

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTABILIDADE DO FATOR DE VON WILLEBRAND E FATOR
VIII NO CRIOPRECIPITADO CANINO EM DIFERENTES
PROTOCOLOS DE ARMAZENAMENTO**

CLAUDIA ZEFERINO GARCIA

BOTUCATU – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTABILIDADE DO FATOR DE VON WILLEBRAND E FATOR
VIII NO CRIOPRECIPITADO CANINO EM DIFERENTES
PROTOCOLOS DE ARMAZENAMENTO**

CLAUDIA ZEFERINO GARCIA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do **título de Mestre**.

Orientador: Prof^a Adj. Regina
Kiomi Takahira

BOTUCATU – SP

2014

Nome da autora: Claudia Zeferino Garcia

Título: ESTABILIDADE DO FATOR DE VON WILLEBRAND E FATOR VIII NO CRIOPRECIPITADO CANINO EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE ARMAZENAMENTO

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Dr^a Regina Kiomi Takahira
Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Professor Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Professora Dr^a Simone Gonçalves Rodrigues Gomes
Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais
Universidade de Santo Amaro - UNISA – SÃO PAULO

Botucatu, 29 de julho de 2014.

Em especial à minha família. Aos meus pais, pelo amor, carinho, apoio, companheirismo e exemplo. Aos meus irmãos, pela amizade e incentivo. À minha avó, pela preocupação e amor.

AGRADECIMENTOS

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto de Mestrado (2012/13677-6) e Auxílio (2012/15219-5).

Ao Prof^o Adj. Raimundo de Souza Lopes, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof^o Luiz Henrique Machado e a Prof^a Simone Gonçalves por fazerem parte da minha banca de mestrado.

Aos residentes do Laboratório Clínico Veterinário Katiane, Carolina, Marina, Mariana, Bruno, Carolina Martins, Cristiane e Jussara, pela ajuda e disponibilidade.

Aos estagiários do Laboratório Clínico Veterinário pela ajuda nas coletas.

Às minhas companheiras e amigas pós-graduandas, em especial Daniele e Thays, pelo apoio, carinho, ajuda e principalmente pelo companheirismo durante este período.

Aos amigos pós-graduandos Maurício, Sarah, Priscila, Claudenice e Cláudia pelos momentos de descontração.

Às alunas Mayara, Carina, Raquel, Beatriz, Gabriela, entre outras, que me ajudaram sempre que puderam na procura de doadores, nas coletas e processamento das bolsas.

Aos pós-graduandos: Felipe, Camila, Nara, Daniela e Tatiana, pela ajuda e amizade.

Aos funcionários do Laboratório Clínico Veterinário, Márcio, Marcos, Adriana e Rosana.

Aos funcionários do setor de Pós-Graduação.

À Gislene e equipe do Hemocentro da FMB, que me ensinaram técnicas necessárias para a realização deste trabalho.

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

Às amigas: Fernanda, Daniele, Renata, Beatriz e Loni pelo apoio.

Aos meus pais, Márcia e José Carlos, meus irmãos, Clara e José, e minha avó Izolina por me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos importantes.

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

Agradeço aos proprietários dos doadores pelo gesto de solidariedade, em especial ao adestrador Ari Júnior por disponibilizar seus cães e pela ajuda constante ao banco de sangue.

Agradeço aos cães doadores de sangue.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média dos resultados laboratoriais obtidos nos exames de triagem dos cães doadores e valores de referência hematológicos (Jain, 1993) e bioquímicos (Kaneko, 1997)..... 37
- Tabela 2.** Dosagens do Plasma fresco congelado (PFC) e Crioprecipitado (Crio) de três doadores. Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio 37
- Tabela 3.** Médias e desvios-padrões das variáveis hemostáticas Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio (Fib); Tempo de protrombina (TP); Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) das amostras dos grupos I (congelamento a -80°C) e II (congelamento a -20°C) nos diferentes momentos e grupos. 40
- Tabela 4.** Médias e desvios-padrões das diferenças entre momento um e momento zero para cada grupo experimental do Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio (Fib); Tempo de protrombina (TP); Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)..... 43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Média da concentração de Fator de von Willebrand presente no PFC e após a obtenção do crioprecipitado. 38
- Figura 2.** Média dos níveis de atividade do Fator VIII presente no PFC e após a obtenção do crioprecipitado. 38
- Figura 3.** Média da concentração de Fibrinogênio presente no PFC e após a obtenção do crioprecipitado. 39
- Figura 4.** Médias e desvio padrão da concentração do Fator de von Willbrand presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1). 40
- Figura 5.** Médias e desvio padrão do tempo de protrombina do crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1). 41
- Figura 6.** Médias e desvio padrão do tempo de tromboplastina parcial ativada do crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1). 41
- Figura 7.** Médias e desvio padrão da concentração de Fibrinogênio presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1). 42
- Figura 8.** Médias e desvio padrão dos níveis de atividade do Fator VIII presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1). 42

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

% - por cento

°C – graus Celsius

ALT – alanina aminotransferase

cm – centímetros

Crio – crioprecipitado

CID – coagulação intravascular disseminada

dL - decilitro

DvW – doença de von Willebrand

FA – fosfatase alcalina

Fib – fibrinogênio

FvW – fator de von Willebrand

FVIII – fator VIII

GGT – gama glutamil transferase

et al. – e colaboradores

g – unidade da força centrífuga relativa

g/dL – gramas por decilitro

h – hora

kg – quilograma

M – momento

mL – mililitros

s – segundos

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFC – plasma fresco congelado

TP – tempo de protrombina

TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada

μL – microlitro

μg/dL – micrograma por decilitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Uso do crioprecipitado.....	18
2.1.1. Doença de von Willebrand.....	18
2.1.2. Hemofilia A	20
2.1.3. Hipofibrinogenemia.....	23
2.2. Técnica de coleta	24
2.3. Fracionamento para obtenção do crioprecipitado	24
2.4. Armazenamento do crioprecipitado	25
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Experimento	32
4.1.1. Seleção dos animais.....	32
4.1.2. Delineamento experimental	32
4.1.3. Colheita das bolsas de sangue.....	32
4.1.4. Obtenção do crioprecipitado	33
4.1.5. Mensuração do TP, TTPA, FVIII e fibrinogênio	33
4.1.6. Determinação do FvW	34
4.2. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	50
8. BIBLIOGRAFIA	52
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	59

GARCIA, CLAUDIA ZEFERINO. **Estabilidade do fator de von Willebrand e fator VIII no crioprecipitado canino em diferentes protocolos de armazenamento**. Botucatu, 2014. 75 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

O fator VIII (FVIII), o fator de von Willebrand (FvW) e o fibrinogênio são de suma importância na coagulação sanguínea, com diferentes funções fisiológicas. Por conter altas concentrações destes fatores a transfusão de crioprecipitado é uma terapia utilizada principalmente em pacientes que apresentam Doença de von Willebrand, Hemofilia A (deficiência do FVIII), ou pacientes que sofrem de hipo ou disfibrinogenemia. Este hemocomponente é um precipitado obtido após o descongelamento parcial (entre 1 e 6°C) do plasma fresco congelado, e também é conhecido como fator anti-hemofílico. Estudos têm demonstrado que o protocolo de congelamento e armazenamento do crioprecipitado afeta a qualidade do produto e a viabilidade destes fatores. Com o objetivo de avaliar a viabilidade do crioprecipitado canino em diferentes protocolos de congelamento e armazenamento foram avaliados dois grupos compostos de 10 unidades de crioprecipitado canino (n=20). Após a centrifugação das bolsas de sangue, o plasma fresco foi congelado a -80°C (grupo I) e a -20°C (grupo II). Vinte e quatro horas após o congelamento das bolsas, estas foram submetidas ao procedimento de extração do crioprecipitado. Os crioprecipitados das bolsas dos dois grupos foram submetidos à determinação do TP, TTPA, FVIII, FvW e fibrinogênio, no momento zero e após seis meses de estocagem. Para a realização das coletas, foram utilizadas bolsas sanguíneas triplas de plástico, com anticoagulante CPDA-1, sendo a bolsa principal com capacidade para 450 mL de sangue total (JP Indústria Farmacêutica®). Após o crioprecipitado devidamente pronto, uma alíquota de aproximadamente 5 mL da bolsa de crioprecipitado foi separada em criotubos para análise da amostra pré-estocagem e seis meses pós estocagem. As amostras obtidas em cada momento foram congeladas à -80°C até o momento do processamento. Os resultados mostraram um decréscimo significativo dos fatores e prolongamento do TTPA ($p < 0,05$) em ambos os grupos, no momento zero e após seis meses

de armazenamento. Contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que a diferença na temperatura de congelamento inicial não influenciou no decréscimo dos fatores após seis meses de armazenamento à -20°C.

Palavras-chave: Cão; Fator de von Willebrand; Fator VIII; Plasma sanguíneo; Sangue – coleta e preservação.

GARCIA, CLAUDIA ZEFERINO. **Stability of von Willebrand factor and factor VIII in canine cryoprecipitate in different storage protocols**. Botucatu, 2014. 75 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

The factor VIII (FVIII), the von Willebrand factor (vWF) and the fibrinogen are extremely important to the blood clotting process, with various physiological functions. Because it contains high concentrations of these factors and fibrinogen, transfusing cryoprecipitate is a therapy mainly used in patients who have von Willebrand disease, Hemophilia A (FVIII deficiency), or who suffer from hypo/dysfibrinogenemia. This hemocomponent is a precipitate obtained after the partial thawing process (between 1 and 6°C) of fresh frozen plasma, and which is also known as the anti-hemophilic factor. Studies have demonstrated that the cryoprecipitate freezing and storage protocol affects the product quality as well as these factors viability. In order to evaluate the canine cryoprecipitate viability in different freezing and storage protocols, two groups containing 10 units of canine cryoprecipitate (n=20) were evaluated. Following the blood centrifugation, the fresh plasma was frozen at -80°C (group I) and at -20°C (group II). Twenty-four hours after freezing the blood bags, they were submitted to the cryoprecipitate extraction procedure. The cryoprecipitate from both groups of blood bags were submitted to the TP, TTPA, FVIII, FvW and fibrinogen determination process, at time zero and after six months of storage. During the collections, triple plastic blood bags were used, along with the anticoagulant CPDA-1, being the main bag capacity of 450 mL of whole blood (JP Indústria Farmacêutica®). After having the cryoprecipitate properly ready, an approximately 5 mL aliquot of cryoprecipitate was separated into cryovials to be analysed pre-storage and six months after storage. However, there was no significant difference between treatments, demonstrating that the difference in initial freezing temperature did not influence the decrease of the factors after six months storage at -20°C.

Key-words: Dog; von Willebrand factor; Factor VIII; Plasma; Blood – collection and preservation.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea, também denominada hemoterapia, é definida como uma terapia intravenosa realizada com sangue total ou seus componentes. Podendo ser aplicada em diversos casos, como: hipovolemia, disfunções plaquetárias, deficiência de fatores da coagulação, hipoproteinemia, anemias causadas por hemorragia, distúrbio medular ou eritropoiese ineficaz, anemia hemolítica auto-imune e neoplasia (BROWN e VAP, 2007).

Nas últimas décadas na medicina veterinária, tem ocorrido um aumento na utilização de hemocomponentes em relação à transfusão de sangue total. Esse aumento se deve as vantagens do fracionamento do sangue, que possibilita uma reposição específica para a necessidade de cada paciente, minimiza ocorrência de reações transfusionais devido a menor exposição a antígenos e componentes desnecessários, diminui o risco da transmissão de agentes infecciosos e ainda possibilita a utilização de uma bolsa de sangue para vários pacientes (SCHNEIDER, 1995; ABRAMS OGG, 2000).

A partir do sangue total podem ser obtidos o concentrado de hemácias, plasma fresco congelado (PFC), crioprecipitado, plasma criopobre, plasma rico em plaquetas e concentrado de plaquetas (PEREIRA e RAMALHO, 2001). Por conter maiores concentrações de fator VIII (FVIII), fator de von Willebrand (FvW), fibrinogênio e fator XIII, a transfusão de crioprecipitado é uma terapia utilizada principalmente em pacientes que apresentam doença de von Willebrand (DvW), hemofilia A (deficiência do FVIII), ou pacientes que sofrem de hipo ou disfibrinogenemia (LANEVISCHI e WARDROP, 2001). Essas doenças constituem as principais indicações para o uso do crioprecipitado e outros componentes plasmáticos (LANEVISCHI e WARDROP, 2001).

O FvW consiste em uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular que atua na hemostasia primária, realizando uma ponte molecular entre as plaquetas e o subendotélio exposto, além de possuir a capacidade de atuar na agregação plaquetária (HALLENBECK, 1981; OLSEN et al., 2003). O mesmo tem a capacidade de carrear o FVIII, um co-fator de extrema importância na cascata de coagulação sanguínea, essencial na ativação do fator X (DAY et al., 2000), apesar de lábil (LANEVISCHI e WARDROP, 2001).

Já o fibrinogênio é uma proteína de alto peso molecular sintetizada pelos hepatócitos, que assim como o FVIII atua na hemostasia secundária. A trombina catalisa a conversão do fibrinogênio em fibrina, que desempenha um papel chave na formação e estabilização do coágulo (FECTEAU et al., 1997; FRANCHINI e LIPPI, 2012).

