UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

LETÍCIA SARNI ROQUE

VERSÃO CORRIGIDA

CRIOPRESERVAÇÃO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS COM
USO DE DMSO A 5%

RIBEIRÃO PRETO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

CRIOPRESERVAÇÃO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS COM
USO DE DMSO A 5%

Letícia Sarni Roque

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Hemoterapia e
Biotecnologia para a obtenção do título de Mestre em
Hemoterapia.

Área de Concentração: Hemoterapia.

ORIENTADOR: DR. GIL CUNHA DE SANTIS

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Ficha Catalográfica

R786c

Roque, Letícia Sarni

Criopreservação do concentrado de plaquetas com uso de DMSO a 5%./ Letícia Sarni Roque – Ribeirão Preto, 2018.
70f.; il. 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Hemoterapia

Orientador: Gil Cunha De Santis

1. Criopreservação. 2. Plaquetas. 3. Aférese. 4. DMSO. 5. Concentrado de Plaquetas.

CDU 615.387

Nome: ROQUE, Letícia Sarni

Título: Criopreservação do Concentrado de Plaquetas com uso de DMSO à 5%.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Hemoterapia e Biotecnologia
para a obtenção do título de Mestre em Hemoterapia.

Área de Concentração: Hemoterapia

ORIENTADOR: DR. GIL CUNHA DE SANTIS

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Professor Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Professor Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Professor Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e família meus maiores incentivadores, cujo alicerce familiar respaldou e embasou todas as minhas tomadas de decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela presença em todos os momentos, fornecendo-me paciência e sabedoria, iluminando e conduzindo meus caminhos para a realização dos meus sonhos.

A fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela oportunidade de cursar este mestrado, e em especial a Dra. Eugênia Maria Amorim Ubiali que auxiliou na realização deste projeto.

Ao meu orientador prof. Dr Gil Cunha De Santis pela disponibilidade, paciência e atenção.

A minha co-orientadora Maria Ângela Pignata Ottoboni pela amizade, dedicação, e confiança em mim depositado.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Controle da Qualidade, pelas orientações e fundamental apoio no desenvolvimento dos experimentos.

A chefia e funcionários do Laboratório de Fracionamento, em especial Andrezza, Marlon, Clarete, Janaína e Cristiane pelo auxílio e esclarecimentos de metodologias.

Ao laboratório de Terapia Celular, em nome da Dra. Maristela Delgado Orellana e as funcionárias Taísa e Sâmia que além de me auxiliarem nas metodologias, se tornaram amigas no decorrer deste trabalho.

Ao laboratório de Citometria de Fluxo, a Patrícia, Camila e Natália que foram essenciais para aprofundar meus conhecimentos em novas áreas.

Ao laboratório de Análises Clínicas da faculdade de farmácia da USP, em nome da Prof (a). Eliza Russo e da funcionária Luciana, que colaboraram para realização dos testes bioquímicos.

Aos meus amigos pessoais que se fizeram presentes dando todo o apoio necessário para que nas dificuldades não abandonasse este sonho.

RESUMO

Roque LS1, Ottoboni MAP, Orellana MD, Palma PVB, Fernandes TR, Ubiali EMA, Covas DTDe Santis GC. **CRIOPRESERVAÇÃO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS COM USO DE DMSO À 5%.** 2018. 70f. Dissertação de Mestrado em Hemoterapia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O curto período de armazenamento dos concentrados de plaquetas (CP), de 5 a 7 dias, torna esse hemocomponente crítico para os serviços de hemoterapia. A criopreservação se apresenta então como uma possibilidade para a manutenção dos estoques por período mais prolongado. Essa prática exige a adição de substância crioprotetora e a adequação do volume em relação à concentração de plaquetas. O CP obtido por aférese (CPAF) é um hemocomponente proveniente de um único doador, coletado em sistema automatizado, que equivale a 6-8 unidades de CP obtidas da coleta de doadores convencional. **Objetivo:** Avaliar o efeito da criopreservação de CPAF no quinto dia do armazenamento, por meio de análises imunofenotípicas e funcionais das plaquetas, utilizando o crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%, em freezer a -80°C e descongelamento em banho maria a 37°C , sem a remoção do crioprotetor. **Material e Métodos:** Foram analisadas 20 unidades de CPAF em quatro fases diferentes do processo: Fase I (pré-redução de volume), Fase II (pós-reposo, agitação e adição do DMSO), Fase III (pós-descongelamento) e Fase IV (após duas horas de descongelamento e agitação). Todas as bolsas foram avaliadas quanto à presença do "swirling" plaquetário, e análise microbiológica, contagem de plaquetas e leucócitos, determinação do volume plaquetário médio (VPM), análise do pH, dosagem de desidrogenase láctica (DHL) e glicose, a ativação plaquetária por meio de citometria de fluxo com os marcadores CD61, CD62P e anexina V e para a avaliação funcional, as técnicas de microagregação plaquetária e retração do coágulo. Os resultados de cada fase foram analisados e comparados, considerando resultados $p < 0,05$ de significância estatística, avaliada pelos testes de Wilcoxon e Teste-T pareado. **Resultados:** Todos os CPs criopreservados apresentaram na inspeção visual presença de "swirling" e ausência de grumos. O pH manteve-se com mediana de 7,185 (6,076-7,528) pra fase III, análise microbiológica foi negativa em todas as unidades criopreservadas, o número mediano de plaquetas caiu de $3,04 \times 10^{11}/\text{U}$ na Fase II para $2,27 \times 10^{11}/\text{U}$ na fase III (redução de 25,32%). A ativação plaquetária na fase II foi de 23% CD62P+ para 44% CD62P+ na fase III ($p=0,067$). O marcador anexina V estava expresso em 13% das plaquetas na fase II e em 11% na fase III, ($p=0,33$). A LDH aumentou de 747 U/L (4-3079) para 1.428 U/L (662-2303) da fase II para a fase III, respectivamente ($p=0,055$). A glicose diminuiu em todas as fases ($p < 0,0001$). Os testes de função plaquetária revelaram que a plaquetas descongeladas mantêm sua função. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostraram que, embora tenham ocorrido ativação e redução significativa do número de plaquetas, o produto final conservou quantidade suficiente de plaquetas, cujas funções foram mantidas, o que torna viável a utilização do hemocomponente CP criopreservado. Sugere ainda que os CPAF possam ser criopreservados no quinto dia de armazenamento, com o uso do DMSO a 5%, ideal para que não se faça necessário sua remoção pós-descongelamento.

Palavras-chave: Criopreservação. Plaquetas. Aférese. DMSO. Concentrado de Plaquetas.

