSO**

Em relação, às amostras obtidas do freezer convencional à -20 C observou-se que as amostras congeladas sem crioprotetor, após descongelamento apresentaram na sua avaliação morfológica um percentual médio de 70,34% de plaquetas em estado normal, 13,91 % de plaquetas ativadas e 15,75 % de plaquetas em estado incerto. Com isso, através da obtenção do protocolo analisado observou-se um percentual 70,34% de plaquetas preservadas e aptas a liberarem seus fatores de crescimento após o processo de descongelamento. Na análise, foi possível observar a formação de raros agregados plaquetários e a presença ocasional de cristais de gelo em algumas amostras, além do tamanho sutilmente reduzido do volume plaquetário das plaquetas. Em relação a essas alterações observadas, a literatura destaca que alterações abruptas de temperatura e o congelamento rápido das células podem interferir no transporte de água através da membrana celular, favorecendo a formação de cristais de gelo e depósitos de sais no interior da célula, o que pode levar à ruptura mecânica de suas estruturas. Por outro lado, durante o processo de congelamento gradual, em que a temperatura é reduzida de forma constante e progressiva, a formação de gelo ocorre predominantemente no exterior da célula, resultando em menores danos às suas estruturas (Massumoto *et al.*, 1997).

O estudo de Connor (1996) com plaquetas confirmam os resultados deste experimento, uma vez que as células armazenadas em baixas temperaturas mantiveram-se viáveis e funcionais após o descongelamento. No entanto, são necessárias mais pesquisas para avaliar a eficácia do PRP criopreservado, para que possa ser utilizado da mesma forma que o produto fresco em diversos procedimentos.

## **CONGELAMENTO EM FREEZER - 20°C**

## **COM DMSO 3 %**

Para a avaliação das amostras contendo crioprotetor, o PRP foi diluído em uma concentração de 3% de DMSO, utilizando a proporção de 1 mL de PRP para 30 µL de DMSO, conforme descrito por Fantini *et al.* (2016). Em seguida, as amostras foram armazenadas em um freezer convencional, a uma temperatura média de -20 °C. Na avaliação morfológica das amostras foi possível observar um percentual de 72,25 % de plaquetas em estado normal, 14,41 % de plaquetas em estado incerto e 13,34 % de plaquetas ativadas. Assim como nas amostras do grupo sem crioprotetor, foi possível observar plaquetas com tamanho ligeiramente reduzido.

A escolha do dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor baseou-se em sua ampla utilização na preservação de plaquetas humanas. Em concentrações de 5% a 6%, o DMSO é atualmente considerado o crioprotetor mais eficaz para conservar plaquetas submetidas ao processo de criopreservação (Lee & Blajchman, 2007). Dessa forma, o DMSO atua sobre a permeabilidade da membrana plasmática das células, diminuindo a energia de ativação necessária para o transporte de água durante o processo de congelamento e atuando também sobre a formação de cristais de gelo no interior destas células e vitrificação (Stoll & Wolkers, 2011).

O estudo em questão avaliou o PRP criopreservado em freezer a -20 °C, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) a 3% como crioprotetor, com o objetivo de armazenar e preservar o plasma rico em plaquetas equinas sem comprometer sua viabilidade. A viabilidade foi confirmada pela observação de 72,5% de plaquetas em estado normal durante a avaliação.

## **CONGELAMENTO EM FREEZER -80 SEM DMSO**

Em relação, às amostras submetidas a freezer -80 ° sem crioprotetor (DMSO 3 %), quando descongeladas apresentaram na avaliação morfológica um percentual de 39,16 % de plaquetas em estado normal, 13,84 % de plaquetas em estado incerto e 47,00 % de plaquetas ativadas. Durante a realização da análise foi possível observar que as plaquetas encontravam-se em tamanho reduzido, além da observação de algumas plaquetas rompidas e degeneradas. Segundo Wurzinger e Schmid-Schönbein (1990), as plaquetas quando rompidas e degeneradas são classificadas como lise total, devido a perda da sua arquitetura normal. Essas lesões plaquetárias que são observadas são influenciadas por fatores como

duração do armazenamento, temperatura, quantidade de plaquetas no meio, dentre outros fatores (Ohto & Nollet, 2011).