Estudos têm demonstrado que a utilização do crioprecipitado como auxílio terapêutico em cães portadores de DvW e hemofilia A mostrou-se mais eficaz e seguro em comparação com o uso do PFC (STOKOL e PARRY, 1997; DAY et al., 2000, BARR e MCMICHAEL, 2012).

Existem alguns dados sobre condições de congelamento e sua relação com a qualidade do crioprecipitado, porém são necessários mais estudos, principalmente na medicina veterinária.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a concentração dos fatores presentes no crioprecipitado em diferentes temperaturas e tempos de armazenamento, a fim de determinar se a qualidade do produto é estável e conseqüentemente a eficácia da terapia utilizando o hemocomponente.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

Há anos a hemoterapia tem se baseado no uso de sangue total, e este tem sido cada vez menos utilizado em medicina veterinária (LANEVISCHI e WARDROP, 2001). Os subprodutos do sangue incluem seus componentes e derivados. Os componentes sanguíneos são obtidos através da centrifugação, ou menos comumente, através da aférese. O uso dos componentes sanguíneos permite que mais de um paciente possa se beneficiar de apenas um doador e reduz os riscos de uma reação transfusional contra os outros componentes desnecessários, pois muitas vezes o paciente que requer uma transfusão precisa de apenas um componente sanguíneo específico (KRISTENSEN e FELDMAN, 1995; SCHNEIDER, 1995; LACERDA, 2005).

A transfusão de sangue total fornece hemácias e proteínas plasmáticas, incluindo albumina e antitrombina III, se armazenado por mais de 24 horas contém poucas plaquetas e leucócitos viáveis. Além disso, os fatores de coagulação V e VIII decrescem durante a estocagem, tornando-o uma escolha inadequada para pacientes com DvW e/ou hemofilia A (RAZOUK e REICHE, 2004; CHIARAMONTE, 2004).

Enquanto a transfusão de produtos plasmáticos desempenha um papel importante e crescente na terapia de pacientes caninos com sangramentos decorrentes de coagulopatias hereditárias. Realizar transfusão do plasma ou suas frações, como o crioprecipitado, ao invés de sangue total fresco ou estocado minimiza o risco de reações transfusionais e sobrecarga de volume. Além disso, o plasma pode ser armazenado congelado, o que permite que ele seja mantido por um período de tempo mais prolongado do que o sangue refrigerado (WARDROP e BROOKS, 2001).

Tendo em vista o crescente uso de frações plasmáticas, Stokol e Parry (1998) realizaram um estudo a fim de comparar a eficácia do PFC e crioprecipitado canino. Demonstrando que além de ser mais eficaz na reposição de fatores nenhum animal tratado com crioprecipitado apresentou qualquer efeito adverso. Enquanto mais da metade dos animais tratados com PFC apresentaram reações adversas leves, incluindo prurido facial e papúlas, assim como reações severas como palidez, letargia e vômitos.

2.1. Uso do crioprecipitado

O crioprecipitado é composto por aproximadamente 20% de fibrinogênio, 50% de fator VII da coagulação e 30% de fatores VIII, XIII e FvW. É obtido a partir da centrifugação do plasma em temperatura controlada. A unidade de PFC deve ser descongelada a 4°C e então centrifugada, formando um precipitado branco. Assim como o PFC, é idealmente estocado entre -18°C e -20°C por até um ano (CHIARAMONTE, 2004).

As principais indicações para o uso do crioprecipitado canino e outros componentes plasmáticos são: DvW, hemofilia A e hipofibrinogenemia ou disfibrinogenemia (LANEVISCHI e WARDROP, 2001).

Seu uso na prática cirúrgica é baseado na suposição de que pacientes com deficiência de tais fatores estão em maior risco de complicações hemorrágicas e a substituição dos fatores é eficaz em diminuir esse risco (ARYA et al., 2011).

2.1.1. Doença de von Willebrand

A DvW é o distúrbio hemostático hereditário mais comum em cães (JOHNSON et al., 1988; MATTOSO et al., 2010; BARR e MCMICHAEL, 2012). A mesma já foi diagnosticada em mais de 54 raças de cães nos Estados Unidos, com maior prevalência em Doberman, Airedale Terrier e Scottish Terrier (SADLER et al., 1995; BURGESS et al., 2009). No Reino Unido, a DvW é mais prevalente em cães da raça Pastor Alemão, Golden Retriever, Schnauzer Miniatura, Welsh Corgi Pembroke e Manchester Terrier. Em Botucatu, interior de São Paulo Mattoso et al. (2010) demonstraram prevalência maior da doença em cães da raça Doberman e Golden Retriever. A DvW caracteriza-se pela deficiência do FvW, e desde a sua descoberta três tipos foram identificados: dois deles compreendem deficiências quantitativas (Tipo 1 e 3), com diminuição do fator circulante, e o outro é qualitativo (Tipo 2), onde o fator possui uma estrutura multimérica anormal (BURGESS et al., 2009).

Esta coagulopatia é causada por um defeito quantitativo ou qualitativo ou por ambos no FvW, uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular

necessária para a adesão de plaquetas no local da lesão vascular e para estabilização do FVIII (BURGESS et al., 2009). Em cães, os sinais clínicos da doença são semelhantes aos dos seres humanos, tais como hemorragia de mucosa, hemorragia pós-cirúrgica prolongada e sangramento excessivo com o crescimento dos dentes. Os cães afetados podem não exibir os sinais clínicos de sangramento ou hemorragia excessiva com frequência, podendo ser evidente apenas após cirurgia ou trauma (MATTOSO et al., 2010).

O diagnóstico da DvW baseia-se na quantificação deste no plasma além dos testes de função plaquetária FvW - dependente. A diátese hemorrágica pode ter várias causas, tornando o diagnóstico mais difícil (MATTOSO et al., 2010).

No tratamento da doença, o acetato de desmopressina demonstrou melhorar a hemostasia em humanos com diferentes tipos de hemorragias (JOHNSTONE, 1999). A desmopressina é um análogo da vasopressina que provoca a liberação do FvW a partir de células endoteliais. Doses subsequentes de desmopressina podem não resultar em um aumento substancial, já que há o esgotamento do FvW presente nestas células (BARR e MCMICHAEL, 2012).

Até o momento, o mecanismo de ação do acetato de desmopressina não foi totalmente caracterizado. Na medicina seu efeito no aumento da atividade do FVIII é bem documentado, além disso, mostrou-se eficaz em pacientes com distúrbios plaquetários, possivelmente, devido o aumento da adesividade das plaquetas ao subendotélio, aumento da agregação plaquetária e aumento da concentração de FvW plasmático (JOHNSTONE, 1999; BARR e MCMICHAEL, 2012).

Estudos que avaliaram o uso de desmopressina em cães não demonstraram nenhuma elevação na concentração do FvW ou elevação dos multímeros de alto peso molecular. Porém, a administração do medicamento em Dobermans com DvW tipo 1 resultou em melhora da função hemostática, mesmo apresentando aumento mínimo na concentração do FvW (BARR e MCMICHAEL, 2012).

Contudo, as terapias transfusionais continuam sendo o principal tratamento utilizado em casos de sangramento, e na prevenção destes, ou nos

casos em que o acetato de desmopressina é insuficiente para a hemostasia (BURGESS et al., 2009).

De acordo com Wardrop e Brooks (2001), o crioprecipitado é o tratamento de escolha para qualquer episódio de sangramento em cães com DvW. A transfusão do hemocomponente é capaz de promover o controle efetivo da hemorragia ativa utilizando uma unidade para cada 5-10 kg de peso do animal, em casos de hemostasia cirúrgica seria uma unidade para cada 10-20 kg de peso. Sendo o efeito de curta duração, devido o fator transfundido ser eliminado em algumas horas da circulação.

2.1.2. Hemofilia A

A deficiência ou ausência do FVIII, conhecida como hemofilia A ou hemofilia clássica, é uma doença congênita e hereditária que acomete principalmente cães machos jovens. Esta doença tem sido relatada em diversas raças de cães, incluindo cruzamentos (DAY et al., 2000; FINN et al., 2010). Caracteriza-se por hemorragias espontâneas ou causadas por leves traumatismos, além de hemartrose, hematomas e sangramentos pelo trato urogenital e gastrointestinal (GILES et al., 1984; DALMOLIN et al., 2008).

O diagnóstico laboratorial da deficiência de fator VIII e FvW depende da quantificação destes no plasma. O FVIII é normalmente quantificado em termos da sua atividade funcional, de modo que as medições não são rotineiramente realizadas devido a dificuldade em realizar estes ensaios (JOHNSTONE et al., 1991).

Na hemofilia A o objetivo da terapia com crioprecipitado deve ser aumentar as concentrações plasmáticas de FVIII em pelo menos 25 a 30%. Uma comparação entre o PFC e o crioprecipitado demonstrou aumentos semelhantes na atividade do FVIII de coagulação com ambos os produtos, mas a incidência de efeitos colaterais (leve prurido, palidez, fraqueza) foi menor com o crioprecipitado (DAY et al., 2000).

Lewis et al. (1983) desenvolveram uma colônia de cães hemofílicos, ao longo de 13 anos, totalizando 29 cães. Seguindo a genética de um cão

hemofílico da raça Lulu da Pomerânia. Dentre estes, 21 animais morreram de hemorragias graves não tratadas, que geralmente ocorreram em cavidade, sendo a hemorragia intra-abdominal a forma mais comum. Os cães eram saudáveis, sem sintomatologia visível nas articulações. Apenas vinte e duas hemorragias foram observadas em seis anos, incluindo hematoma, epistaxe, hematúria, melena e episódio de sangramento pós-parto. A resposta foi rápida a infusão de uma a seis unidades de crioprecipitado canino. Apenas um cão morreu de choque anafilático após o tratamento com FVIII humano.

Stokol e Parry (1998) realizaram um experimento com nove animais, quatro apresentando Hemofilia A e cinco apresentando DvW tipo 1 ou tipo 3, com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança na utilização do crioprecipitado. Os animais com DvW deste estudo alcançaram níveis de FvW maiores com a transfusão do crioprecipitado, já os cães com Hemofilia A obtiveram aumentos semelhantes do FVIII com transfusão do PFC e crioprecipitado. Seis dos nove animais tratados com PFC apresentaram efeitos adversos que variaram de prurido leve a palidez e fraqueza, ao passo que nenhum dos animais tratados com crioprecipitado teve qualquer reação.

Aproximadamente 10% entre todos os pacientes com hemofilia A que passam por terapia de reposição de FVIII, seja a partir do crioprecipitado ou FVIII concentrado, desenvolvem anticorpos contra o fator deficiente. Atualmente, este representa um dos problemas mais sérios decorrentes da manutenção da doença (O'KELLEY et al., 2009).

A infusão de plasma ou derivado de FVIII recombinante é o tratamento padrão em pacientes hemofílicos, porém o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra a proteína substituída é uma das maiores complicações da terapia. Na medicina aloanticorpos (inibidores) neutralizam a terapia de substituição proteica em 20 a 30% dos pacientes jovens com hemofilia moderada a severa, resultando em altas taxa de mortalidade. De acordo com o autor, a terapia gênica em cães pode servir de auxílio para erradicar a formação de inibidores e conseqüentemente melhorar os resultados do tratamento nos pacientes (FINN et al., 2010).

Giles, et al. (1984), comprovaram a grande incidência do desenvolvimento destes anticorpos. Dezesesseis cães da raça Schnauzer

miniatura, oriundos de cruzamentos entre um Schnauzer miniatura hemofílico e uma fêmea portadora, devidamente diagnosticados com hemofilia A, foram submetidos à terapia com crioprecipitado canino sempre que houvesse eventos hemorrágicos. Cinco destes animais desenvolveram anticorpos contra o fator VIII. A transfusão de crioprecipitado nestes casos mostrou-se hemostaticamente pouco efetiva.

Na medicina humana é crescente o uso de estratégias terapêuticas com base em células ou terapia gênica para a manutenção da doença, com a finalidade de evitar as armadilhas da terapia de reposição (SABATINO et al., 2011).

Alguns pacientes humanos com hemofilia desenvolvem inibidores de fator VIII que reagem apenas com o fator VIII exógeno. Nesses casos, faz-se uso da desmopressina, com a finalidade de estimular a liberação de fator VIII endógeno armazenado. Ao passo que em cães, a administração de desmopressina via subcutânea não produziu mudanças significativas na concentração de fator VIII (O'KELLEY et al. , 2009).

Stokol et al. (1997), realizou um estudo sobre a farmacocinética do FvW e FVIII. Os mesmos foram determinados após a infusão de PFC e crioprecipitado em pacientes com DvW e hemofilia A, respectivamente. A depuração corporal total e o volume de distribuição de FvW foram significativamente maiores para o PFC do que o crioprecipitado em animais com DvW. Esta tendência é semelhante em animais hemofílicos. Estas diferenças podem ser explicadas devido ao grande volume de PFC em relação ao crioprecipitado. Além disso, a dose, em termos de volume de produto derivado de sangue é dependente dos rendimentos do FvW e FVIII obtido durante a preparação do produto. Os rendimentos são influenciados pelos níveis dos fatores do doador e pela técnica de preparação do produto. Tais resultados indicam que a infusão de crioprecipitado é mais eficiente e prática para elevar a concentração de FvW e a atividade de FVIII para animais com DvW e hemofilia A.