ABSTRACT

Roque LS1, Ottoboni MAP, Orellana MD, Palma PVB, Fernandes TR, Ubiali EMA, Covas DT, De Santis GC. **CRYOPRESERVATION OF THE CONCENTRATION OF PLATELETS WITH USE OF DMSO AT 5%.** 2018. 70f. Dissertation of Master in Hemotherapy, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The storage period of the platelet concentrates (CP), from 5 to 7 days, makes this blood component critical for hemotherapy services. Cryopreservation presents itself as a possibility of maintaining stocks for a longer period. This practice requires an additional cryoprotectant and a suitability of volume in relation to platelet concentration. The CP collected by the same (CPAF) is a blood component of a single dosage, being collected in an automated system, which is equivalent to 6-8 CP units from the collection of conventional donors. **Objective:** To evaluate the effect of CPAF cryopreservation on the fifth day of storage, by means of immunophenotypic and functional platelet analysis using the 5% DMSO cryoprotectant in a freezer at -80 ° C and thawing in a water bath at 37 ° C, without removal of the cryoprotectant. **Material and Methods:** 20 units of CPAF were analyzed in four different phases of the process: Phase I (pre-reduction of volume), Phase II (post-rest, agitation and DMSO addition), Phase III (post-thaw) and Phase IV (after two hours of thawing and shaking). All units were evaluated for platelet swirling and microbiological analysis, platelet and leukocyte counts, determination of mean platelet volume (MPV), pH analysis, lactate dehydrogenase (LDH) and glucose, platelet activation by means of flow cytometry with the markers CD61, CD62P and annexin V and for the functional evaluation, platelet microaggregation and clot retraction techniques. The results of each phase were analyzed and compared, considering results $p < 0.05$ of statistical significance, evaluated by the Wilcoxon and Paired T-test. **Results:** All cryopreserved CPs presented visual presence of "swirling" and absence of lumps. The pH was maintained at a median of 7.185 (6.076-7.528) for phase III, microbiological analysis was negative in all cryopreserved units, the median number of platelets fell from $3.04 \times 10^{11}/U$ in Phase II to $2.27 \times 10^{11}/U$ in phase III (reduction of 25.32%). Phase II platelet activation was 23% CD62P + to 44% CD62P + in phase III ($p=0.067$). The annexin V marker was expressed in 13% of platelets in phase II and 11% in phase III ($p=0.33$). LDH increased from 747 U/L (4-3,079) to 1,428 U / L (662-2303) from phase II to phase III, respectively ($p<0,0055$). Glucose decreased in all phases ($p < 0.0001$). Platelet function tests have revealed that thawed platelets maintain their function. **Conclusion:** The results showed that, although activation and significant reduction of platelet count occurred, the end product preserved sufficient quantity of platelets, whose functions were maintained, which makes the use of the cryopreserved CP blood component viable. It also suggests that CPAFs can be cryopreserved on the fifth day of storage using 5% DMSO, so that their post-thaw removal is not required.

Keywords: Cryopreservation. Platelets. Apheresis. DMSO. Platelet Concentrate.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das quatro fases expressos em mediana e amplitude _____ 37

Tabela 2. Mediana dos testes realizados para fases pré e pós-congelamento com análise estatística
_____ 38

Tabela 3. Expressão das medianas e análise estatística entre as fases pós-congelamento e após 2
horas de armazenamento _____ 43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análise dos dados do número absoluto de plaquetas criopreservadas nas fases pré e pós-congelamento _____	39
Gráfico 2. Análise do pH na fase pré e pós-congelamento _____	39
Gráfico 3. Análise do processo de ativação por meio do marcador CD62P+ nas fases pré e pós-congelamento _____	40
Gráfico 4. Análise imunofenotípica para marcador anexina V+ nas fases pré e pós-congelamento _____	40
Gráfico 5. Análise imunofenotípica de anexina V+ e PI+ nas fases pré e pós-congelamento _____	41
Gráfico 6. Dosagens de DHL para fases pré e pós-congelamento _____	41
Gráfico 7. Análises dos resultados da glicose livre no plasma nas as fases pré e pós-congelamento _____	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Agente Crioprotetor

ADP - Adenosina Difosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

CP- Concentrado de Plaquetas

CPAF- Concentrado de Plaquetas obtidas por Aférese

DHL – Desidrogenase Láctica

DMS - Dimetilsulfuro

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMSO₂ - Dimetilsulfona

FITC - fluorescein isothiocyanate

HPA - Antígeno Plaquetário Humano

MSM – Metilsulfonilmetano

PE – Phycoeritina

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

VPM – Volume Plaquetário Médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Hemostasia	17
2.2	Plaquetas	18
2.2.1	Produção e Liberação de Plaquetas	18
2.2.2	Morfologia Plaquetária	20
2.2.3	Fisiologia Estrutural e Metabolismo Plaquetário	21
2.2.4	Função Plaquetária	23
2.3	CONCENTRADO DE PLAQUETAS	23
2.4	Coleta obtida por aférese	24
2.5	CRIOPRESERVAÇÃO	25
3	JUSTIFICATIVA	28
4	OBJETIVOS	28
4.1	Geral	28
4.2	Específico	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1	Modelo Experimental do Protocolo de Criopreservação de Plaquetas	30
5.2	Redução de Volume do Concentrado de Plaquetas de Aférese	31
5.3	Infusão da Solução Crioprotetora e Congelamento	31
5.4	Descongelamento	32
5.5	Análise Visual e pH	32
5.6	Análise Microbiológica	32
5.7	Avaliação da contagem de plaquetas e VPM	33
5.8	Avaliação da contagem de leucócitos	33
5.9	Caracterização Imunofenotípica	34
5.10	Teste de Micro-agregados	34
5.11	Teste de e Retração do Coágulo	35
5.12	Análises de DHL e Glicose	35
5.13	Análise dos resultados	36
6	RESULTADOS	37
6.1	Análise visual e avaliação microbiológica	37
6.2	Resultados obtidos nas quatro fases	37
6.3	Comparação entre as fases críticas (II e III) de criopreservação	38
6.4	Volume, concentração de plaquetas e leucócitos	38
6.5	Análise do pH	39
6.6	Ativação Plaquetária	40
6.7	Análise do marcador anexina V	40
6.8	Avaliação do metabolismo plaquetário	41

6.9	Microagregação e Retração do coágulo	42
6.10	Pós-criopreservação	42
7	DISCUSSÃO	44
8	CONCLUSÃO	49
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
10	ANEXOS	
10.1	ANEXO I- Análises dos testes de Retração do Coágulo nas quatro fases da técnica de criopreservação.	
10.2	ANEXO II. Análises dos testes de Microagregação Plaquetária nas quatro fases da técnica de criopreservação.	