Em relação a maior proporção de ativação plaquetária, sabe-se que durante o resfriamento, as membranas passam do estado líquido para o estado gelatinoso, resultando em menor capacidade de reorganização de sua estrutura e perda da integridade (Reid *et al.*, 1999). Com isso, durante o processo de reidratação, essas membranas se tornam transitoriamente permeáveis, permitindo a liberação das substâncias contidas no seu interior e a lise osmótica das plaquetas (Crowe *et al.*, 1998). O comprometimento da viabilidade das plaquetas foi evidenciado pelo aumento no percentual de plaquetas em estado ativado. Esse fenômeno indica uma alteração na viabilidade plaquetária, sugerindo que o processo de criopreservação pode ter afetado negativamente na preservação das plaquetas do PRP em estudo.

## **CONGELAMENTO EM FREEZER -80 COM DMSO 3%**

Em relação às amostras criopreservadas em freezer a -80 °C com DMSO a 3%, e posteriormente descongeladas para análise, a avaliação morfológica das estruturas celulares revelou um percentual de 50,8% de plaquetas normais, 10,5% de plaquetas em estado incerto e 38,9% de plaquetas ativadas. Esses resultados obtidos podem ser justificados pelo fato de que o dimetilsulfóxido (DMSO), quando utilizado em temperaturas baixas, protege as plaquetas da morte celular. No entanto, em temperatura ambiente, o DMSO torna-se tóxico. Segundo Fischer (2014), sabe-se que a viabilidade das plaquetas congeladas é comprometida por diversos fatores, entre os quais se destacam a lesão direta causada pelo frio, denominada crioinjúria, e a perda de viabilidade após o descongelamento devido à ação do próprio agente crioprotetor. Inicialmente, as células entram em contato com o crioprotetor, e, nesse estágio, podem ocorrer danos decorrentes da toxicidade do agente (tóxico à temperatura ambiente) e da alta osmolaridade do meio externo. Considerando essas informações, o DMSO foi cuidadosamente adicionado pela parede do criotubo e homogeneizado rapidamente, sendo imediatamente colocado no freezer. Ao descongelar, as amostras foram preparadas de forma ágil para evitar que ficassem expostas à temperatura ambiente.

Por fim, é importante ressaltar a falta de informações sobre a associação entre a toxicidade do DMSO e sua estabilidade após diluição, bem como sua baixa solubilidade. Esses fatores tornam a utilização do DMSO desaconselhável quando administrado em altas

doses ou grandes volumes. Por esse motivo, no presente estudo, foi utilizada uma proporção de 1 mL de PRP para 30 microlitros de DMSO, resultando em uma concentração de 3% de crioprotetor.

Esses resultados indicam que, embora uma parte significativa das plaquetas tenha permanecido viável, houve uma considerável ativação, o que pode comprometer a funcionalidade das plaquetas para fins terapêuticos. Portanto, é essencial que novos estudos sejam realizados para esclarecer melhor a eficácia do DMSO e, conseqüentemente, controlar seus efeitos. Além disso, conclui-se que, embora o uso de crioprotetor seja necessário para o congelamento, a adição do DMSO deve ocorrer apenas momentos antes do processo de congelamento, devido à sua toxicidade quando incubado com as células em temperatura ambiente.