O crioprecipitado não fornece o fator de coagulação IX para o tratamento da hemofilia B, que deve ser realizado com o PFC ou com o sobrenadante do crioprecipitado, conhecido como criopobre (BARR e MCMICHAEL, 2012).

2.1.3. Hipofibrinogenemia

Distúrbios ou deficiências de fibrinogênio são raramente relatados na medicina veterinária, sendo as formas adquiridas destes distúrbios mais comuns do que as hereditárias (BARR e MCMICHAEL, 2012).

A hipofibrinogenemia adquirida é observada principalmente nos casos de doenças hepáticas avançadas e coagulação intravascular disseminada (CID) (FECTEAU et al., 1997; STANWORTH et al., 2011). A deficiência hereditária de fibrinogênio pode ser causada por falta completa da produção (afibrinogenemia), produção reduzida de fibrinogênio (hipofibrinogenemia) ou pela produção anormal de fibrinogênio (disfibrinogenemia) (FECTEAU et al., 1997).

O tratamento da hipofibrinogenemia é raramente indicado em animais de produção devido ao custo envolvido, porém na medicina, a reposição da proteína com crioprecipitado é atualmente a terapêutica de preferência (FECTEAU et al., 1997; STANWORTH et al., 2011).

Na medicina relata-se a transfusão de plasma e frações como uma prática comum na unidade de terapia intensiva neonatal. A transfusão deve ser utilizada em casos de hipofibrinogenemia decorrente de episódios de sangramento ou como profilaxia para evitar tal complicação causada por CID, um problema relativamente comum em recém-nascidos em estados críticos de saúde, e frequentemente secundário, associado a um alto número de complicações como asfixia, acidose respiratória, 'síndrome do desconforto', infecção, enterocolite necrosante, aspiração de mecônio, hipotermia e trombose (MOTTA et al., 2011).

Os riscos causados pela transfusão do PFC e crioprecipitado podem ser relacionados à toxicidade por citrato, sobrecarga de volume ou transmissão de doenças infecciosas. Até o momento não existem estudos que relatam a incidência de lesão pulmonar aguda ou transmissão de bactérias pelo hemoderivado, já que o mesmo geralmente é rapidamente congelado evitando assim qualquer risco de contaminação (MOTTA et al., 2011).

A suplementação de fibrinogênio pode ser fornecida por transfusão de PFC, crioprecipitado e concentrado de fibrinogênio, produto liofilizado obtido a

partir do plasma humano. No entanto, o PFC apresenta várias limitações, incluindo um baixo teor de fibrinogênio, necessitando de um grande volume de transfusão e apresentando maior risco de complicações (FRANCHINI e LIPPI, 2012). Por essa razão, há preferência pela transfusão de crioprecipitado nos estados de hemorragia associada à deficiência adquirida de fibrinogênio (RAZOUK e REICHE, 2004; SILVA, 2009; STANWORTH et al., 2011).

2.2. Técnica de coleta

O local de punção deve ser tricotomizado e antissepsia procedida três vezes. A região de preferência para colheita é a veia jugular, na qual o fluxo de sangue é maior e há menor risco de formação de coágulos durante o procedimento, todavia em cães de maior porte a colheita pode ser feita por punção da veia cefálica (HELM e KNOTTENBELT, 2010).

2.3. Fracionamento para obtenção do crioprecipitado

O sangue fresco total obtido deve ser processado em até três horas após a coleta, para obtenção do PFC, que deverá pesar de 225 – 250 mL, sendo necessária ao menos uma bolsa satélite integrada à bolsa de plasma (bolsa tripla). O mesmo deve ser congelado em até seis horas após a coleta da bolsa, e deve ser submetido ao descongelamento lento na temperatura de 1 a 6°C. Este processo leva aproximadamente oito horas. Quando o plasma adquirir uma consistência viscosa, o crioprecipitado pode ser processado. O plasma deve ser centrifugado utilizando alta rotação (3500 g). Durante a centrifugação o crioprecipitado irá precipitar e aderir ao lado da bolsa, em seguida transfere-se 90% do sobrenadante para a bolsa satélite vazia. Esta bolsa recém completada é o crio pobre. A bolsa satélite com 10% do plasma é o crioprecipitado. Ambos devem ser congelados até uma hora após a preparação e armazenados à -18°C ou menos (MURPHY e PAMPHILON, 2009).

Todos os produtos de sangue devem ser rotulados com a data da coleta, nome do produto e data de validade. Informações adicionais tais como tipo de sangue e nome do doador também são úteis. Marcadores permanentes devem ser utilizados para rotulagem, para que esta informação não se perca durante a estocagem do produto. Antes de iniciar o processamento, a agulha deve ser removida e em seguida assegurar de que o sangue presente no manguito está devidamente anticoagulado (FELDMAN e SINK, 2008).

Para iniciar uma transfusão, independentemente de qual componente será utilizado, alguns padrões devem ser obedecidos para que ocorra uma transfusão segura e com qualidade, minimizando ao máximo os erros. Deve-se conferir a requisição do clínico sobre o produto requerido, identificar corretamente as amostras para depois liberar o produto ao seu destino (LANEVISCHI e WARDROP, 2001).

2.4. Armazenamento do crioprecipitado

Devido à instabilidade de alguns fatores de coagulação e a variabilidade das condições em que as amostras podem ser expostas após a coleta e processamento das mesmas, a quantificação e a estabilidade dos fatores plasmáticos, por vezes, causa dúvida (JOHNSTONE, et al. 1991).

Na medicina há estudos como o de Farrugia e Prowse (1985), realizado com o objetivo de estudar o efeito da temperatura de armazenamento do plasma, antes da preparação do crioprecipitado. O estudo foi baseado em dois grupos, sendo o primeiro com bolsas rapidamente congeladas em temperatura de -70°C e o segundo com bolsas lentamente congeladas em temperatura de -40°C . Este estudo demonstrou a importância do congelamento rápido. O crioprecipitado obtido do plasma lentamente congelado resultou em rendimentos reduzidos em relação à atividade do FVIII e concentração do fibrinogênio. Partículas de gelo foram observadas no plasma lentamente congelado logo no início do descongelamento. Este fenômeno foi acompanhado por perda dos fatores com o sobrenadante, sugerindo que a qualidade do crioprecipitado é dependente também do modo de congelamento. O FVIII sofreu uma queda acentuada, de aproximadamente 20%, devido sua

alta labilidade, demonstrando como a temperatura de armazenamento é uma variável importante principalmente quanto à atividade do FVIII.

Carlebjork et al. (1986) também demonstraram que o congelamento rápido afeta menos na qualidade do produto, a partir de bolsas de plasma congeladas em diferentes temperaturas, as bolsas de plasma em congelamento rápido sofreram menor perda de FVIII. Segundo Cardigan e Willianson (2009), o congelamento inicial do PFC deve resultar numa temperatura na região interna e central da bolsa menor que -30°C , fato não passível de ser obtido em freezers convencionais.

Na espécie canina a estabilidade do crioprecipitado congelado também merece atenção. Se ocorrer deterioração, consumo ou ativação dos fatores durante o período de armazenamento, quando o mesmo for descongelado será terapêuticamente menos eficaz. Em cães Stokol e Parry (1995) citam que o tempo de validade do hemocomponente varia entre seis meses e um ano, quando armazenados entre -30°C a -70°C .

Na medicina veterinária, Wardrop e Brooks (2001) realizaram um experimento com a finalidade de estudar a estabilidade dos fatores de coagulação e do FvW presentes no PFC canino. Quatro unidades de plasma obtidas de sete cães em intervalos mensais foram aleatoriamente designadas para quatro diferentes protocolos de armazenamento e congelamento: No primeiro tratamento as unidades foram armazenadas à temperatura de -30°C durante três meses, no segundo tratamento as unidades foram armazenadas a -30°C durante seis meses, no terceiro tratamento unidades foram armazenadas a -20°C durante seis meses, e no quarto tratamento unidades foram armazenadas a -30°C durante um ano. Foram anotadas as diferenças significativas entre os valores de pré-estocagem e pós-estocagem dos fatores VIII, IX, X e FvW. A diferença foi menos pronunciada para o PFC armazenado durante três meses a -30°C . De acordo com os autores, essas diferenças provavelmente ocorreram devido a deterioração dos fatores com o congelamento, descongelamento e armazenamento de um grande volume de plasma. Porém não há estudos relacionando o tempo e as temperaturas de armazenamento e de descongelamento com a estabilidade do crioprecipitado canino.

Da mesma forma, a estabilidade do crioprecipitado descongelado irá determinar o período para qual o produto permanece eficaz após seu descongelamento. Em algumas circunstâncias, o hemocomponente pode ser descongelado e recongelado para uso posterior. Por essa razão, Stokol e Parry (1995) avaliaram a estabilidade do FVIII e FvW presentes no crioprecipitado canino, simulando diversas condições que podem ocorrer durante o transporte e o uso do produto. Foram colhidas sete bolsas de sangue de greyhounds para produção de crioprecipitado que passaram por vários procedimentos de descongelamento, recongelamento e temperaturas de armazenamento. Os fatores foram estáveis ao recongelamento, ao descongelamento lento e ao armazenamento às temperaturas de -20°C e ambiente por um período de 24 horas. Porém, não foram avaliadas os efeitos das temperaturas de congelamento inicial ou do tempo de armazenamento.

Moser, et al. (1996) concluíram através de amostras de plasma de 26 cães adultos e 6 filhotes, sob diferentes condições, que a maioria das variáveis como idade do animal, lipemia, congelamento e descongelamento por pelo menos quatro vezes, uso de anticoagulante EDTA ou citrato de sódio, velocidades diferentes de centrifugação e armazenamento em temperatura ambiente por oito horas não alteraram a concentração do FvW. No entanto, a hemólise resultou em uma redução significativa na concentração de FvW plasmático do cão.

De acordo com Stokol e Parry (1995) os rendimentos de FVIII presente no crioprecipitado também são determinadas pela “crioprecipitabilidade” do fator plasmático do doador. Após a injeção de desmopressina, cães da raça greyhound tendem a alcançar níveis inferiores de FVIII e FvW quando comparado a cães mestiços, e oferecem rendimentos inferiores desses fatores no crioprecipitado.

Uma vez que a importância do crioprecipitado é conhecida, é necessário que se garanta a qualidade deste material para a realização da transfusão. Este pode ser avaliado quanto à concentração de fibrinogênio e FVIII para garantir que a preparação do componente é ideal. O mesmo não deve ser exposto a temperaturas de $30 - 37^{\circ}\text{C}$ por mais de 15 minutos (por minimizar o

fator VIII) e deve ser transfundido imediatamente após o descongelamento (FELDMAN e SINK, 2008).

Objetivos

3. OBJETIVOS

- Avaliar os níveis de fator VIII, fator de von Willebrand e fibrinogênio presentes no crioprecipitado canino em diferentes temperaturas de congelamento, a fim de determinar a influência da temperatura inicial de congelamento sobre a qualidade do hemocomponente.
- Avaliar os níveis de fator VIII, fator de von Willebrand e fibrinogênio presentes no crioprecipitado canino em diferentes períodos de armazenamento, a fim de determinar a influência da estocagem sobre a qualidade do hemocomponente.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Experimento

4.1.1. Seleção dos animais

No projeto foram utilizados 20 cães. Todos os animais apresentaram peso mínimo de 25 quilos, idade entre um e oito anos e diversas raças. Apresentavam-se clinicamente hígidos e com os resultados dos exames laboratoriais dentro dos valores de referência (hemograma, ureia, creatinina, ALT, FA, GGT, proteínas totais e albumina). Incluindo PCR negativo para *Ehrlichia* sp e, quando autorizado pelo proprietário, sorologia negativa para *Leishmania major*. Todos os animais utilizados possuíam vacinação anual e vermifugação semestrais atualizadas, sem histórico de uso de medicamento nos últimos dois meses.

4.1.2. Delineamento experimental

Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo I- 10 unidades de plasma foram congeladas a - 80°C, antes da obtenção do crioprecipitado e Grupo II- 10 unidades de plasma foram congeladas a - 20°C, antes da obtenção do crioprecipitado. Vinte e quatro horas após o congelamento, estas foram submetidas ao procedimento de extração do crioprecipitado, alíquotas de 5 mL foram separadas em criotubos. O crioprecipitado recém-obtido foi considerado o momento zero, os mesmos foram armazenados a -80°C até o momento de análise. Outra alíquota de cada unidade, de ambos os grupos, foram armazenadas a - 20°C por um período de seis meses. Fazendo destas o momento um. O crioprecipitado das bolsas dos dois grupos foram submetidos à determinação do TP, TTPA, FVIII, fibrinogênio e FvW das alíquotas referentes ao momento zero e momento um.

4.1.3. Colheita das bolsas de sangue

Para a colheita foram utilizadas bolsas triplas (JP Indústria Farmacêutica[®]), sendo a bolsa principal com capacidade para 450 mL de sangue total. As colheitas foram realizadas por venopunção da jugular, após tricotomia e antisepsia local, utilizando o método gravitacional, com homogeneização mecânica (Hemolight plus – Fresenius kabi[®]).