1 INTRODUÇÃO

O sangue periférico é constituído por três diferentes linhagens celulares: glóbulos vermelhos (eritrócitos ou hemácias); glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos). As plaquetas foram primeiramente descritas pelo patologista italiano Giulio Bizzozzero em 1882, que as definiu como pequenos fragmentos do citoplasma dos megacariócitos (COMAR; DANCHURA; SILVA, 2009). Segundo Lorenzi (1999) as plaquetas apesar de pequenas, são células do sangue responsáveis por elaborados processos bioquímicos envolvidos na hemostasia, trombose e coagulação, que quando ativadas se aderem ao endotélio vascular lesado e/ou a outras plaquetas, formando agregados que têm como função a prevenção ou interrupção do sangramento.

A membrana das plaquetas contém glicoproteínas que interagem com receptores diversos e modula a função plaquetária na hemostasia primária, sendo esta a atividade que depende do bom funcionamento das plaquetas, promovendo um processo de coagulação fisiológica que ocorre em resposta ao dano vascular (REGO, SANTANA, 2007).

As plaquetas em circulação vivem em média 10 dias e sua remoção se dá por senescência ou por consumo no processo da hemostasia. As alterações associadas à senescência podem ocorrer por repetidas agressões durante sua vida e algumas alterações são observadas, tais como: redução no conteúdo de ácido siálico, o aumento de imunoglobulina em sua superfície e agregação de novos antígenos associados à glicoproteína específica de membrana (ALENCAR, CHAMONE, 2007).

Na hemoterapia, o emprego das plaquetas é feito sob a forma de concentrados de plaquetas (CP), que permitem infundir grandes números de plaquetas com pequenos volumes. Sua principal indicação são plaquetopenias hipoproliferativas, como na leucemia aguda, na anemia aplástica e no transplante de células progenitoras hematopoiéticas (RAZOUK; REICHE, 2004; TOSTES et al., 2004).

Os CPs podem ser obtidos como unidades randômicas a partir de unidades individuais de sangue total, pelos métodos do plasma rico em plaquetas (PRP) ou do creme leucocitário (*buffycoat*), podendo ser obtidas de vários doadores diferentes e

separação por meio de centrifugação e extração, ou através da utilização de processadores automáticos de células sanguíneas, chamado de aférese.

Na coleta de plaquetas por aférese é possível obter uma unidade terapêutica necessária para transfusão a partir de um único doador, reduzindo os riscos de reações transfusionais imediatas, a doença do enxerto contra o hospedeiro, o risco de sepse e oferece maior incremento plaquetário (BARBOSA et al., 2014).

O procedimento de aférese baseia-se em processo automatizado de centrifugação *in line* com devolução ao doador dos elementos sem interesse, onde no caso da coleta de plaquetas parte do plasma e hemácias é devolvido ao doador. Nesta coleta obtém-se número de plaquetas similar ao de 6 a 12 unidades de CP unitárias obtidas de doação convencional de doadores diferentes, equivalendo a 3×10^{11} plaquetas em 200 a 300 ml de plasma. Mesmo sendo uma metodologia de alto custo e com necessidade de doadores mais qualificados (em peso e contagem de plaquetas), apresenta menor risco de transmissão de doenças infecciosas ao receptor, menor contaminação com outros tipos celulares no hemocomponente final, auxiliando na prevenção de reações transfusionais, sendo a metodologia mais recomendada nos casos de transfusões histocompatíveis HLA (antígeno leucocitário humano) e HPA (antígeno plaquetário humano) (REGO, SANTANA, 2007).

Juntamente com o advento de novas tecnologias para a coleta de plaquetas, cresceu o número de indicações clínicas para a transfusão de CP obtidas por aférese. Para garantir a eficácia esperada em uma transfusão de CP é fundamental a preservação da sua função hemostática, desde os processos de coleta, produção e estocagem deste hemocomponente, pois as plaquetas são expostas a vários estímulos mecânicos e químicos que podem levar à sua ativação. Além disso, durante o período de estocagem, um crescente número de plaquetas chega ao final da sua vida, que é de 07 a 10 dias, tendo como validade cinco dias a partir da data de coleta quando armazenadas a temperatura ótima de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em agitação constante.

Segundo BARBOSA (2008), esse processo contribui para a crescente produção de metabólitos durante a sua estocagem, gerando meio desfavorável à viabilidade plaquetária, diminuindo a atividade hemostática das plaquetas *in vivo*.

Várias medidas são adotadas com intuito de diminuir o risco de reações adversas relacionadas à contaminação bacteriana do concentrado de plaquetas, a aloimunização de antígenos plaquetários e a sua curta validade de armazenamento, através do aumento em número de coletas por metodologia de aférese, com fenótipos específicos, a avaliação do controle bacteriológico por metodologias mais sensíveis nos concentrados de plaquetas e o desenvolvimento de novas técnicas de armazenamento, como a criopreservação, para prolongar sua validade e manter isentas de contaminação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemostasia

A complexidade cada vez maior do sistema circulatório dos organismos multicelulares foi acompanhada pelo desenvolvimento simultâneo de um mecanismo destinado a impedir a perda do líquido que circula sob pressão. Este mecanismo constitui um dos mais importantes componentes da hemostasia e vai encontrar sua mais completa e complexa expressão nos mamíferos superiores, sendo denominado sistema hemostático, ou mais simplesmente, hemostasia. São partes integrantes deste sistema os próprios vasos sanguíneos, representados pelos seus menores componentes as arteríolas e capilares, os elementos figurados do sangue circulante denominado plaquetas e, finalmente, as substâncias existentes no plasma em estado inativo, os assim chamados fatores pró-coagulantes (OLIVEIRA, 1988).

A hemostasia refere-se ao processo de restauração da circulação sanguínea no referido circuito quando de uma prévia trombose em um ponto qualquer do mesmo. Pode ser dividida em cinco etapas que se superpõem parcialmente: a vasoconstrição local, a adesividade das plaquetas à parede vascular danificada, a formação de um agregado plaquetário, a consolidação desse agregado pela fibrina e finalmente restauração da circulação através do sistema fibrinolítico. Em cada uma dessas etapas estabelecem-se inter-relações importantes entre o sangue e a parede vascular (VERMYLEN, 1982).

A hemostasia é o processo pelo qual o organismo procura controlar a perda sanguínea através de um vaso lesado, evitando que ela se prolongue por um tempo maior, exceção feita aos casos em que há secção de artérias ou veias de grande calibre. A integridade do endotélio vascular é o elemento essencial que permite à fluidez do sangue, em condições normais as plaquetas e os fatores da coagulação circulam sob a forma não ativada e só exercem a função hemostática ou coagulante quando estas condições se alteram (OLIVEIRA, 1988).