## **LIOFILIZAÇÃO**

A liofilização do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem como objetivo expandir sua utilização, permitindo o seu armazenamento sem riscos de contaminação e por longos períodos de tempo. Além disso, o PRP liofilizado facilita sua comercialização em larga escala e aumenta sua vida útil. Esse processo de liofilização é um processo no qual uma substância é previamente congelada e submetida a diversos procedimentos para reduzir seu teor de água. Inicialmente, essa redução ocorre por sublimação, seguida pela dessorção. O processo envolve várias etapas, incluindo congelamento inicial, secagem primária e secagem secundária (Gatlin *et al.*, 2007; Nail & Gatlin, 2016)

Por esses motivos, o objetivo deste projeto foi promover a liofilização das plaquetas, preservando ao máximo suas características morfológicas e minimizando os riscos de contaminação, de modo a garantir a manutenção de sua atividade terapêutica. Os resultados obtidos da análise de PRP liofilizado após reconstituição demonstraram uma proporção de 86,5% de plaquetas ativadas, 0,84% de plaquetas em estado incerto e 12,66% de plaquetas normais. Diante desses resultados, foi observado um comprometimento considerável das amostras analisadas, o que torna imprescindível o aperfeiçoamento da técnica utilizada, assim como a realização de mais estudos, a fim de desenvolver um produto que seja efetivamente viável para comercialização.

## 6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados pela estatística descritiva através de valores de média, desvio padrão, intervalos de confiança, mediana e percentis P25 e P75. Comparou-se os diferentes tratamentos por meio do teste t pareado, além da análise de variância (ANOVA One-Way) com posthoc Tukey HSD.

A escolha dos testes deveu-se à verificação de normalidade da distribuição dos dados, realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. A margem de erro utilizada foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o programa R, através da plataforma Statistics Kingdom.

### 6.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

**Tabela 8.** Estatística descritiva dos dados obtidos para PRP normais em 6 equinos de diferentes grupos e tratamentos.

GRUPO	PRP Normais										
	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)	Percentil 25%	Mediana	Percentil 75%	Mínimo	Máximo	IC <sup>8</sup> 95%	IC 95% m	IC 95% M
FRSC <sup>1</sup>	83.67	3.44	4.12	82.25	84.00	86.50	78.00	87.00	2.76	80.91	86.42
REF6 <sup>2</sup>	66.83	1.94	2.90	65.50	67.50	68.00	64.00	69.00	1.55	65.28	68.39
C20S <sup>3</sup>	70.33	6.38	9.07	67.25	71.00	71.00	62.00	81.00	5.10	65.23	75.44
C20D <sup>4</sup>	72.25	4.19	5.80	69.00	72.75	74.63	67.00	78.00	3.35	68.90	75.60
C80S <sup>5</sup>	39.08	4.18	10.69	36.00	38.50	41.75	34.50	45.00	3.34	35.74	42.43
C80D <sup>6</sup>	50.85	5.83	11.47	45.63	50.75	54.45	45.00	59.00	4.67	46.18	55.52
LIOF <sup>7</sup>	12.67	5.32	41.97	8.25	13.00	14.75	7.00	21.00	4.25	8.41	16.92

<sup>1</sup>A fresco; <sup>2</sup>Refrigerado por 6 horas; <sup>3</sup>Congelador a 20° sem DMSO; <sup>4</sup>Congelador a 20° com DMSO; <sup>5</sup>Congelador a 80° sem DMSO; <sup>6</sup>Congelador a 80° com DMSO; <sup>7</sup>Liofilização.

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Na avaliação estatística dos dados obtidos dos plasmas ricos em plaquetas, avaliados morfológicamente como normais, segundo a classificação adaptada de Wurzinger e Schmid Schönbein (1990), observou-se que a média do grupo "a fresco" (FRSC1) foi de 83,67, com

desvio padrão de 3,44. Esses resultados indicam que a condição fresca mantém o PRP em melhores níveis, quando comparado aos outros tratamentos.

Por outro lado, o grupo "liofilização" (LIOF7) apresentou uma média estatisticamente inferior em relação aos demais grupos (12,67) e um desvio padrão mais elevado (5,32). Essa maior variabilidade nos resultados pode ser atribuída ao processo de liofilização, que aparentemente impactou na qualidade das amostras.

**Tabela 9.** Estatística para comparação entre os diferentes tratamentos e o grupo “a fresco”, evidenciando as plaquetas normais, incertas e ativadas em 6 equinos, através do teste t pareado.