4.1.4. Obtenção do crioprecipitado

Para cada unidade de bolsa, o sangue fresco total obtido foi processado em até três horas após a coleta. A bolsa tripla foi centrifugada em centrífuga refrigerada (ROTANTA 460 RS - Hettich) a 1.000g por 14 minutos a 4°C para obtenção do plasma fresco, que foi transferido para a bolsa satélite e congelado a -80°C (Grupo I) ou a -20°C (Grupo II). Após o congelamento inicial por 24 horas, o PFC foi lentamente descongelado em uma geladeira específica para banco de sangue (Hemo - MBR-304GR) na temperatura de 4 a 6°C até adquirir uma consistência viscosa (aproximadamente 10 horas). Em seguida, o PFC foi centrifugado utilizando alta rotação (3.500g) por 10 minutos a 4°C, permitindo a precipitação e aderência do crioprecipitado na parede da bolsa. Após o processamento, foi transferido 90% do sobrenadante do PFC para a bolsa satélite vazia. A bolsa com menor volume foi delicadamente homogeneizada até a completa dissolução do crioprecipitado aderido, resultando em um produto mais turvo e viscoso. Uma alíquota de aproximadamente 5 mL da bolsa de crioprecipitado foi separada em criotubos para análise da amostra pré-estocagem (momento zero) e momento um (após seis meses de armazenamento), sendo as alíquotas referentes ao Grupo I congeladas à -80°C e ao Grupo II à -20°C, porém ambas estocadas a -20°C.

4.1.5. Mensuração do TP, TTPA, FVIII e fibrinogênio

As mensurações de TP e TTPA foram realizadas a partir dos kits da marca Clot[®], enquanto as dosagens de FVIII e fibrinogênio foram realizadas a

partir dos kits da marca Helena®. Todas as mensurações foram realizadas com o auxílio do coagulômetro Clotimer® de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante.

4.1.6. Determinação do FvW

As dosagens das amostras de crioprecipitado foram realizadas pelo método de ELISA direto, com anticorpo anti-FvW canino, em placas específicas para leitura em ELISA.

Segue abaixo o protocolo testado e escolhido para as dosagens do FvW dos momentos zero e um.

Primeiramente foi realizada a sensibilização da placa de alta afinidade (ELISA) com anticorpo primário (policlonal anti- FvW) em tampão carbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 por 16 horas (overnight) a 4°C. O bloqueio foi realizado com BSA 1% diluído em tampão fosfato salina (PBS), por uma hora a 37°C. Em seguida, aplicamos as amostras e a curva padrão em concentrações adequadas e incubamos a placa por duas horas a 37°C. Aplicamos o anticorpo secundário (anti-FvW conjugado com biotina), diluído em PBS contendo BSA a 1%, incubando a placa novamente por uma hora a 37°C. Adicionamos streptoavidina – HRPO (peroxidase) e o substrato (OPD) em tampão citrato de sódio e água oxigenada a 3%. A placa foi mantida a temperatura ambiente, protegida da luz até o desenvolvimento da coloração, por aproximadamente uma hora. Uma lavagem com PBS Tween 20 foi realizada entre todas as etapas.

4.2. Análise estatística

Inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada e não foram encontrados desvios de um padrão normal de distribuição. Para cada grupo, o teste T pareado foi usado para comparar a média de cada parâmetro entre os momentos estudados. O teste T para amostras independentes foi utilizado para comparar a média de cada parâmetro entre os grupos, dentro de cada momento estudado. Como houve diferenças entre as médias de alguns

parâmetros no momento inicial, um teste adicional (teste T) foi realizado para comparar a diferença (aumento ou diminuição) média entre momento um e momento zero, entre os tratamentos. A análise estatística foi realizada com o procedimento PROC TTEST (SAS Institute, 2011) e significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

A maior parte dos animais utilizados neste projeto foi oriunda de proprietários voluntários. Eles foram julgados quanto ao estado de higidez por meio de avaliação clínica, hemograma, exames bioquímicos, PCR para *Ehrlichia* sp e sorologia para *Leishmania major*. Segue na tabela 1 a média dos resultados laboratoriais obtidos dos vinte cães utilizados neste trabalho.

Tabela 1. Média dos resultados laboratoriais obtidos nos exames de triagem dos cães doadores e valores de referência hematológicos (Jain, 1993) e bioquímicos (Kaneko, 1997).

		Valores de referência
Hemácias/ μ L	6.485.000	5,5 – 8,5 ($\times 10^6$)
Hemoglobina (g/dL)	15,9	12 – 18
Hematócrito (%)	43,3	37 – 55
Plaquetas/ μ L	247.985	200.000 – 500.000
Leucócitos totais/ μ L	10.630	6,0 – 17,0 ($\times 10^3$)
Ureia (mg/dL)	34,0	21,4 – 59,9
Creatinina (mg/dL)	1,0	0,5 – 1,5
ALT (UI/L)	46,0	21,0 – 73,0
FA (UI/L)	52,0	20,0 – 156,0
GGT (UI/L)	5,0	1,2 – 6,4
Proteínas totais (g/dL)	7,0	5,4 – 7,1
Albumina (g/dL)	3,0	2,6 – 3,3
Globulina (g/dL)	4,0	2,7 – 4,4

Com o objetivo de avaliar o protocolo de processamento utilizado e a qualidade do hemocomponente foram realizadas dosagens do FvW, FVIII e fibrinogênio do PFC de três doadores, antes e após o processamento do crioprecipitado (Tabela 2).

Tabela 2. Dosagens do Plasma fresco congelado (PFC) e Crioprecipitado (Crio) de três doadores. Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio.

	Doador 1		Doador 2		Doador 3	
	PFC	CRIO	PFC	CRIO	PFC	CRIO
FvW (μ g/mL)	0,360	6,867	0,498	6,021	0,320	5,761
FVIII (%)	72,66	266,24	80,69	109,13	73,74	110,52
Fibrinogênio (mg/dL)	191	276	154	339	158	332

Segue abaixo a média de concentração dos doadores pré e pós-processamento do crioprecipitado em gráfico, em relação ao FvW, FVIII e fibrinogênio (Figuras 1, 2 e 3).

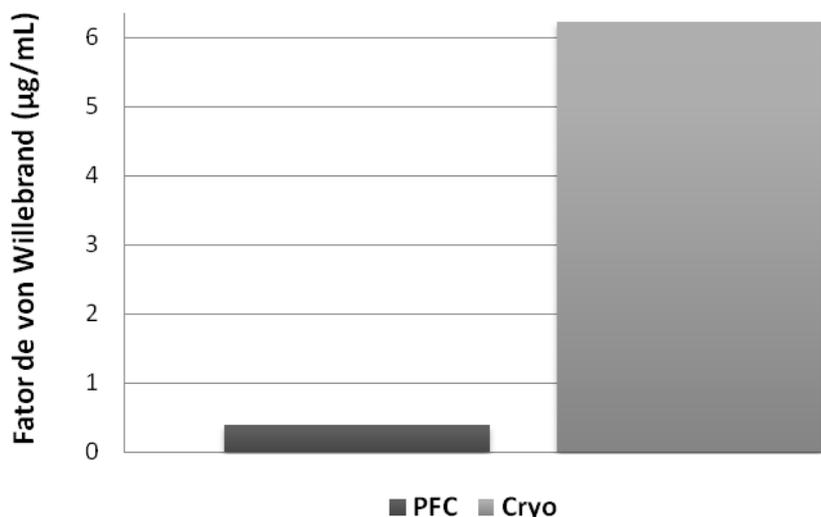


Figura 1. Média da concentração de Fator de von Willebrand presente no PFC e após a obtenção do crioprecipitado.

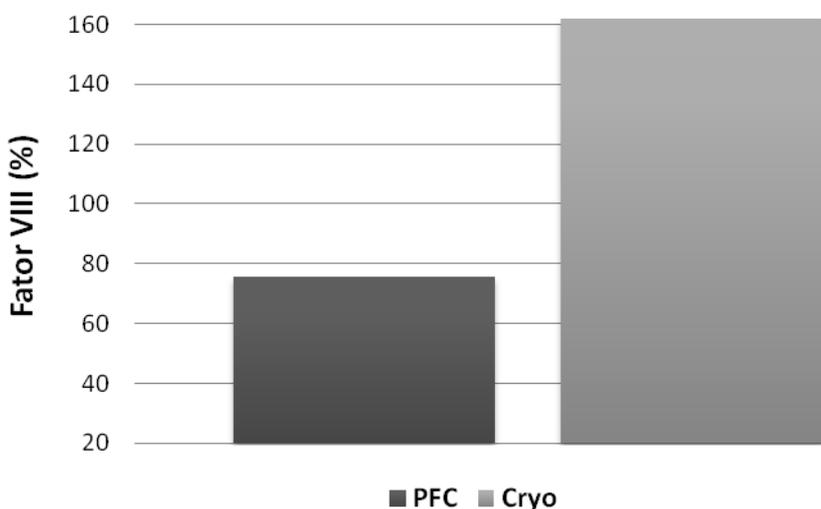


Figura 2. Média dos níveis de atividade do Fator VIII presente no PFC e após a obtenção do crioprecipitado.

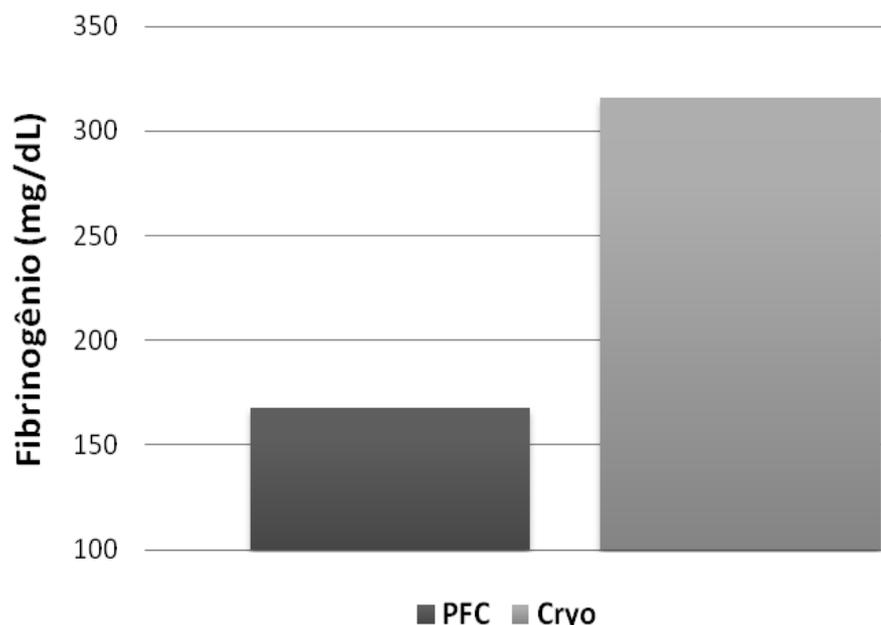


Figura 3. Média da concentração de Fibrinogênio presente no PFC e após a obtenção do crioprecipitado.

Ao se comparar os momentos dentro dos grupos I (congelamento a -80°C) e II (congelamento a -20°C), observa-se uma redução significativa ($p < 0,05$) do momento zero para o momento um, dos fatores de von Willebrand e VIII, em ambos os grupos, e do fibrinogênio apenas no grupo I, além do prolongamento estatisticamente significativo das determinações de TTPA. Porém, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração de fibrinogênio entre momentos no grupo II e do TP em ambos os grupos (Tabela 2 e figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

Na comparação entre os grupos nos momentos zero (pré-armazenamento) e um (após seis meses de armazenamento à -20°C), nenhum dos parâmetros apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), com exceção do TP em ambos os momentos. O mesmo apresentou valor superior em ambos os momentos do grupo I (Tabela 2).

Tabela 3. Médias e desvios-padrões das variáveis hemostáticas Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio (Fib); Tempo de protrombina (TP); Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) das amostras dos grupos I (congelamento a -80°C) e II (congelamento a -20°C) nos diferentes momentos e grupos.