Completada as duas fases do processo de hemostasia, o vaso deve ser recanalizado para que o fluxo sanguíneo se restabeleça normalmente, entrando na fase final de fibrinólise, ou seja, dissolução da fibrina formada através das enzimas de células endoteliais, substituindo o coágulo por um crescimento fibroblástico quando iniciar-se a cicatrização definitiva do local lesado (VERMYLEN, 1982).

As plaquetas sanguíneas são essenciais para a hemostase normal, exercendo duas atividades diferentes, a função hemostática cessando a hemorragia por oclusão física das aberturas em vasos sanguíneos através das massas de plaquetas e a função tromboplástica realizada pela participação de constituintes químicos das plaquetas no mecanismo de coagulação do sangue (KARPATKIN, ZUCKER, 1976)

2.2 Plaquetas

Sabe-se que as plaquetas são produzidas pela fragmentação do citoplasma do megacariócito, este tem como precursor o megacarioblasto que provém de uma célula-tronco. O megacariócito amadurece através de um processo de replicação nuclear endomitótica, aumentando o volume citoplasmático à medida que duplica o número de núcleos (OLIVEIRA, 1988).

As plaquetas circulam como discos citoplasmáticos, desprovidos de núcleo, na sua concentração de $250.000 \pm 40.000/\mu\text{L}$, com volume corpuscular médio (VPM) de $10\mu^3$, e tem uma sobrevivência de 7 a 10 dias. Em um indivíduo normal, dois terços das plaquetas encontra-se em circulação e um terço aprisionado no baço (VERMYLEN, 1982).

2.2.1 Produção e Liberação de Plaquetas

Sugere-se que a liberação das plaquetas do megacariócito maduro, ocorre quando este estende seus filamentos de citoplasma em espaços sinusoidais onde se desprendem e se fragmentam em plaquetas isoladas. Os estudos mais recentes

com o uso de microscopia de fase em cultura de tecidos e microscopia eletrônica indicaram que esta hipótese provavelmente é a correta. Outra hipótese de liberação de plaquetas é que elas são expulsas uma a uma dos megacariócitos, em meio às células endoteliais que revestem os sinusóides medulares.

Já as plaquetas imaturas quase sempre observadas aglomeradas na periferia de megacariócitos são provavelmente artefatos, tendo vindo do sangue periférico aspirado com a medula óssea (WHITE, 1976).

Os megacariócitos são provenientes de uma célula com multipotencial, capaz de se diferenciar em linhagens eritrocitárias, da série mielocítica e megacariocítica, é dividido em três zonas, a justanuclear que é rica em organelas, a zona intermediária onde ocorre a formação das plaquetas e a zona marginal, local em que as plaquetas já formadas se desprendem em agrupamentos ou isoladamente. No feto, os megacariócitos originam-se primeiramente no saco vitelino e depois no fígado e baço, e aos três meses aparecem na medula óssea onde são encontrados somente após o nascimento (KARPATKIN, ZUCKER, 1976).

De acordo com RAPPAPORT (1978), em estado de equilíbrio, cada megacariócito que amadurece na medula óssea precisa ser repostado por uma célula primitiva comprometida e morfológicamente não identificável, porém quando esta nova célula é identificada como o megacarioblasto, ela já perdeu a capacidade de se dividir em células filhas. Entretanto, essa célula continua a sintetizar as proteínas e seu núcleo divide-se dando origem a um pró - megacariócito com dois, quatro, oito, dezesseis ou raramente trinta e dois núcleos, composto por citoplasma basófilo que após as divisões aumenta de tamanho e perde sua basofilia, desenvolvendo grânulos, evoluindo para megacariócito maduro. Assim, quando o citoplasma sofrer fragmentação ocorre à formação das plaquetas e o núcleo nu do megacariócito é removido pelas células retículo-endoteliais, com este ciclo completo em 10 dias, tendo um ou mais fatores humorais controlando a produção das plaquetas e o seu maior mediador sendo a trombopoetina.

A produção de plaquetas por dia se mantém entre 35.000 a 40.000 mm^3 em circulação, com sua vida média de 7 a 10 dias e nova produção de 3 a 5 dias. No indivíduo normal algumas plaquetas provavelmente morrem de senescência depois de 7 a 14 dias, ao passo que outras plaquetas mais jovens são consumidas para

recuperar lesões vasculares mínimas que ocorrem na vida diária, as plaquetas senescentes são removidas pelas células do sistema retículo-endotelial, no baço e fígado (WHITE, 1976).

2.2.2 Morfologia Plaquetária

Um novo conceito da anatomia plaquetária, baseado em considerações funcionais, emergiu das investigações com microscopia eletrônica, sendo três os mecanismos básicos que dirigem as atividades das plaquetas na hemostasia: a adesão e/ou agregação, a concentração e a secreção.

Formadas pela maioria dos constituintes celulares e sendo fragmentos citoplasmáticos, possuem forma discóide de 5 a $12\mu\text{m}^3$ com volume médio 7,1 a $7,5\text{mm}^3$. Distribuídos de forma heterogênea estão o glicogênio, adeninonucleotídeos, proteínas, aminoácidos e ortofosfato (LORENZI, 1999).

WHITE (1976) afirma que as plaquetas são formadas por três zonas estruturais principais, cada qual relacionada a um aspecto funcional específico.

A zona periférica que é responsável pela aderência das plaquetas ao ponto da lesão vascular e entre si, é uma fase crítica da formação das rolhas hemostáticas. Esta zona consiste em revestimento externo que faz contato com o plasma e tem função de organização estrutural (mucopolissacarídeos e glicoproteínas), a membrana unida ou membrana plaquetária atua na integridade da célula e proteção o meio externo e a área sub-membranosa que auxilia na manutenção da forma discóide, participa da formação e estabilização dos pseudópodos.

A zona sol-gel considerada uma divisão morfológica separada, tem relação com a função contrátil, composta por hialoplasma, microtúbulos, microfibrilas e grânulos alfa. O hialoplasma é responsável pelas condições de plasticidade, rapidez e auto movimentação, os microtúbulos assemelham-se a tubos ocos, com uma parede eletrodensa e diâmetro externo de 200 a $300\text{\AA}$ (angstrom), estes cercam as plaquetas abaixo da sua membrana superficial, formando um citoesqueleto que estabiliza a célula e lhe permite circular como um disco. As microfibrilas são formadas por actina e miosina, são proteínas contráteis que atuam nos processos

vitais como a trombocitopoese, emissão dos pseudópodos, contrações internas, eliminação e secreção de grânulos plaquetários.

Já os grânulos alfa carregam fator plaquetário 4, fatores de crescimento, fibronectina, fatores da coagulação e albumina, que serão liberados durante a hemostasia.