GRUPO	FRSC <sup>1</sup>		
	NORMAL	INCERTAS	ATIVADAS
REF6 <sup>2</sup>	0.00007	0.03209	0.00022
C20S <sup>3</sup>	0.00217	0.00368	0.1303*
C20D <sup>4</sup>	0.00814	0.01672	0.1294*
C80S <sup>5</sup>	0.00001	0.00767	0.00001
C80D <sup>6</sup>	0.00021	0.1201*	0.00029
LIOF <sup>7</sup>	0.00001	0.0044	0.00001

<sup>1</sup>A fresco; <sup>2</sup>Refrigerado por 6 horas; <sup>3</sup>Congelador a 20° sem DMSO; <sup>4</sup>Congelador a 20° com DMSO; <sup>5</sup>Congelador a 80° sem DMSO; <sup>6</sup>Congelador a 80° com DMSO; <sup>7</sup> Liofilização. O asterisco (\*) aponta dados que não apresentam diferença significativa.

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

O teste t pareado foi utilizado para comparar os diferentes tratamentos com o grupo controle "a fresco". O teste revelou diferenças significativas considerando uma margem de erro de 5% ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos, exceto para algumas comparações específicas onde a significância não foi atingida, dentre eles, dentro das avaliações temos as amostras C80D incertas e C20S e C20D ativadas.

**Tabela 10.** Estatística para comparação de plaquetas normais entre todos os tratamentos de 6 equinos por teste *post hoc* Tukey HSD.

Par Comparado	Valor de p
FRSC - REFR	7.695E-06
FRSC - C20S	0.0003673
FRSC - C20D	0.002846

FRSC - C80S	6.51E-12
FRSC - C80D	7.41E-12
FRSC - LIOF	6.51E-12
REFR - C20S	0.85*
REFR - C20D	0.431*
REFR - C80S	9.51E-11
REFR - C80D	1.975E-05
REFR - LIOF	6.51E-12
C20S - C20D	0.9912*
C20S - C80S	1.00E-11
C20S - C80D	4.19E-07
C20S - LIOF	6.51E-12
C20D - C80S	7.17E-12
C20D - C80D	5.35E-08
C20D - LIOF	6.51E-12
C80S - C80D	0.001973
C80S - LIOF	3.27E-10
C80D - LIOF	6.52E-12

<sup>1</sup>A fresco; <sup>2</sup>Refrigerado por 6 horas; <sup>3</sup>Congelador a 20° sem DMSO; <sup>4</sup>Congelador a 20° com DMSO; <sup>5</sup>Congelador a 80° sem DMSO; <sup>6</sup>Congelador a 80° com DMSO; <sup>7</sup> Liofilização. O asterisco (\*) aponta dados que não apresentam diferença significativa.

Fonte: Elaborado pela autora, (2025).

Na Tabela 10, estão apresentados os resultados da análise de variância entre todos os grupos amostrais. Observou-se que não houve diferença significativa apenas nas comparações entre os grupos “REF6” e “C20S”, “REF6” e “C20D” e “C20S” e “C20D”. Em todos os outros pares comparados, foi identificada uma diferença estatística significativa.

Os resultados obtidos por meio da análise estatística mostraram que diferentes tratamentos afetaram significativamente nas médias obtidas do PRP (Plasma Rico em Plaquetas) nos equinos utilizados no experimento. Contudo, a liofilização apresentou resultados com valores médios menores de plaquetas em estado normal, o que pode indicar uma perda significativa de qualidade comparada ao método fresco.

De acordo com os resultados obtidos, a literatura sugere que a forma adequada de criopreservação das plaquetas envolve o uso de DMSO na proporção final de 6%, com congelamento não programado e estocagem em freezer mecânico a -80°C (Valeri *et al.*, 1974), ou DMSO na proporção final de 5%, com congelamento gradual de 1°C a 3°C/min e estocagem em nitrogênio líquido (Murphy *et al.*, 1974). Esses fatores podem, portanto, justificar os resultados insatisfatórios observados nas análises realizadas em freezer a -80°C. Essa perda da viabilidade das plaquetas observada foi correlacionada com a “lesão de

armazenamento”, que é associada a várias alterações bioquímicas. Tal viabilidade está comprometida quando há uma mudança da forma discóide para a forma esférica.