	GRUPO I		GRUPO II	
	M0	M1	M0	M1
FvW ($\mu\text{g/mL}$)	$3,464 \pm 2,771^{aA}$	$2,321 \pm 1,813^{bA}$	$4,299 \pm 2,323^{aA}$	$2,727 \pm 1,428^{bA}$
FVIII (%)	$94,45 \pm 34,77^{aA}$	$68,63 \pm 20,52^{bA}$	$147,76 \pm 95,79^{aA}$	$69,05 \pm 36,81^{bA}$
Fib (mg/dL)	$415,5 \pm 102,0^{aA}$	$289,1 \pm 125,2^{bA}$	$347,6 \pm 90,6^{aA}$	$313,2 \pm 89,3^{aA}$
TP (s)	$8,74 \pm 0,87^{aA}$	$10,13 \pm 3,12^{aA}$	$7,03 \pm 0,20^{aB}$	$7,84 \pm 1,16^{aB}$
TTPA (s)	$12,88 \pm 1,63^{aA}$	$16,3 \pm 2,27^{bA}$	$13,43 \pm 1,70^{aA}$	$15,78 \pm 2,37^{bA}$

Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes entre os momentos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

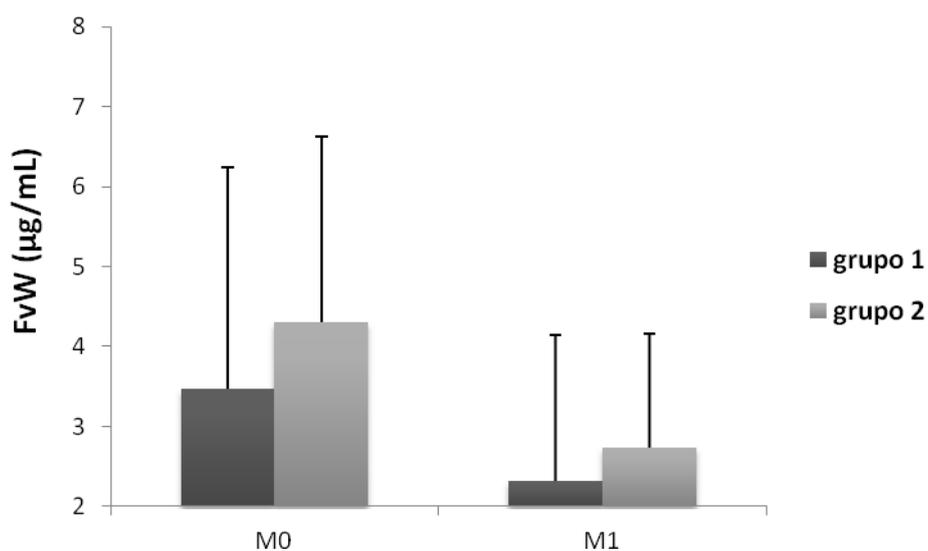


Figura 4. Médias e desvio padrão da concentração do Fator de von Willbrand presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

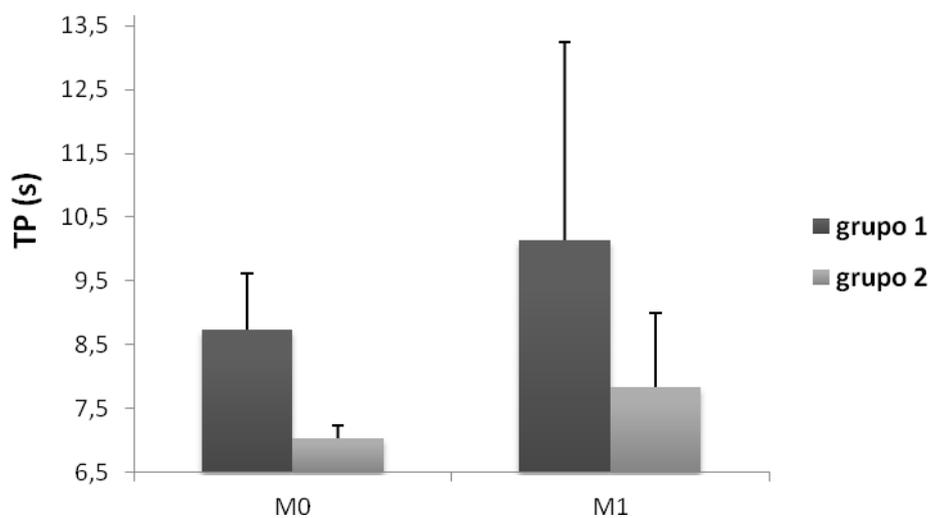


Figura 5. Médias e desvio padrão do tempo de protrombina do crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

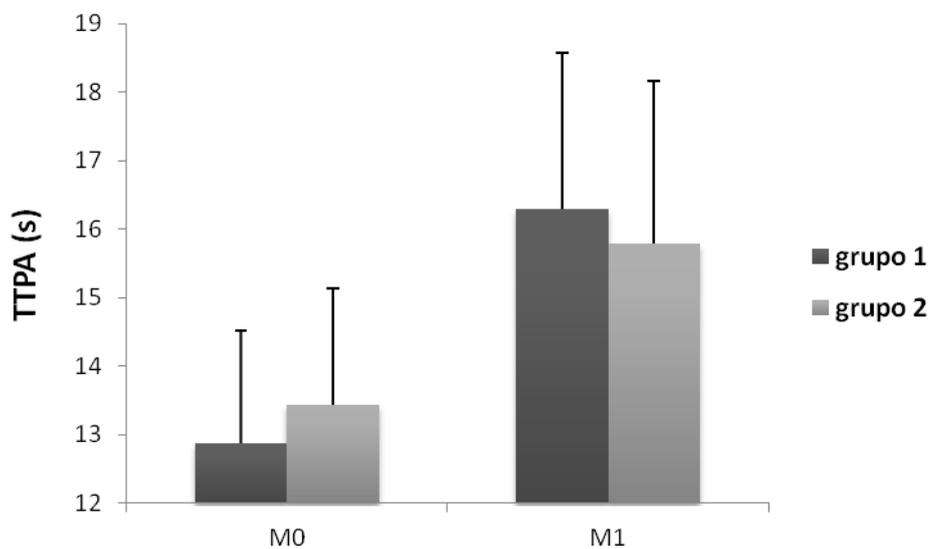


Figura 6. Médias e desvio padrão do tempo de tromboplastina parcial ativada do crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

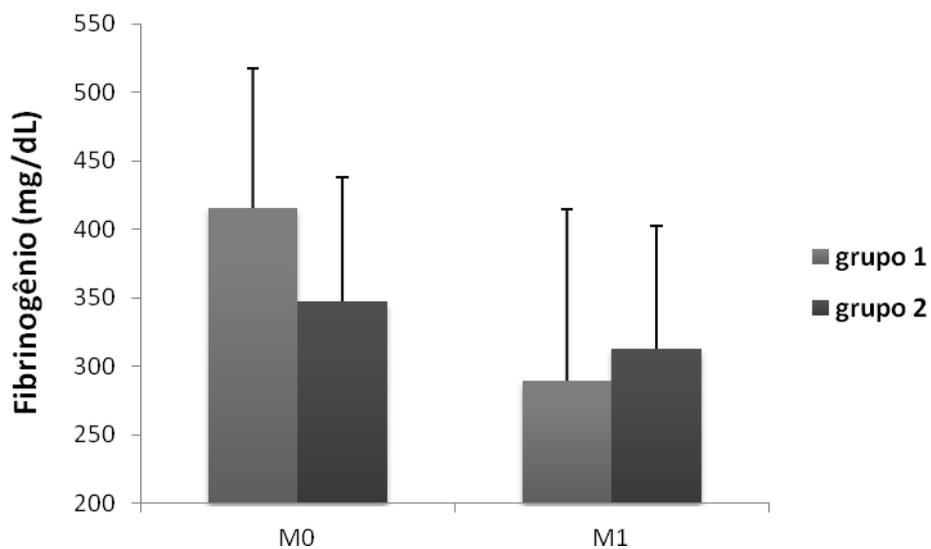


Figura 7. Médias e desvio padrão da concentração de Fibrinogênio presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

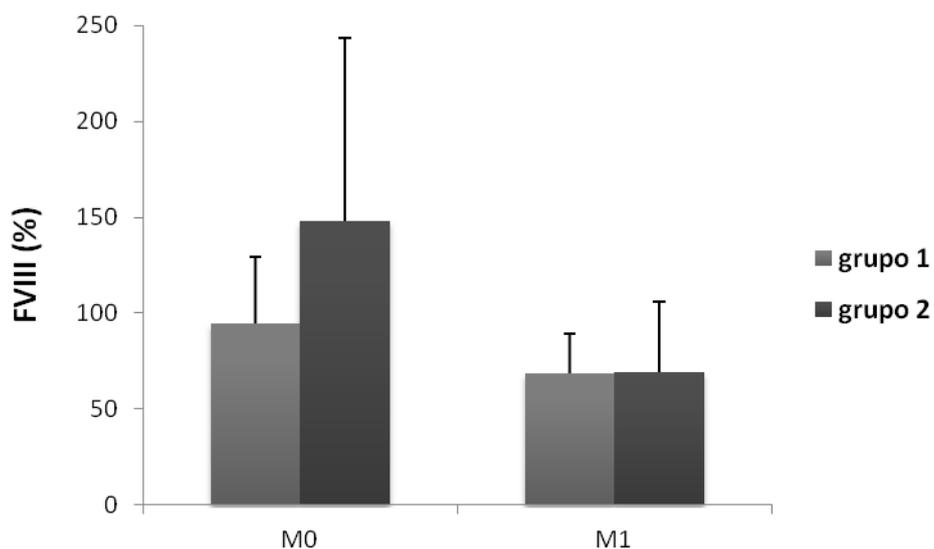


Figura 8. Médias e desvio padrão dos níveis de atividade do Fator VIII presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

Comparando as médias das diferenças entre momento um e momento zero para cada grupo experimental não foi observado diminuição ou aumento significativo em nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 4), ou seja, não houve variação significativa entre os tratamentos.

Tabela 4. As médias e desvios-padrões das diferenças entre momento um e momento zero para cada grupo experimental do Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio (Fib); Tempo de protrombina (TP); Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).

	Grupo I	Grupo II
FvW (µg/mL)	-1,143 ± 1,000 ^a	-1,571 ± 0,901 ^a
Fibrinogênio (mg/dL)	-126,400 ± 109,088 ^a	-34,400 ± 111,366 ^a
FVIII (%)	-25,819 ± 35,266 ^a	-78,707 ± 101,379 ^a
TP (s)	1,390 ± 2,699 ^a	0,810 ± 1,134 ^a
TTPA (s)	3,420 ± 2,088 ^a	2,350 ± 2,339 ^a

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

Discussão

6. DISCUSSÃO

Todos os animais utilizados para o projeto apresentavam-se clinicamente hígidos e com os resultados dos exames laboratoriais (hemograma e bioquímico) dentro dos padrões de normalidade, como apresentado na tabela 1.

Sabe-se que diversas condições podem afetar os fatores de coagulação presentes no crioprecipitado, especialmente o FVIII. Incluindo a técnica, o tipo de anticoagulante, temperatura, volume plasmático inicial, variáveis do doador, o descongelamento do hemocomponente e mais frequentemente estudado o congelamento inicial plasmático (MANSOOR et al., 2007).

O efeito da temperatura de congelamento do plasma e suas frações e sua influência na qualidade do produto vem sendo frequentemente estudado na medicina. Apesar do crescente uso destes na medicina veterinária, as condições de armazenamento recomendadas para o crioprecipitado canino, têm sido oriundas de estudos com o hemocomponente humano. Atualmente, há estudos avaliando a estabilidade dos fatores em diferentes protocolos de armazenamento no PFC canino. Contudo, existem relativamente poucos estudos avaliando a estabilidade dos fatores no crioprecipitado, relacionando a influência da temperatura de congelamento inicial em conjunto com um período prolongado de armazenamento.

Os volumes das unidades de crioprecipitado obtidos apresentaram-se dentro do valor preconizado por Stokol e Parry (1998), com volume total de 30-40 mL, retirando-se aproximadamente 90% do volume plasmático total. O protocolo de processamento do hemocomponente também foi baseado no estudo dos mesmos autores.

Para garantir o protocolo utilizado e a qualidade do hemocomponente foram realizadas dosagens do FvW, FVIII e fibrinogênio do PFC de três doadores, antes e após o processamento do produto (Tabela 2). Os mesmos apresentaram concentrações significativamente maiores dos fatores e fibrinogênio no crioprecipitado. Assim como demonstrou Stokol e Parry (1995), estes resultados reafirmam a crioprecipitação como um meio eficaz para concentrar os fatores.

Com isso, o trabalho também contribui demonstrando que a crioprecipitação pode se mostrar mais eficaz do que o PFC, já que o mesmo apresenta valores consideravelmente superiores de fatores em um volume relativamente pequeno de plasma, minimizando o risco de reações transfusionais e sobrecarga de volume desnecessária.

A atividade do FVIII e a concentração de FvW entre os momentos zero e um em ambos os grupos, e a concentração de fibrinogênio entre os momentos zero e um no grupo I, apresentaram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$), provavelmente devido a deterioração dos fatores com o congelamento, armazenamento e descongelamento. Wardrop e Brooks (2001) também demonstraram decréscimo de fatores pós-estocagem em um estudo com PFC canino, no qual foi observada diferença significativa em tratamentos variados de temperatura e tempo de estocagem.

É sabido que o FVIII possui grande labilidade (CALERBJORK et al. 1986), o que justifica seu decréscimo nas amostras de crioprecipitado após seis meses de armazenamento. Contudo a deterioração dos fatores também pode estar relacionada ao volume do hemocomponente estocado. O uso de pequenos volumes permite um rápido congelamento e descongelamento, causando assim menor desnaturação de proteínas. Sendo importante ressaltar, que a maioria dos trabalhos que demonstraram a possível manutenção da estabilidade dos fatores em diferentes protocolos de armazenamento e congelamento, foram realizados em alíquotas com volume inferior a 0,5 mL.

As determinações do TP e TTPA aumentaram entre os momentos. Sendo que, apenas o TP em ambos os grupos não obteve um aumento significativo, demonstrando ser mais resistente ao efeito da temperatura e ao longo tempo de armazenamento que as demais variáveis.

Outros estudos que avaliaram o TP e o TTPA em amostras plasmáticas de cães, sob diferentes protocolos de armazenamento, demonstraram encurtamento significativo do TTPA (BATEMAN et al, 1999; GREENE e BECK, 1980). Devido à complexidade da cascata intrínseca de coagulação e as múltiplas interações possíveis que permitem a ativação da mesma, torna-se difícil delinear um estudo capaz de determinar com precisão a causa das alterações do TTPA. Ainda assim, no nosso trabalho a justificativa mais

plausível para o prolongamento desta variável, seria o decréscimo de fatores presentes nas amostras.