A zona de organelas é o local que se reúne uma variedade de organelas figuradas e elementos em partículas, todos incluídos na matriz sol-gel das plaquetas. Presentes nesta zona estão os grânulos, os corpos densos e as mitocôndrias, pilhas de sáculos achatados semelhantes a um aparelho de golgi. Os grânulos são ricos em fosfolipídios e enzimas hidrolíticas, como a fosfatase ácida, β - glicuronidase e catepsina, também foram localizados em frações de grânulos o fibrinogênio plaquetário, a trombostenina, a ATPase, o ATP (adenosina trifosfato), o ADP (adenosina difosfato) e a serotonina. Os corpos densos são formados a partir da transformação dos grânulos, estão diretamente ligados com a absorção de serotonina e são organelas secretoras primárias das plaquetas. As mitocôndrias das plaquetas têm estrutura simples e são pouco numerosas, contribuem para o depósito metabólico de ATP, pois quando ocorre o bloqueio isolado de glicólise enzimática não afeta a taxa plaquetária de ATP ou as outras funções celulares que requerem energia (KARPATKIN, ZUCKER1978)

2.2.3 Fisiologia Estrutural e Metabolismo Plaquetário

As alterações físicas que surgem em plaquetas durante reações hemostáticas estão diretamente relacionadas a fenômenos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem ao mesmo tempo. Normalmente as plaquetas circulam em forma de discos achatados, podendo ser preservadas *in vitro* coletando-se o sangue em citrato ou heparina (WHITE 1976).

De acordo com RAPPAPORT (1978), a capacidade das plaquetas de sofrer a transformação física sem se tornarem aderentes é surpreendente, todavia as plaquetas no sangue circulante ficam constantemente expostas a uma grande variedade de estímulos, desencadeando uma reação do tipo “tudo ou nada” nas plaquetas, em que o indivíduo ficaria sob risco de tromboembolismo.

O controle da integridade celular é realizado pelo ATP, que fixa o 5-hidroxitriptamina, para impedir a aderência de uma plaqueta às outras, sendo essencial para a retração do coágulo (OLIVEIRA, 1988).

A fisiologia contrátil domina a fisiologia plaquetária desde o momento em que muda a forma e começa a reorganização, até que a metamorfose viscosa e a retração do coágulo fiquem completas (KARPATKIN, ZUCKER, 1976).

Sobre o metabolismo plaquetário, as plaquetas constituem um tecido predominantemente glicolítico anaeróbico, com respiração mais ou menos baixa, e são capazes de converter 55% de glicose e/ou glicogênio em lactato aerobicamente pela via de Embden-Meyerhof.

Rappaport (1978) descreve que o metabolismo das plaquetas interfere diretamente no mecanismo de ativação, com o primeiro sinal na membrana externa por fatores agonistas que se ligam aos receptores específicos, ativando as moléculas de integrinas plaquetárias, estabilizando a adesão das mesmas ao vaso lesado pelo aumento da afinidade aos seus ligantes (colágeno e fibronectina), ocorrendo o recrutamento de novas plaquetas.

Durante a reparação da lesão de vasos sanguíneos, as plaquetas sofrem uma série de reações fisiológicas e bioquímicas que compreendem uma etapa primária reversível e uma secundária irreversível. O agente fisiológico que parece responsável pela agregação de plaquetas é o ADP, que é liberado de eritrócitos lisados ou de plaquetas durante a exposição a colágeno ou ao ADP. Outros efetores fisiológicos de agregação são a trombina, e possivelmente a adrenalina, ambas atuando por liberação de ADP das plaquetas (KARPATKIN, ZUCKER, 1976).

O fibrinogênio presente se liga aos receptores específicos da membrana plaquetária, permitindo que as plaquetas permaneçam ligadas, e esta ligação são facilitadas pela presença do Cálcio plasmático e o inter-plaquetário, intervindo na mudança da forma e na emissão dos pseudópodos, ativando a movimentação dos grânulos e a secreção. A fase de secreção inicia-se assim que um fator agonista (trombina ou colágeno) se liga à membrana celular, modificando as proteínas do aparelho contrátil, tendo como ação a síntese de prostaglandina e o aumento do Cálcio, forma-se também o tromboxane A₂ que por sua vez acelera a liberação de ADP, facilitando a agregação de novas plaquetas.

Em contrapartida, são aumentados os níveis de prostaciclina que tem efeito inibidor sobre a ativação plaquetária, cujo papel é evitar que a agregação se propague além do necessário, completado este processo é conhecido como mecanismo de ativação plaquetária (RAPPAPORT, 1978).

2.2.4 Função Plaquetária

As plaquetas têm uma importante função de manter íntegras as paredes vasculares, possivelmente através da formação de tampões plaquetários e penetrando no citoplasma das células endoteliais vasculares. A função fagocitária, onde as plaquetas têm a propriedade de aderir a uma série de elementos vivos ou inanimados, como por exemplo, bactérias, vírus, esporos, complexos antígeno-anticorpo, e outros.

A função de adesão plaquetária, que é uma propriedade única das plaquetas de ocorrer uma perda de continuidade no endotélio vascular, esta propriedade é fundamental para o desencadeamento do tampão hemostático.

E a agregação plaquetária, função em que as plaquetas se aderem ao colágeno, liberam ADP, além dos outros produtos plaquetários, este fenômeno leva à modificação da forma das plaquetas que, de discos lisos, transformam-se em esferas com espículas, expondo o fator plaquetário 3, desencadeando a via intrínseca da coagulação.

Outras funções menos conhecidas, relacionados com a coagulação do sangue, quando após a reação de agregação, expõem em suas superfícies o fator 3 plaquetário, desencadeando o mecanismo intrínseco da coagulação (KARPATKIN, 1976).

2.3 Concentrados de Plaquetas

A transfusão de plaquetas é usada em pacientes com baixa contagem de plaquetas (trombocitopenia), distúrbio da função plaquetária, que apresentam sangramento ativo (uso terapêutico), ou naqueles que estão sob sério risco de apresentar sangramento (uso profilático).

A relação entre o efeito hemostático da transfusão de plaquetas e a necessidade de se alcançar aumento sustentado na contagem plaquetária já é conhecido de longa data, ou seja, o efeito hemostático somente é alcançado quando as plaquetas transfundidas são viáveis e permanecem na circulação do receptor em números suficientes para manter uma adequada contagem plaquetária (ZAGO, 2001).

Os concentrados de plaquetas (CP) podem ser obtidos pelos processadores automáticos de células sanguíneas em sistema de aférese, ou como unidades randômicas, a partir de unidades individuais de sangue total, pelos métodos do *buffycoat* ou do plasma rico em plaquetas (PRP). Para garantir a eficácia esperada em uma transfusão de CP é fundamental a preservação da sua função hemostática, que envolve um controle de qualidade dos processos de coleta, produção e armazenamento destes hemocomponentes.