Dentre as dificuldades observadas durante a realização do trabalho, a contagem manual de plaquetas apresentou desafios, mesmo com o treinamento realizado na fase pré-experimental e ao longo do experimento. Essa dificuldade foi mais acentuada nas amostras criopreservadas, com ou sem crioprotetor, devido a diferença de osmolalidade e a consequente perda de água para o meio que podem ter contribuído para a redução do volume das plaquetas, o que, possivelmente, gerou maior dano à membrana celular. Isso resultou na observação de plaquetas menores e mais danificadas, dificultando, assim, a contagem plaquetária

Por fim, as comparações que não apresentaram diferença estatística, como “REF6” e “C20S”, “REF6” e “C20D” e “C20S” e C20D” indicam que os mesmos podem ter efeitos semelhantes, o que poderia ser explorado para otimizar sua utilização durante os procedimentos. Portanto, os resultados mostram que o tratamento “REF6” e “C20S”, “REF6” e “C20D” e “C20S” e C20D” mantém a qualidade do PRP de maneira mais consistente, enquanto outros métodos, como a liofilização, comprometem a qualidade do PRP.

## **7. CONCLUSÃO**

O estudo demonstrou que PRP refrigerado durante 6 horas e congelados a -20°C com e sem crioprotetor apresentaram baixa ativação plaquetária mantendo a qualidade do PRP de maneira mais consistente, enquanto os demais grupos (congelados a -80°C com e sem crioprotetor ou liofilizados) apresentaram uma ativação plaquetária prévia. Os resultados obtidos das amostras criopreservadas a -80°C e liofilizadas evidenciam a necessidade de pesquisas adicionais e do aprimoramento das técnicas para avaliar a qualidade e viabilidade das plaquetas após o processamento. Isso é fundamental para assegurar sua utilidade e garantir sua qualidade.

O projeto apresenta uma opção interessante, permitindo que o veterinário de campo utilize o PRP refrigerado, eliminando a necessidade de uma nova coleta. No entanto, mais estudos serão necessários para determinar até que ponto o PRP refrigerado pode ser utilizado sem comprometer sua eficácia. Vale ressaltar, que preservar a ativação das plaquetas durante o processamento do PRP é essencial para garantir suas propriedades terapêuticas, aumentar sua eficácia clínica e assegurar a segurança do tratamento, promovendo, assim, uma resposta biológica eficaz.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALEIXO, G.A.S. ; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N.;MESQUITA, E.P. ; OLIVEIRA, F.F.; ZUBIETA, L.M.V.; ALMEIDA, T.L.C. ; GUIMARÃES, A.L.N. ; MAIA, F.C; ZACARIAS, T.F.L.; SANTOS, S.M.L.G. ; LIMA, C.P.S. **Comparison between two protocols to obtain platelet-rich plasma in dogs.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, n.3, p.567-573, 2011.
- BALAMURUGAN, K; SHAMMI, M; GEORGE, R. S; KANNAN, T. A; SIVASHANKAR, R. **Preparation of autologous platelet rich plasma in Kathiawari and thoroughbred horses.** Internacional journal of current microbiology and Applied sciences, v.8, n.4, p. 1689-1691, 2019.
- BARBOSA, A. L. T.; CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; CARLO, B. N. **Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães.** Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.
- CAMPOS, R.A., 2018. **Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado na regeneração de pele em ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- CONNOR, J.; CURRIE, L.M.; ALLAN, H. et al. **Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4°C and treated with second-messenger effectors.** v.36, p.691-698, 1996.
- CROWE, J.H. et al. **The role of vitrification in anhydrosis.** Annual Review of Physiology, v.60, p.73-103, 1998.
- CONNOR, J.; CURRIE, L. M.; ALLAN, H.; LIVESEY, S. A. **Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4° C and treated with second-messenger effectors.** Transfusion, v. 36, n.8, p. 691-698, 1996
- CROWLEY, J.P.; RENE, A.; VALERI, R.**Changes in platelet shape and structure after freeze preservation.** Blood, v.44, p.599-603, 1974.
- DHURAT, R. AND SUKESH, M. **Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author’s Perspective.** Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery, 7, 189-197.
- FANTINI P.; PALHARES2 M.S. ; PRADES M. ; MACEDO V.C.; SILVA FILHO J.M. ; LEME F.O.P.; CARMONA J.U.. **Equine platelet-rich plasma cryopreservation.** ARQ. BRAS. MED. VET. ZOOTECA., V.68, N.1, P.73-81, 2016.
- FITZPATRICK, J; BULSARA, M; ZHENG, M. H. **The effectiveness of platelet-rich plasma in the treatment of tendinopathy.** American Journal of Sports Medicine. Vol. 45, N. 1, 2017.