É importante ressaltar que apesar do decréscimo significativo dos fatores e prolongamento do TTPA entre os momentos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Em relação aos grupos dentro de cada momento, quase nenhum parâmetro apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), indicando que estes apresentaram níveis de fatores e TTPA semelhantes nos momentos. Com exceção do TP que apresentou diferença significativa em ambos os momentos. Contudo, esta complicação não é proveniente da deficiência de fatores, já que os mesmos não apresentaram diferença estatística no momento zero. E também não é justificada pelo tempo de armazenamento devido sua continuidade no momento zero e momento um, ocorrendo possivelmente devido uma variação pré-existente antes do processamento do crioprecipitado.

Em relação aos diferentes tratamentos, a variação entre eles não apresentou diferença significativa. Indicando que a temperatura de congelamento inicial não influenciou na estabilidade dos fatores após seis meses de armazenamento à -20°C . Assim como o trabalho de Farrugia e Prowse (1985), o nosso estudo demonstrou que a temperatura de congelamento inicial não interferiu na estabilidade dos fatores, além das determinações de TP e TTPA. Contudo, de acordo com os mesmos autores, o congelamento inicial rápido pode gerar um rendimento melhor de FVIII.

A constatação de que a temperatura de -20°C é adequada para o armazenamento do hemocomponente é de suma importância, pois torna o procedimento mais viável e menos dispendioso do que o armazenamento em temperaturas mais baixas.

Considerando que o tempo de armazenamento é capaz de deteriorar e prejudicar a qualidade do crioprecipitado, é importante avaliar a concentração de fibrinogênio e atividade do FVIII antes de utilizá-lo para fins terapêuticos, a fim de otimizar o produto e garantir a qualidade do material.

Ainda são necessários mais estudos a respeito do hemocomponente em questão, não apenas sobre a manutenção da estabilidade dos fatores

presentes no crioprecipitado canino, como em relação a sua efetividade terapêutica.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados, e nas condições em que o experimento foi realizado, podemos concluir que:

- O congelamento inicial à -80°C não apresentou diferença em relação ao -20°C na estabilidade do FvW, FVIII e fibrinogênio, indicando que o decréscimo dos mesmos após seis meses de armazenamento à -20°C ocorre independente da temperatura de congelamento inicial.
- O armazenamento por seis meses à -20°C mostrou-se capaz de deteriorar os fatores e prolongar o TTPA, prejudicando a qualidade do hemocomponente.

Bibliografia

8. BIBLIOGRAFIA

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

ARYA, R. C.; WANDER, G.; GUPTA, P. Blood component therapy: Which, when and how much. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, p. 278-284, 2011.

BARR, J. W.; MCMICHAEL, M. Inherited Disorders of Hemostasis in Dogs and Cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 27, p. 53-58, 2012.

BATEMAN, S. W.; MATHEWS, K. A.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; LUMSDEN, J. H.; JOHNSTONE, I. B. Evaluation of the Effect of storage at -70°C for six months on hemostatic function testing in dogs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, p. 216-220, 1999.

BROWN, D.; VAP, L. Princípios sobre transfusão sanguínea e reação cruzada. In: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, ed. 1, São Paulo: ROCA, cap. 15, p. 188-198, 2007.

BURGESS, H. J.; WOODS, J. P.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; WOOD, R. D. Use of a questionnaire to predict von Willebrand disease status and characterize hemorrhagic signs in a population of dogs and evaluation of a diagnostic profile to predict risk of bleeding. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 73, p. 241-251, 2009.

CARDIGAN, R.; WILLIANSO, L.M. Production and storage of blood components. In: MURPHY, M.F.; PAMPHILON, D.H. *Practical Transfusion Medicine*, ed. 3, Oxford: Willey-Blackwell, Cap. 21, p. 209-224, 2009.

CARLEBJORK, G.; BLOMBACK, M.; PIHLSTEDT, P. Freezing of plasma and recovery of factor VIII. *Transfusion*, v. 26, p.159-162, 1986.

CHIARAMONTE, D. Blood-component therapy: Selection, administration and monitoring. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Filadélfia, v. 19, n. 2, p. 63-67, 2004.

DAY, M. J.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. D. *Manual of Canine and Feline haematology and Transfusion Medicine*. British Small Animal Veterinary Association, p. 289-290, 2000.

DALMOLIN, M. L.; OLIVEIRA S. T.; PEDRALLI, V.; TOURRUCÔO, A. C.; LACERDA, L. A.; GONZALEZ, F. H. D. *Hemofilia canina - Relato de caso*. Salão de iniciação científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

FARRUGIA, A.; PROWSE, C. Studies on the procurement of blood coagulation factor VIII: effects of plasma freezing rate and storage conditions on cryoprecipitate quality. *Journal of Clinical Pathology*, v. 38, p. 433-437, 1985.

FECTEAU, G.; ZINKL, J. G.; SMITH, B. P.; O'NEIL, S.; SMITH, S.; KLOPFER, S. Dysfibrinogenemia or afibrinogenemia in a Border Leicester lamb. *Canadian Veterinary Journal*, v. 38, p. 443-444, 1997.

FELDMAN, B. F.; SINK, C. A. Blood Product Overview. *Practical Transfusion Medicine for the Small Animal Practitioner*, p. 19-21, 2008.

FINN, J. D.; OZELO, M. C.; SABATINO, D. E.; FRANCK, H.W.G.; MERRICKS, E. P.; CRUDELE, J. M.; ZHOU, S.; KAZAZIAN, H.H.; LILLICRAP, D.; NICHOLS, T. C.; ARRUDA, V. R. Eradication of neutralizing antibodies to factor VIII in canine hemophilia A after liver gene therapy. *The American Society of Hematology*, p. 5842-5848, 2010.

FRANCHINI, M.; LIPPI, G. Fibrinogen replacement therapy: a critical review of the literature. *Blood Transfusion*, v. 10, p. 23-27, 2012.

GILES, A. R.; TINLIN, S.; HOOGENDOORN, H.; GREENWOOD, P.; GREENWOOD, R. Development of factor VIII:C antibodies in dogs with hemophilia A (factor VIII:C deficiency). *Blood Journal*, v. 63, p. 451-456, 1984.

GREENE, C. E.; BECK, B. B. Coagulation properties of fresh-frozen canine plasma during prolonged storage. *American Journal of Veterinary Research*, p.147-150, 1980.

HALLENBECK, J. M.; FURLOW, T. W.; GRALNICK, H. R. Influence of factor VIII/von Willebrand factor protein (FVIII/vWF) and FVIII/vWF-poor cryoprecipitate on post-ischemic microvascular reperfusion in the central nervous system. *Journal of the American Heart Association*, v. 12, p. 93-97, 1981.

HELM, J.; KNOTTENBELT, C. Blood transfusions in dogs and cats 1. Indications. *In Practice*, London, v. 32, p. 184-189, 2010.

JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*, Philadelphia, 1993.

JOHNSON, G. S.; TURRENTINE, M. A.; KRAUS K. H. Canine von Willebrand's Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 18: 195-229, 1988.

JOHNSTONE, I. B. Desmopressin enhances the binding of plasma von Willebrand factor to collagen in plasmas from normal dogs and dogs with type I von Willebrand's disease. *Canadian Veterinary Journal*, v. 40, p. 645-648, 1999.

JOHNSTONE, I. B.; KEEN, J.; HALBERT, A.; CRANE, S. Stability of factor VIII and von Willebrand factor in canine blood samples during storage. *Canadian Veterinary Journal*, v. 32, p. 173-175, 1991.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*, ed. 5, California, 1997.

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

LACERDA, L. A. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: González, F. H. D., Santos, A. P. *Anais do II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil*, p. 62-81, 2005.

LANEVISCHI, A.; WARDROP, K. J. Principles of transfusion medicine in small animals. *Canadian Veterinary Journal*, v. 42, p. 447-454, 2001.

LEWIS, J. H.; SPERO, J. A.; HASIBA, U. A hemophiliac dog colony: genetic studies and coagulation findings in hemophiliac and normal dogs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 75, n° 2, p. 147-151, 1982.

MANSOOR, S. S.; AL-MUDALLAL, S. S.; HASSB, M. F. Evaluation of cryoprecipitate as part of the quality assurance in the Iraqi National Blood Transfusion Centre. *Journal of Faculty Medicine Baghdad*, v. 50, 2008.

MATTOSO, C. R. S.; TAKAHIRA, R. K.; BEIER, S. L.; JÚNIOR, J. P. A.; CORRENTE, J. E. Prevalence of von Willebrand disease in dogs from São Paulo State, Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, janeiro, p. 55-60, 2010.

MOSER, J.; MEYERS, K. M.; MEINKOTH, J. H.; BRASSARD, J. A. Temporal variation and factors affecting measurement of canine von Willebrand factor. *American Journal of Veterinary Research*, setembro, v. 57, p. 1288-93, 1996.

MOTTA, M.; VECCHIO, A. D.; RADICIONI, M. Clinical use of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in neonatal intensive care unit. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 24, p. 129-131, 2011.

MURPHY, M. F.; PAMPHILON, D. H. *Practical Trasfusion Medicine*. ed. 3, London, UK, p. 345, 2009.

O'KELLEY, B. M.; WHELAN, M. F.; BROOKS, M. B. Factor VIII inhibitors complicating treatment of postoperative bleeding in a dog with hemophilia A. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 19, p. 381-385, 2009.

OLSEN, E. H. N.; MCCAIN, A. S.; MERRICKS, E. P.; FISCHER, T. H.; DILLON, I. M.; RAYMER, R. A.; BELLINGER, D. A.; FAHS, S. A.; MONTGOMERY, R. R.; KEITH, J. C.; SCHAUB, R. G.; NICHOLS, T. C. Comparative response of plasma VWF in dogs to up-regulation of VWF Mrna by interleukin-11 versus Weibel-Palade body release by desmopressin (DDAVP). *Blood Journal*, v. 102, p. 435-441, 2003.

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

RAZOUK, F. H.; REICHE, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, p. 126-134, 2004.

SABATINO, D. E.; LANGE, A. M.; ALTYNOVA, E. S.; SARKAR, R.; ZHOU, S.; MERRICKS, E. P.; FRANCK, H. G.; NICHOLS, T. C.; ARRUDA, V. R.; KAZAZIAN JR, H. H. Efficacy and Safety of Long-term Prophylaxis in Severe Hemophilia A Dogs Following Liver Gene Therapy Using AAV Vectors. *The American Society of Gene & Cell Therapy*, v. 19, p. 442-449, 2011.

SADLER, J. E.; MATSUSHITA, T.; DONG, Z.; TULEY E. A.; WESTFIELD, L. A. Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. *Thrombosis Haemostasis*, p. 161-166, 1995.

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

SILVA, E.; PEREIRA, A. MACHADO, F.; SALOMÃO, R.; LUTKE, C. Sepsis: Uso de Hemoderivados. *Instituto Latino Americano de Sepsis*, p. 206-212, 2009.

STANWORTH, S. J.; WALSH, T. S.; PRESCOTT, R. J.; LEE, R. J.; WATSON, D. M.; WYNCOLL, D. A national study of plasma use in critical care: clinical indications, dose and effect on prothrombin time. *Critical Care*, p. 2-10, 2011.

STOKOL, T.; PARRY, B. Efficacy of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in dogs with von Willebrand's disease or hemophilia A. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, p. 84-92, 1998.

STOKOL, T.; PARRY, B. W. Stability of von willebrand factor and factor VIII in canine cryoprecipitate under various conditions of storage. *Research in Veterinary Science*, p. 152-155, 1995.

STOKOL, T.; TREPANIER, L.; PARRY, B. W.; FINNIN, B. C. Pharmacokinetics of von Willebrand factor and factor VIII in canine von Willebrand Disease and haemophilia A. *Research in Veterinary Science*, v. 63, p. 23-27, 1997.

WARDROP, K. J.; BROOKS, M. B. Stability of hemostatic proteins in canine fresh frozen plasma units. *Veterinary Clinical Pathology*, p. 91-95, 2001.