As plaquetas são expostas a vários estímulos mecânicos e químicos que podem levar à sua ativação precoce (coleta, manipulação, temperatura, relação do volume plasmático) e, além disso, durante o armazenamento um crescente número de plaquetas chega a sua meia vida, produzindo metabólitos gerando meio desfavorável à viabilidade plaquetária (TOSTES, 2008).

2.4 Coleta por Aférese

Sobre o procedimento de aférese, sabe-se que nos primeiros anos da prática transfusional, o sangue total era coletado em recipientes que proporcionavam poucas possibilidades de manipulação e conservação, sendo possível somente à separação da série vermelha e plasma para uso imediato. Durante a Segunda Guerra Mundial, Cohn e Co/s, desenvolveram um método de preparação de proteínas plasmáticas, após o término da guerra aperfeiçoa-se a técnica desenvolvendo um equipamento que permitia a separação das hemácias do plasma, denominado centrífuga de Cohn. Em 1950 com o advento das bolsas plásticas houve melhorias no programa de plasmaférese manual.

Em 1960, Skog e Adams relataram a eficácia da plasmaférese manual em um paciente com macroglobulinemia de Waldeström, visualizando uma maior

possibilidade de separar o sangue total em componentes sanguíneos e utilizá-los para suprir deficiências celulares específicas, iniciou-se uma nova era na medicina transfusional, proporcionando a aplicabilidade da tecnologia de aférese também para fins de doação voluntária e terapia transfusional (REGO, SANTANA, 2007).

Aférese baseia-se em processo automatizado de centrifugação *in line* com devolução ao doador dos elementos sem interesse, neste caso (plasma e hemácias), obtém-se número de plaquetas similar ao obtido em 6 a 12 unidades de CP unitárias da doação convencional de doadores diferentes, equivalem a 3×10^{11} plaquetas em 200 a 300 ml de plasma, sempre obedecendo à regra de $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas para cada 40 ml de plasma no mínimo. Após a obtenção das plaquetas a bolsa deve ficar em repouso por 1 hora e em seguida armazenado sob agitação constante, posicionada a 45° em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, por até cinco dias.

2.5 Criopreservação

Nas últimas três décadas, os serviços de hemoterapia tiveram que se adaptar ao curto período de validade dos concentrados de plaquetas e o aumento significativo do consumo. Diversas formas de manutenção e melhoria dos estoques de CPs já foram citadas na literatura, com o aumento da produção excedente e de doações por aférese, mas todas ocasionando o descarte excessivo do produto, com concomitante necessidade de descarte por vencimento do prazo de validade, e o consequente aumento dos custos para os serviços de hemoterapia (JOUR, 1998).

Uma forma para armazenar CPs por períodos mais prolongados seria a sua criopreservação, que tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de diminuir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos prolongados, e permitindo a retomada do metabolismo celular normal após o descongelamento (CASTRO, 2011). No entanto, essa técnica apresenta inconveniências, como a necessidade de manipulação do hemocomponente, a adição e remoção do crioprotetor, os custos do armazenamento e o aparecimento de lesões plaquetárias irreversíveis induzidas pelo processo de congelamento (LANDI, 2004).

O processo de criopreservação pode ser realizado por dois métodos, o congelamento lento e a vitrificação. Independentemente do método utilizado, a criopreservação baseia-se em cinco etapas fundamentais: exposição ao crioprotetor, resfriamento de forma gradual ou súbita, armazenamento, descongelamento e diluição ou remoção do crioprotetor (CASTRO, 2011).

O resfriamento de células a temperaturas pouco superior a 0°C reduz o seu metabolismo, mas não abole, de modo que as células continuam a sofrer um processo de deterioração progressiva, apenas em menor velocidade. Os efeitos mais conhecidos do resfriamento são a diminuição da atividade da bomba de sódio, a mudança de fase dos lipídios de membrana, e a precipitação de substâncias que podem resultar em alterações da composição das soluções e pH.

O sucesso dessa técnica depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, que envolvem tanto questões físicas, como o volume da solução de criopreservação e as taxas de resfriamento, quanto questões químicas referentes à composição da solução de criopreservação, soluções essas conhecidas como ACPs (agentes crioprotetores). A descoberta acidental da ação crioprotetora de compostos químicos ocorreu durante as tentativas para preservar espermatozoides de aves, que revolucionou os métodos de criopreservação de diversas células e tecidos. Os ACPs são substâncias de classe orgânica variada, que agem protegendo a célula durante o período de armazenagem em baixas temperaturas. Dependendo do local de ação, os ACPs podem ser classificados como intracelulares ou extracelulares (DE SANTIS & PRATA, 2009; CASTRO, 2011).

Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem capacidade de penetrar nas células, dentre os quais se destacam o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido e o propanodiol por apresentarem uma capacidade de penetração superior ao glicerol e com toxicidade relativamente baixa.

Contudo, seu uso e eficiência podem variar conforme o tipo de célula e o tempo de exposição antes do processo de criopreservação.

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto obtido facilmente como subproduto da indústria de extração de celulose, motivo pela qual era utilizado em grande escala com fins industriais, mas no início do século passado já era utilizado na medicina, porém sem tantas comprovações científicas. (SHIRLEY et al, 1978).

A composição do DMSO é de uma fórmula química C_2H_6SO , com peso molecular de 78g/mol e temperatura de congelamento de 18,5°C. Tem capacidade de interagir com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios, proteínas e vários fármacos sem alterar, de forma irreversível, a configuração celular. Essa substância é considerada relativamente atóxica, tendo seus metabólitos também baixo potencial de toxicidade não apenas para as células, atuando em vias metabólicas, sendo oxidado em dimetilsulfona ($DMSO_2$), conhecida com metilsulfonilmetano (MSM), um importante metabólito utilizado como fonte de enxofre na síntese de metionina, sendo eliminado por via urinária ou podendo ser reduzido pela DMSO-redutase em dimetilsulfuro (DMS), um produto volátil que é eliminado pelos pulmões (CASTRO, 2011).

As técnicas laboratoriais de criopreservação celular utilizam o DMSO pela sua função crioprotetora, adicionado à suspensão celular a ser criopreservada. O DMSO atua diminuindo a disponibilidade de água livre, o que reduz a possibilidade de formação de cristais de gelo, a função deste agente parece ser essencialmente coligativa, ou seja, de “captura” das moléculas de água livre, o que leva a redução da quantidade de gelo formada, diminuição da temperatura do ponto de congelamento e aumento do ponto de vitrificação. Esta substância penetra em tecidos e células numa velocidade maior que outros crioprotetores, por isso recomendam-se sua adição lenta à suspensão celular e início do congelamento tão logo tenha terminada a adição (DE SANTIS & PRATA, 2009). No presente estudo, optou-se por usar o agente crioprotetor DMSO à concentração de 5%, o que resulta em menor volume desse agente no produto final, de modo que diminui a necessidade de sua remoção.