FONTENOT R. L; SINK C. A; WERRE S. R; WEINSTEIN N. M; DAHLGREN L. A. **Centrifugação em tubo simples para processamento de plasma rico em plaquetas no cavalo.** Can Vet, 2012.

FISCHER, G.B. **Efeito da concentração e combinação de crioprotetores na viabilidade medida por citometria de fluxo das células tronco hematopoiéticas congeladas em freezer mecânico.** Tese de Doutorado. Universidade federal do rio grande do sul, Porto alegre - 2014.

GATLIN, L. A.; AUFFRET, T.; SHALAEV, E. Y.; SPEAKER, S. M. et al. **Freeze-drying concepts: the basics.** In: **Protein Formulation and Delivery:** CRC Press, 2007. p. 195-214

HANDIN, R.I.; VALERI, C.R. **Improved viability of previously frozen platelets.** v.40, p.509-513, 1972.

KWIRANT, L.A.A. **Criopreservação do plasma rico em plaquetas (PRP) de equinos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria - 2013

KWIRANT, L. A. A; CORTE, F. D; CANTARELLI, C; CARGNELUTTI, J.F; MARTINS, M; CABRAL, M. W; MACIEL, N; RUBIN, M. I. B; **Cooling and Cryopreservation of Equine Platelet-Rich Plasma With Dimethyl Sulfoxide and Trehalose.** Journal of Equine Veterinary Science, v.72, p. 112-116, 2019.

LANDI, E. P.; ROVERI, E. G.; OZELO, M. C.; BIZZACCHI, J. M. A.; ORIGA, A. F.; REIS, A. R. C.; SOUZA, C. A.; MARQUES JR, J. F. C. **Transfusion and Apheresis Science 30 (2004) 205–212.**

MAIA, L; SOUZA, M. V; ALVES, G. E. S; JÚNIOR, RIBEIRO, J. I; OLIVEIRA, A. C; ZANDIL, B. M; SILVA, Y.F.R.S. **Plasma Rico em Plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: Avaliação Ultrassonográfica.** Pesq. Veterinária Brasileira, p. 241-245. 2009.

MIRANDA, S.; COSTA, M.F.M; REBOUÇAS, N.; RAMOS, M.T. ; LESSA, D. A. B.; ALENCAR, N.X. **Protocols for preparation of platelet rich plasma (PRP) in Quarter Horses.** Pesq. Vet. Bras. 39(8):614-621, August 2019

MORENO, A. & MENKE, D. **Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral bloods mear.** ClinLab Med. 2002.

MASSUMOTO, C. M.; MIZUKAMI, S; CAMPOS, M. F.; SILVA, L. A. G.; MENDRONE JÚNIOR, A.; SAKASHITA, A.; ZAMBON, E.; OSTRONOFF, M.; MACEDO, M. C. A.; MEDEIROS, R.; DORLHIAC, P.; CHAMONE, D.; DULLEY, F. **Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: Experiência em 86 congelamentos.** Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 93-98, 1997.