Trabalho Científico

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

ESTABILIDADE DO FATOR DE VON WILLEBRAND E FATOR VIII NO CRIOPRECIPITADO CANINO EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE ARMAZENAMENTO

STABILITY OF VON WILLEBRAND FACTOR AND FACTOR VIII IN THE CANINE CRYOPRECIPITATE IN DIFFERENT STORAGE PROTOCOLS

Claudia Zeferino Garcia^{1*}
Thays de Campos Trentin¹
Daniele Silvano Gonçalves¹
Regina Kiomi Takahira²

Claudia Zeferino Garcia, claudia_zeferino@hotmail.com*

Entidade financiadora: FAPESP (2012/15219-5; 2012/13677-6)

1. Mestranda do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu
2. Professora Adjunta do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu

RESUMO

Por conter altas concentrações de fator VIII (FVIII), fator de von Willebrand (FvW) e fibrinogênio, a transfusão de crioprecipitado é uma terapia utilizada principalmente em pacientes que apresentam Doença de von Willebrand, Hemofilia A (deficiência do FVIII), ou pacientes que sofrem de hipo ou disfibrinogenemia. Com o objetivo de avaliar a viabilidade do crioprecipitado canino em diferentes protocolos de congelamento e armazenamento foram avaliados dois grupos compostos de 10 unidades de crioprecipitado canino (n=20). Após a centrifugação das bolsas de sangue, o plasma fresco foi congelado a -80°C (grupo I) e a -20°C (grupo II). Vinte e quatro horas após o congelamento das bolsas, estas foram submetidas ao procedimento de extração do crioprecipitado. Os crioprecipitados das bolsas dos dois grupos foram submetidos à determinação do TP, TTPA, FVIII, FvW e fibrinogênio, no momento zero e após seis meses de estocagem. Para a realização das coletas, foram utilizadas bolsas sanguíneas triplas de plástico, com anticoagulante CPDA-1, sendo a bolsa principal com capacidade para 450 mL de sangue total (JP Indústria Farmacêutica®). Após o crioprecipitado devidamente pronto, uma alíquota de aproximadamente 5 mL da bolsa de crioprecipitado foi separada em eppendorfs para análise da amostra pré-estocagem e seis meses pós estocagem. As amostras obtidas em cada momento foram congeladas à -80°C até o momento de processamento. Quanto aos resultados, ambos os grupos obtiveram decréscimo significativo dos fatores e prolongamento do TTPA ($p<0,05$) das amostras de crioprecipitado após seis meses de armazenamento. Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Portanto, a temperatura de congelamento inicial não influenciou na estabilidade dos fatores durante a estocagem.

Palavras-chave: Cão; Fator de von Willebrand; Fator VIII; Plasma sanguíneo; Sangue – coleta e preservação.

ABSTRACT

Since cryoprecipitate contains high concentrations of factor VIII (FVIII), von Willebrand factor (vWf) and fibrinogen, transfusion of this hemocomponent is a therapy mainly used in patients with von Willebrand disease, Hemophilia A (FVIII deficiency), or who suffer from hypo/dysfibrinogenemia. Studies have demonstrated that the protocols of freezing and storage of cryoprecipitate affect the product quality as well as the viability of these factors. In order to evaluate the canine cryoprecipitate viability in different freezing and storage protocols, two groups containing 10 units of canine cryoprecipitate (n=20) were evaluated. Following the blood centrifugation, the fresh plasma was frozen at -80°C (in group I) and at -20°C (in group II). Twenty-four hours after freezing the blood bags, they were submitted to the cryoprecipitate extraction procedure. The cryoprecipitate from both groups of blood bags were submitted to the PT, aPTT, FVIII, FvW and fibrinogen determination process, at time zero and after six months of storage. During the collections, triple plastic blood bags with main bag capacity of 450 mL of whole blood containing the anticoagulant CPDA-1 (JP Indústria Farmacêutica®) were used. After having the cryoprecipitate properly ready, an approximately 5 mL aliquot of cryoprecipitate was aliquoted into eppendorfs to be analyzed previously and six months after storage. The samples obtained in each moment were frozen at -80°C until the processing phase. Considering the results, both groups had a significant decrease of the factors and prolonged aPTT ($p < 0.05$) samples of cryoprecipitate after six months of storage. However, there was no significant between treatments. So the initial freezing temperature did not influence the stability of the factors during storage.

Key-words: Dog; von Willebrand factor; Factor VIII; Plasma; Blood – collection and preservation.

INTRODUÇÃO

Há anos a hemoterapia tem se baseado no uso de sangue total, e este tem sido cada vez menos utilizado na medicina veterinária (Lanevischi e Wardrop, 2001). Os subprodutos do sangue incluem seus componentes e derivados. Os componentes sanguíneos são obtidos através da centrifugação, ou menos comumente, através da aférese. O uso dos componentes sanguíneos permite que mais de um paciente possa se beneficiar de apenas um doador e reduz os riscos de uma reação transfusional contra os outros componentes desnecessários, pois muitas vezes o paciente que requer uma transfusão precisa de apenas um componente sanguíneo específico (Schneider, 1995; Lacerda, 2005).

A transfusão de sangue total fornece hemácias e proteínas plasmáticas, incluindo albumina e antitrombina III, se armazenado por mais de 24 horas contém poucas plaquetas e leucócitos viáveis. Além disso, os fatores de coagulação V e VIII decrescem durante a estocagem, tornando-o uma escolha inadequada para pacientes com DvW e/ou hemofilia A (Razouk e Reiche, 2004; Chiamonte, 2004).

Enquanto a transfusão de produtos plasmáticos desempenha um papel importante e crescente na terapia de pacientes caninos com sangramentos decorrentes de coagulopatias hereditárias. Realizar transfusão do plasma ou suas frações, como o crioprecipitado, ao invés de sangue total fresco ou estocado minimiza o risco de reações transfusionais e sobrecarga de volume. Além disso, o plasma pode ser armazenado congelado, o que permite que ele seja mantido por um período de tempo mais prolongado do que o sangue refrigerado (Wardrop e Brooks, 2001).

O FvW consiste em uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular que atua na hemostasia primária, realizando uma ponte molecular entre as plaquetas e o subendotélio exposto, além de possuir a capacidade de atuar na agregação plaquetária (Olsen *et al.*, 2003; Mattoso *et al.*, 2010). O mesmo tem a capacidade de carrear o FVIII, um co-fator de extrema importância na cascata de coagulação sanguínea, essencial na ativação do fator X (Day *et al.*, 2000), apesar de lábil (Lanevischi e Wardrop, 2001). Já o fibrinogênio é uma proteína de alto peso molecular sintetizada pelos hepatócitos, que assim como o FVIII atua na hemostasia secundária. A trombina

catalisa a conversão do fibrinogênio em fibrina, que desempenha um papel chave na formação e estabilização do coágulo (Fecteau *et al.*, 1997; Franchini e Lippi, 2012).

Estudos têm demonstrado que a utilização do crioprecipitado como auxílio terapêutico em cães portadores de DvW e hemofilia A mostrou-se mais eficaz e seguro em comparação com o uso do PFC (Stokol e Parry, 1998; Day *et al.*, 2000, Barr e Mcmichael, 2012).

Existem alguns dados sobre condições de congelamento e sua relação com a qualidade do crioprecipitado, porém são necessários mais estudos, principalmente na medicina veterinária. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a concentração dos fatores presentes no crioprecipitado em diferentes temperaturas e tempos de armazenamento, a fim de determinar se a qualidade do produto é estável e consequentemente a eficácia da terapia utilizando o hemocomponente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos animais

No projeto foram utilizados 20 cães. Todos os animais apresentaram peso mínimo de 25 quilos, idade entre um e oito anos e diversas raças. Apresentavam-se clinicamente hígidos e com os resultados dos exames laboratoriais dentro dos padrões de normalidade (hemograma, ureia, creatinina, ALT, FA, GGT, proteínas totais e albumina). Incluindo PCR negativo para *Ehrlichia* sp e, quando autorizado pelo proprietário, sorologia negativa para *Leishmania major*. Todos os animais utilizados possuíam vacinação anual e vermifugação semestrais atualizadas, sem histórico de uso de medicamento nos últimos dois meses. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – campus de Botucatu.

Colheita das bolsas de sangue

Para a colheita foram utilizadas bolsas triplas (JP Indústria Farmacêutica[®]), sendo a bolsa principal com capacidade para 450 mL de sangue total. As colheitas foram realizadas por venopunção da jugular, após tricotomia e antiseptia local, utilizando o método gravitacional, com homogeneização mecânica (Hemolight plus – Fresenius kabi[®]).

Delineamento experimental

Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo I- 10 unidades de plasma foram congeladas a - 80°C, antes da obtenção do crioprecipitado e Grupo II- 10 unidades de plasma foram congeladas a - 20°C, antes da obtenção do crioprecipitado. Vinte e quatro horas após o congelamento, estas foram submetidas ao procedimento de extração do crioprecipitado, alíquotas de 5 mL foram separadas em criotubos. O crioprecipitado recém-obtido foi considerado o momento zero, os mesmos foram armazenados a -80°C até o momento de análise. Outra alíquota de cada unidade, de ambos os grupos, foram armazenadas a - 20°C por um período de seis meses. Fazendo destas o momento um. O crioprecipitado das bolsas dos dois grupos foram submetidos à determinação do TP, TTPA, FVIII, fibrinogênio e FvW das alíquotas referentes ao momento zero e momento um.

Obtenção do crioprecipitado

Para cada unidade de bolsa o sangue fresco total obtido foi processado em até três horas após a coleta. Centrifugado (ROTANTA 460 RS - Hettich) a 1.000g por 14 minutos a 4°C para obtenção do plasma fresco, o mesmo foi transferido para a bolsa satélite e congelado, o Grupo I à -80° C e o Grupo II à -20°C. Após o congelamento inicial (24 horas), o PFC foi lentamente descongelado em uma geladeira específica para banco de sangue (Hemo - MBR-304GR) na temperatura de 4 – 6°C até adquirir uma consistência viscosa (aproximadamente 10 horas). Em seguida, o PFC foi centrifugado utilizando alta rotação (3.500g) por 10 minutos a 4°C. Durante a centrifugação o crioprecipitado precipita e adere na parede da bolsa. Após o processamento, foi transferido 90% do sobrenadante do PFC para a bolsa satélite vazia. A bolsa com menor

volume foi delicadamente homogeneizada até a completa dissolução do crioprecipitado aderido, resultando em um produto mais turvo e viscoso. Uma alíquota de aproximadamente 5 mililitros da bolsa de crioprecipitado foi separada em ependorfs para análise da amostra pré-estocagem e momento um (após seis meses de armazenamento), sendo as alíquotas referentes ao Grupo I congeladas à -80°C e ao Grupo II à -20°C, porém ambas estocadas a -20°C.

Mensuração do TP, TTPA, FVIII e fibrinogênio

As mensurações de TP e TTPA foram realizadas a partir dos kits da marca Clot®, enquanto as dosagens de FVIII e fibrinogênio foram realizadas a partir dos kits da marca Helena®. Todas as mensurações foram realizadas com o auxílio do coagulômetro Clotimer® de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante.

Determinação do FvW

As dosagens das amostras de crioprecipitado foram pelo método de ELISA direto, com anticorpo anti-FvW canino, em placas específicas para leitura em ELISA.

Segue abaixo o protocolo testado e escolhido para as dosagens do FvW dos momentos zero e um.

Primeiramente foi realizada a sensibilização da placa de alta afinidade (ELISA) com anticorpo primário (policlonal anti-FvW) em tampão carbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 por 16 horas (overnight) a 4°C. O bloqueio foi realizado com BSA 1% diluído em tampão fosfato salina (PBS), por uma hora a 37°C. Em seguida, aplicamos as amostras e a curva padrão em concentrações adequadas e incubamos a placa por duas horas a 37°C. Aplicamos o anticorpo secundário (anti-FvW conjugado com biotina), diluído em PBS contendo BSA a 1%, incubando a placa novamente por uma hora a 37°C. Adicionamos streptoavidina – HRPO (peroxidase) e o substrato (OPD) em tampão citrato de sódio e água oxigenada a 3%. A placa foi mantida a temperatura ambiente, protegida da luz até o desenvolvimento da coloração, por aproximadamente uma hora. Uma lavagem com PBS Tween 20 foi realizada entre todas as etapas.

Análise estatística

Inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada e não foram encontrados desvios de um padrão normal de distribuição. Para cada grupo, o teste T pareado foi usado para comparar a média de cada parâmetro entre os momentos estudados. O teste T para amostras independentes foi utilizado para comparar a média de cada parâmetro entre os grupos, dentro de cada momento estudado. Como houve diferenças entre as médias de alguns parâmetros no momento inicial, um teste adicional (teste T) foi realizado para comparar a diferença (aumento ou diminuição) média entre momento um e momento zero, entre os tratamentos. A análise estatística foi realizada com o procedimento PROC TTEST (SAS Institute, 2011) e significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da temperatura de congelamento do plasma e frações plasmáticas e sua influência na qualidade do produto vêm sendo frequentemente estudada na medicina. Na medicina veterinária são escassos estudos como estes. Por essa razão, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade do FvW, FVIII e fibrinogênio presentes no crioprecipitado canino no tempo de armazenamento de seis meses e temperaturas de congelamento iniciais de -20°C e -80°C .

Os volumes das unidades de crioprecipitado obtidos apresentaram-se dentro do valor preconizado por Stokol e Parry (1998), com volume total de 30-40 mL, retirando aproximadamente 90% do volume plasmático total. O protocolo de processamento do hemocomponente também foi baseado no estudo dos mesmos autores.

A atividade do FVIII e a concentração do FvW reduziram significativamente entre os momentos zero e um em ambos os grupos, enquanto a concentração de fibrinogênio apresentou redução significativa entre os momentos apenas no grupo I. Esse decréscimo provavelmente se deve a deterioração dos fatores após seis meses de estocagem a -20°C . A mesma redução de fatores pós-estocagem Wardrop e Brooks (2001) demonstraram em um estudo com PFC canino. Como citado por Cabejork *et al.*

(1986), é sabido que o FVIII é mais lábil que os demais presentes no crioprecipitado, o que justifica sua redução significativa (Tabela 1 e Figuras 1 e 2).

Tabela 1. Médias e desvios-padrões pré e pós-tratamento dos grupos I e II. Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII(FVIII); Fibrinogênio (Fib). Diferença estatística ($p < 0,05$).