3 JUSTIFICATIVA

A criopreservação de plaquetas obtidas por aférese se justifica para aumentar a validade dos CPs, que em regra é de apenas 5 dias, pois é um hemocomponente sob constante demanda em hospitais que dispõem de serviços de hematologia e de transplante. No Hemocentro de Ribeirão Preto, o índice de descarte foi de 13% em 2017 de plaquetas obtidas por aférese. A tecnologia de criopreservação irá facilitar o processo de transfusão plaquetária em situações críticas como estoques baixos ou em pacientes com fenótipos raros e eventual refratariedade imune à transfusão de CP.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito da criopreservação de plaquetas quanto às suas características funcionais, utilizando o crioprotetor DMSO à concentração de 5%, em freezer -80°C.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de *swirling*, número de plaquetas, leucócitos e pH;
- Análises imunofenotípicas por citometria de fluxo para CD61, CD62P e anexina V;
- Análises bioquímicas com a dosagem do DHL livre e glicose;
- Avaliação microbiológica;
- Testes funcionais de microagregação e de retração plaquetária;

5 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 20 unidades de concentrado de plaquetas coletadas por aférese (CPAF), já no quinto dia do armazenamento e que não foram encaminhadas para o processo transfusional devido ao curto período de validade. Este trabalho foi submetido ao comitê de ética, projeto aprovado nº100583/2015, segundo a solicitação não houve necessidade de aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido aos doadores das bolsas de CPAF utilizadas.

Seguindo a técnica desenvolvida neste trabalho, as bolsas foram encaminhadas ao estudo e logo submetidas à redução de volume, por meio de centrifugação, acrescido DMSO na proporção de 5%, antes do congelamento em freezer a -80°C e, após 2 a 6 semanas foi realizado descongelamento em Banho Maria a 37°C. Foram coletadas amostras em quatro fases do processamento: **Fase I** – pré-redução de volume, **Fase II**- pós-reposo, agitação e acrescido DMSO, **Fase III**- pós-descongelamento e **Fase IV**- após 2 horas de descongelamento e agitação, como mostra a figura 5.1 de modelo experimental do protocolo de criopreservação de plaquetas.

5.1 Modelo experimental do protocolo de criopreservação de plaquetas

5.2 Redução de volume do concentrado de plaquetas por aférese

As unidades de CPAFs não utilizadas até o quinto dia de validade são descartadas no sistema de banco de sangue (SBS). Neste momento, as bolsas, foram encaminhadas para este estudo, onde foram coletadas amostras para testes da **Fase I** e submetidas à redução do volume de plasma da seguinte forma:

- ✓ Realizada conexão estéril com bolsa de transferência para retirada do plasma. Colocadas as bolsas em centrífuga Sorvall (modelo 3C RC Plus) para a separação do botão plaquetário;
- ✓ Após a centrifugação, extrai-se manualmente o plasma, mantendo na bolsa mãe um volume de 95 ml;
- ✓ Selado os tubos separando as bolsas, armazenando a bolsa de plasma removido, em freezer (-20°C) e a bolsa de CPAF reduzida colocada em repouso por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida colocada em agitação constante por no mínimo 1 hora á $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ou até as plaquetas se desagregarem. Coletado amostras da **Fase II**;
- ✓ Após processo da redução de volume, o concentrado de plaquetas por aférese possui validade de até 4 horas, devido a esta curta validade os CPAF foram congelados logo após 1 hora de agitação.

5.3 Infusão da solução crioprotetora e congelamento

Posterior a técnica de redução de volume e coletado amostras para **Fase II**, transferido, por conexão estéril, o volume de 95 ml para uma bolsa de plaquetas do Kit de coleta convencional (bolsas triplas da marca Fresenius Kabi), apropriada para armazenamento de plaquetas e congelamento de PRP/Crioprecipitado. Em fluxo laminar, as bolsas de plaquetas receberam um *sampling site* para infusão de 5 ml da solução crioprotetora DMSO a 5% lentamente, em banho de gelo.

Após infusão a bolsa foi colocada em estojo de metal e congelada imediatamente em freezer -80°C em sistema de congelamento lento, que produz uma curva muito próxima de -1°C/min, e armazenada por 2 a 6 semanas.

5.4 Descongelamento

Após o período de armazenamento, as bolsas foram descongeladas em banho maria a 37°C, dentro de saco plástico protetor e sem movimentação, por no máximo 10 minutos. Coletadas amostras da **Fase III**, verificado presença de *swirling*, incubado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ em agitador constante por 2 horas. Coletadas amostras da **Fase IV**, com posterior descarte da bolsa.

5.5 Análise visual e avaliação do pH

Verificação do *swirling* plaquetário: com a bolsa de plaquetas em mãos, homogeneizado e invertido contra a luz branca, para visualização de uma nuvem cintilante indicando presença de *swirling* positivo e integridade plaquetária, realizado em todas as fases.

Para avaliação do pH, foi utilizado Phmetro digital: após calibração diária, retirado o eletrodo da solução de KCl, lavado com água destilada e enxugado com lenço de papel ou gaze. Homogeneizado a amostra de plaquetas e introduzido o eletrodo no tubo, que deve ficar todo submerso na amostra. Apertar a tecla READ e aguardado a estabilização da leitura.

5.6 Controle Microbiológico

Por meio de conexão estéril e bolsa de transferência, foram coletados 10 ml para realização da cultura de duas fases, a **fase I** antes da redução do volume e **fase III** pós-descongelamento. Em fluxo laminar, foi feita a desinfecção com álcool 70% do fluxo e dos frascos de cultura BacTec Standard/10 Aerobic/F (BD). Com o auxílio de seringa e agulha foi inoculado o volume de 8 a 10 mL, os frascos mantidos a 35°C em equipamento BACTEC FX. Os resultados foram considerados negativos, segundo o software EpicenterFx, quando não houve crescimento bacteriano após 7 dias de incubação, caso contrário, a identificação do patógeno seria realizada de acordo com a metodologia convencional, coloração de Gram e cultivo para identificação.

5.7 Determinação da contagem de plaquetas e volume plaquetário médio

A contagem e a determinação do volume plaquetário médio (VPM) foram realizadas em equipamento[®] Sistema 2120i ADVIA com Autoslide, com metodologia padrão de citometria de fluxo peroxidase, por meio de diluição 1:2 com diluente específico SunRise, pois as amostras são concentrados de plaquetas. Realizado cálculo do número absoluto de plaquetas por bolsa, utilizando volume inicial e final do processamento, descontando o peso da bolsa de transferência.