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

MUTHU S, KRISHNAN A, RAMANATHAN KR. **Standardization and validation of a conventional high yield platelet-rich plasma preparation protocol.** *Annals of Medicine & Surgery*, 2022.

NAVIAUX, J. M. **Cavalos na saúde e na doença.** 2ª ed. São Paulo: Roca, 1988.

NANI, L.A.S. **Padronização do processamento do plasma rico em plaquetas e lisado de plaquetas para uso clínico.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Paulo- 2022.

NURDEN A.T., NURDEN P., SANCHEZ M., ANDIA I. & ANITUA E. **Platelets and wound healing.** *Front. Biosci.* 13:3532-3548. 2008.

OLIVEIRA, R. A. G. **Avaliação de métodos automatizados e manuais para contagem de plaquetas em pacientes plaquetopênicos.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - 2000.

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

PACHITO, D. V; BAGATTINI, A. M; JÚNIOR, M. A; RIERA, R. **Práticas de produção, armazenamento e utilização do plasma rico em plaquetas e produtos relacionados no Brasil: estudo transversal.** *Revista visa em debate*, v.9, n.2, p.48-58, 2021.

PAES LEME F. O ; WURZINGER L. J; VASCONCELOS A. C ; ALVES G. E.S. **Platelets activation in equine with induced laminitis and treated with ketoprophen, phenylbutazone and flunixin meglumin.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.2, p.149-157, 2006.

PEREIRA, R. C. F., ZACARIAS G.V. F., CANTARELLI, C. **Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina.** *Cienc. Rural*, v.43, 339 p. 1122-1127, 2013.

REID, T.J.; VICENT, F.L.; ESTEBAN, G. **Cooling and freezing damage platelet membrane integrity.** *Cryobiology*, v.38, p.209-224, 1999.

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, 2018.

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

SILVA, L. V. P. **Conservação e viabilidade do plasma rico em plaquetas de coelhos sob refrigeração.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

SEIDEL SRT, VENDRUSCOLO CP, MOREIRA JJ, FÜLBER J, OTTAIANO TF, OLIVA ML V., ET AL. **Does Double Centrifugation Lead to Premature Platelet**

**Aggregation and Decreased TGF-  $\beta$ 1 Concentrations in Equine Platelet-Rich Plasma?** Vet. Sci. 2019, 6, 68.

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

SUTER, W. W; KANEPS, A. J; BERTONE, A. L. **Comparação de valores hematológicos e concentrações de fator de crescimento transformante- $\gamma$  e fator de crescimento semelhante à insulina em concentrados de plaquetas obtidos por meio de métodos de buffy coat e aférese de sangue equino.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.65, p. 924–930. 2004.

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

THRALL M.A. **Diagnóstico dos distúrbios hemorrágicos, p.170-187.** *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Roca, São Paulo - 2007

TOSTES, M. A. V.; JUNIOR, S. T. ; PEREIRA, G. A.; SOARES, S.; SOUZA, H. M. **Influence of collection, preparation and storage on the quality of platelet concentrate.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2008.

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

VAN DER MEER W.; MACKENZIE, M.A.; DINNISSEN, J.W.; DE KEIJZER, M.H. **Pseudoplatelets: a retrospective study of the incidence and interference with platelet counting.** *J ClinPathol*, 2003.

VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. DE M.; MORAES, L F.; MAIA, L. ; QUEIROZ, D L; WATANABE, M. J.; YAMADA, A. L. M. ;ALVES, A.L. G. **Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina.** *Pesq. Vet. Bras.* 32(2):106-110, fevereiro 2012.

VIEIRA, R. B. K. **Preservação de plasma rico em plaquetas de coelhos em nitrogênio líquido e freezer.** *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal De Uberlândia, 2017.

VALERI, C. R.; FEINGOLD H.; MARCHIONNI L. D. **A simple method for freezing human platelets using 6% dimethylsulfoxide and storage at -80°C** - *Blood*. Vol.43, Chelsea, 1974.

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