	Grupo I		Grupo II	
	M0	M1	M0	M1
FvW ($\mu\text{g/mL}$)	3,464 ^a ($\pm 2,771$)	2,321 ^b ($\pm 1,813$)	4,299 ^a ($\pm 2,323$)	2,727 ^b ($\pm 1,428$)
FVIII (%)	94,45 ^a ($\pm 34,77$)	68,63 ^b ($\pm 20,52$)	147,76 ^a ($\pm 95,79$)	69,05 ^b ($\pm 36,81$)
Fib (mg/dL)	415,5 ^a ($\pm 102,0$)	289,1 ^b ($\pm 125,2$)	347,6 ^a ($\pm 90,6$)	313,2 ^a ($\pm 89,3$)

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

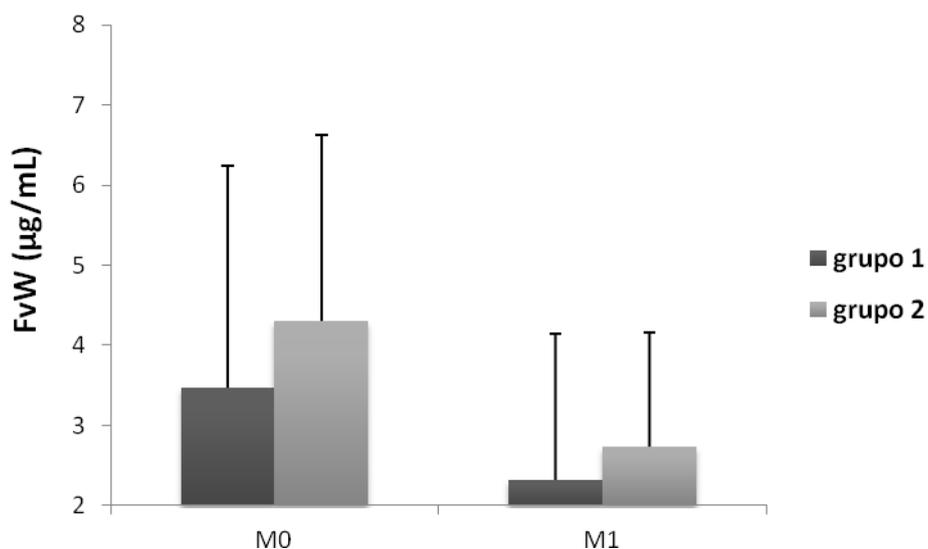


FIGURA 1. Médias e desvio padrão da concentração do Fator de von Willbrand presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

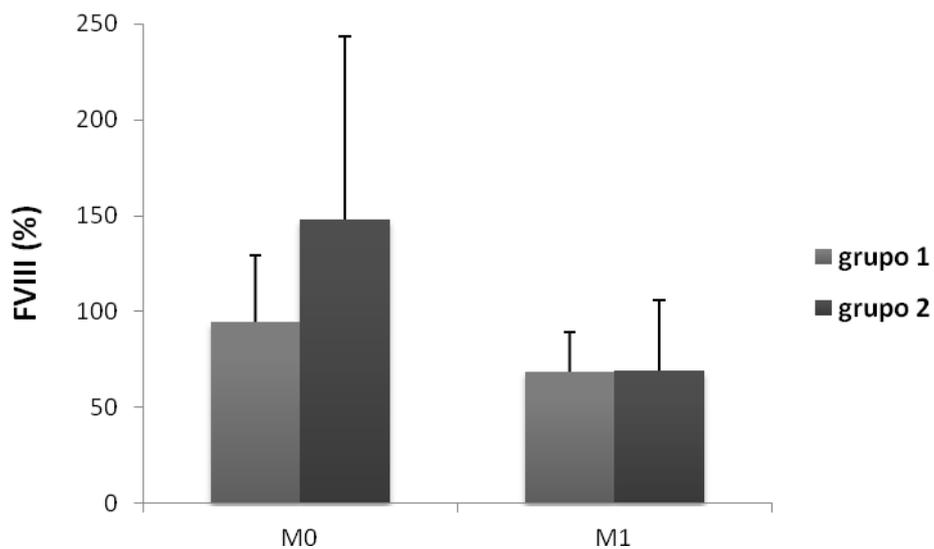


FIGURA 2. Médias e desvio padrão dos níveis de atividade do Fator VIII presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

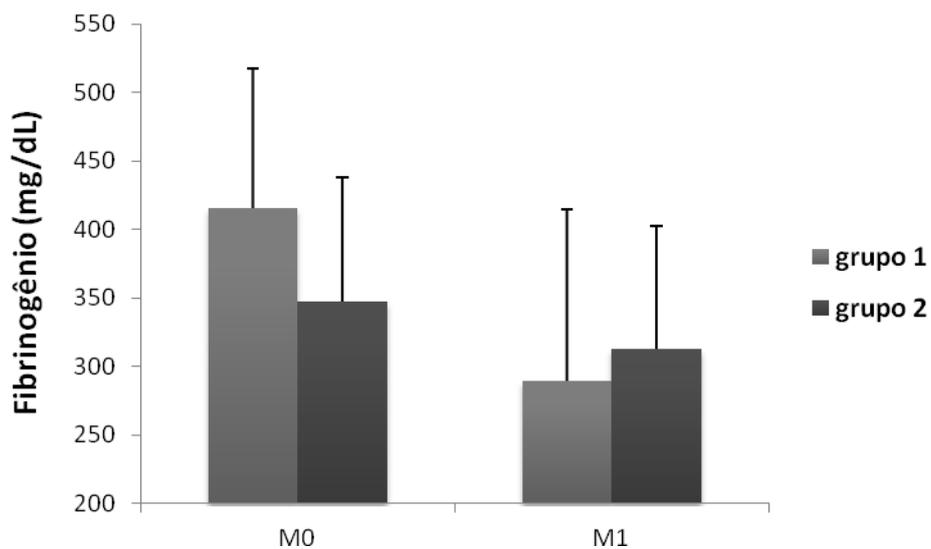


FIGURA 3. Médias e desvio padrão da concentração de Fibrinogênio presente no crioprecipitado nos grupos I e II, no momento zero e após seis meses de armazenamento (momento 1).

Houve prolongamento do TP e TTPA entre os momentos, provavelmente devido o decréscimo dos fatores presentes na amostra (Tab. 2). Sendo que, apenas o TP em ambos os grupos não obteve um aumento significativo demonstrando ser mais resistente ao efeito do armazenamento do que as demais variáveis.

Tabela 2. Médias e desvios-padrões pré e pós-tratamento dos grupos I e II. Tempo de protrombina (TP); Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Diferença estatística ($p < 0,05$).

	Grupo I		Grupo II	
	M0	M1	M0	M1
TP (s)	8,74 ^a ($\pm 0,87$)	10,13 ^a ($\pm 3,12$)	7,03 ^a ($\pm 0,20$)	7,84 ^a ($\pm 1,16$)
TTPA (s)	12,88 ^a ($\pm 1,63$)	16,3 ^b ($\pm 2,27$)	13,43 ^a ($\pm 1,70$)	15,78 ^b ($\pm 2,37$)

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

Em relação aos diferentes tratamentos, a variação entre os grupos não apresentou diferença significativa (Tab. 3). Indicando que a temperatura de congelamento inicial não influenciou na estabilidade dos fatores após seis meses de armazenamento à -20°C . Assim como o trabalho de Farrugia e Prowse (1985), o nosso estudo demonstrou que a temperatura de congelamento inicial não interferiu na estabilidade dos fatores, fibrinogênio, TP e TTPA.

A constatação de que a temperatura de -20°C é adequada para o armazenamento do crioprecipitado é importante, pois torna o procedimento mais viável e menos dispendioso do que o armazenamento em temperaturas mais baixas.

Tabela 3. As médias e desvios-padrões das diferenças entre momento um e momento zero para cada grupo experimental. Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio; Tempo de protrombina (TP); Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).

	Grupo I	Grupo II
FvW ($\mu\text{g/mL}$)	-1,143 \pm 1,000 ^a	-1,571 \pm 0,901 ^a
Fibrinogênio (mg/dL)	-126,400 \pm 109,088 ^a	-34,400 \pm 111,366 ^a
FVIII (%)	-25,819 \pm 35,266 ^a	-78,707 \pm 101,379 ^a
TP (s)	1,390 \pm 2,699 ^a	0,810 \pm 1,134 ^a
TTPA (s)	3,420 \pm 2,088 ^a	2,350 \pm 2,339 ^a

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

Para garantir o protocolo utilizado e a qualidade do hemocomponente foram realizadas dosagens do FvW, FVIII e fibrinogênio do PFC de três doadores, antes e após o processamento do produto (Tab. 2). Os mesmos apresentaram concentrações significativamente maiores dos fatores e fibrinogênio no crioprecipitado, demonstrando a efetividade da técnica utilizada. Assim como demonstrou Stokol e Parry (1995), estes

resultados reafirmam a crioprecipitação como um meio eficaz para concentrar os fatores.

Tabela 4. Dosagens do Plasma fresco congelado (PFC) e Crioprecipitado (Crio) de três doadores, como controle de qualidade. Fator de von Willebrand (FvW); Fator VIII (FVIII); Fibrinogênio (Fib).

	Doador 1		Doador 2		Doador 3	
	PFC	Crio	PFC	Crio	PFC	Crio
FvW (µg/mL)	0,360	6,867	0,498	6,021	0,320	5,761
FVIII (%)	72,66	266,24	80,69	109,13	73,74	110,52
Fib (mg/dL)	191,0	276,0	154,0	339,0	158,0	332,0

Nosso trabalho também demonstrou o crioprecipitado como o hemocomponente de escolha para a reposição de FvW, FVIII e fibrinogênio, devido a concentração de fatores consideravelmente superior do que no PFC. Por essa razão, muitas vezes o PFC não é suficiente para obter o aumento dos mesmos e conseqüentemente de conter ou prevenir quadros hemorrágicos.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados, e nas condições em que o experimento foi realizado podemos concluir que a temperatura de congelamento não influencia na qualidade do hemocomponente, que demonstrou decréscimo dos fatores, fibrinogênio e prolongamento do TTPA, proporcionalmente em ambos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

BARR, J. W.; MCMICHAEL, M. Inherited Disorders of Hemostasis in Dogs and Cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 27, p. 53-58, 2012.

CARLEBJORK, G.; BLOMBACK, M.; PIHLSTEDT, P. Freezing of plasma and recovery of factor VIII. **Transfusion**, v. 26, p.159-162, 1986.

CHIARAMONTE, D. Blood-component therapy: Selection, administration and monitoring. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Filadélfia, v. 19, n. 2, p. 63-67, 2004.

DAY, M. J.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. D. **Manual of Canine and Feline haematology and Transfusion Medicine**. British Small Animal Veterinary Association, p. 289-290, 2000

FARRUGIA, A.; PROWSE, C. Studies on the procurement of blood coagulation factor VIII: effects of plasma freezing rate and storage conditions on cryoprecipitate quality. **Journal of Clinical Pathology**, v. 38, p. 433-437, 1985.

FECTEAU, G.; ZINKL, J. G.; SMITH, B. P.; O'NEIL, S.; SMITH, S.; KLOPFER, S. Dystfibrinogenemia or afibrinogenemia in a Border Leicester lamb. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, p. 443-444, 1997.

FRANCHINI, M.; LIPPI, G. Fibrinogen replacement therapy: a critical review of the literature. **Blood Transfusion**, v. 10, p. 23-27, 2012.

LACERDA, L. A. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: González, F. H. D., Santos, A. P. **Anais do II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**, p. 62-81, 2005.

LANEVISCHI, A.; WARDROP, K. J. Principles of transfusion medicine in small animals, **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 447-454, 2001.

MATTOSO, C. R. S.; TAKAHIRA, R. K.; BEIER, S. L.; JÚNIOR, J. P. A.; CORRENTE, J. E. Prevalence of von Willebrand disease in dogs from São Paulo State, Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, janeiro, p. 55-60, 2010.

OLSEN, E. H. N.; MCCAIN, A. S.; MERRICKS, E. P.; FISCHER, T. H.; DILLON, I. M.; RAYMER, R. A.; BELLINGER, D. A.; FAHS, S. A.; MONTGOMERY, R. R.; KEITH, J. C.; SCHAUB, R. G.; NICHOLS, T. C. Comparative response of plasma VWF in dogs to up-regulation of VWF Mrna by interleukin-11 versus Weibel-Palade body release by desmopressin (DDAVP). **Blood Journal**, v. 102, p. 435-441, 2003.

RAZOUK, F. H.; REICHE, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, p. 126-134, 2004.

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

STOKOL, T.; PARRY, B. Efficacy of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in dogs with von Willebrand's disease or hemophilia A. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, p. 84-92, 1998.

STOKOL, T.; PARRY, B. W. Stability of von willebrand factor and factor VIII in canine cryoprecipitate under various conditions of storage. **Research in Veterinary Science**, p. 152-155, 1995.

WARDROP, K. J.; BROOKS, M. B. Stability of hemostatic proteins in canine fresh frozen plasma units. **Veterinary Clinical Pathology**, p. 91-95, 2001.

Normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

- **Artigo científico**

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

- **Seções de um artigo**

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

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

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

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento.

As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Figura: Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas.

Como referenciar:

Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

Autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

Dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

Mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

Mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação

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

Comunicação pessoal

Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.