5.8 Avaliação da contagem de leucócitos

Determinou-se o número de leucócitos em cada amostra de concentrado de plaquetas, somente na primeira fase, devido às bolsas de CPAF já serem coletadas como leucorreduzidas, realizado a contagem por meio de câmara de Nageotte e diluição com líquido de Turk (1:2), cada câmara preenchida com uma amostra individual e deixada em repouso em câmara úmida por 15 minutos, e calculou-se o número total de leucócitos por ml com base da equação:

Número total de Leucócitos = $L \times P \times D / A$, onde:

L = número de leucócitos contados;

P = profundidade da câmara (0,1 mm);

D = fator de diluição;

A = volume do campo de contagem (40 retângulos = 50µl).

5.9 Caracterizações imunofenotípica por citometria de fluxo

A caracterização das plaquetas foi realizada por citometria de fluxo com auxílio do equipamento BD FACS Calibur e do Software Cell Quest Pro. Para este ensaio foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: CD61, CD62P, anexina V e PI.

Como controle dessas análises foi utilizado isotipos de imunoglobulinas mouse G1 conjugados com FITC (do inglês, fluorescein isothiocyanate) e PE (do inglês, phycoeritina). Para avaliação da população e ativação plaquetária, nas quatro fases, foi utilizado 1 ml da suspensão plaquetária. Em tubos de polietileno 12 x 75 mm, previamente identificados com os diferentes marcadores, as amostras foram diluídas para CD61 e CD62P, utilizando 20µl das amostras em 1 ml de PBS formol 10%, permanecendo por 2 horas em geladeira.

Após formalização, foi realizado duas lavagens com 2 ml de PBS 10%, em centrifugação de 1800 rpm por 3 minutos, para marcação de CD61 e CD62P, no mesmo tubo, pois são fluorescências diferentes, assim utilizando o segundo tubo como gama (γ) controle. O sobrenadante retirado na segunda lavagem, e o botão suspenso com 5µl de CD61 (FITC) e 5µl de CD62P (PE), colocado em repouso por 15 minutos ao abrigo da luz, e após, lavado com PBS 10%, descartando sobrenadante e promovendo a leitura da amostra.

Para a marcação da anexina V, as amostras não foram formalizadas e mantidas em temperatura ambiente. Foram utilizados 100µl das amostras em pesquisa com 300µl do tampão de ligação (diluído 1:10), marcadas com 5µl de anexina V (FITC), e após incubadas por cinco minutos ao abrigo da luz, e acrescentado 5µl de tampão PI (FL3) e em seguida realizadas as leituras.

5.10 Avaliação da formação de microagregados

Os concentrados de plaquetas foram coletados nas 4 fases do processo, realizado leitura em equipamento contador automático de células (Advia 2120i

Hematology System). Após os resultados da contagem, foi realizado o teste de microagregação, onde foi adicionado a 300µl de tampão de Tyrode modificado, um volume correspondente da amostra de concentrações de 3×10^6 e de 6×10^6 de plaquetas. Tratado com 6µl (0,25UI) de trombina e centrifugados a 400 x g por 10 minutos à 37°C. Após centrifugação invertido material em placa CELLSTAR® e observado em microscópio invertido de luz. Imagens foram capturadas com a câmera digital Olympus DP72 e analisados com o auxílio do Software Cell F (Olympus).

5.11 Avaliação da formação e retração do coágulo

Foi utilizado plasma pobre em plaquetas (PPP), obtido após centrifugação de tubos de amostragem de sangue periférico humano a 800 x g por 10 minutos a 22°C. Estes tubos foram obtidos das coletas de amostras destinadas para execução de hemograma durante a doação voluntária de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto, gentilmente cedido pelo Laboratório de Anemias Hereditárias para realização deste trabalho.

Utilizaram-se 100µl de PPP para diluir o volume de amostra equivalente a 3×10^6 de plaquetas, coletadas nas quatro fases do trabalho, utilizando tubos de vidro previamente siliconados. O PPP diluído foi tratado com 10µl de trombina (0,25UI), para induzir a formação do coágulo, e incubados em Banho Maria a 37°C por 30 minutos à 1 hora. Após esse tempo invertido em placa para análise microscópica.

O coágulo formado foi observado em microscópio invertido de luz, imagens capturadas com a câmera digital Olympus DP72 e analisados com o auxílio do Software Cell F (Olympus), analisados como positivo para formação e retração ou ausente sem a presença do coágulo.

5.12 Análise de DHL e glicose

Após coleta das amostras de cada fase, foi realizado uma centrifugação de 2 ml do concentrado de plaquetas, a 800xg por 10 minutos a 22°C, para precipitar as

plaquetas e obter o plasma sobrenadante. Este plasma foi separado no máximo em 1 hora e congelado em freezer comum -20°C, para posterior realização dos testes.

Para dosagem de Desidrogenase Láctica (DHL) em método UV otimizado (equipamento CT 600 Thermo Fisher Wiener lab, kit Wiener LDH UV) já com o plasma descongelado, foi pipetado 1,0 mL do reagente de trabalho em um tubo 12x75 de polietileno, adicionado 0,02 mL de amostra, homogeneizado e transferido imediatamente para a cubeta termostatzada. Após 1 minuto, realizado a leitura da absorbância inicial em comprimento de onda 340 ± 2 nm, disparando simultaneamente o cronômetro, e repetido a leitura após 2 minutos, calculado o valor final em U/L.

Para dosagem de Glicose em método enzimático no mesmo equipamento e com o kit Glicemia Wiener Lab, com 3 tubos de ensaio (branco/teste/padrão), foi pipetado 1 ml de reagente em cada tubo, 1 ml de amostra no teste e 1 ml de padrão no tubo padrão. Incubado por 10 minutos em banho Maria 37°C. Realizada leitura em absorbância em 505 nm. O cálculo do valor de glicose foi obtido através do valor da absorbância do teste dividido pelo valor da absorbância do padrão e multiplicando pela concentração da glicose do padrão (100 mg/dl), obtendo glicose em mg/dl.

5.13 Análise dos resultados

Para análise estatística utilizou-se o programa Graphpad Prism 5, com aplicação do Teste de Wilcoxon pareado, para maioria dos resultados comparando as fases pré e pós-congelamento, e somente para os dados dos marcadores de anexina V+PI+ e DHL que foi utilizado e Teste-t pareado, devido as análises serem de distribuição normal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

6.1 Análise visual e avaliação microbiológica

O primeiro parâmetro avaliado foi análise visual da presença do *swirling* plaquetário, com resultados positivos obtidos mesmo após o descongelamento, e a ausência de grumos durante todo o processo.

Os testes microbiológicos mostram-se negativos nas fases realizadas (I e III), sem positividade no sistema BacTec Fx, em todas as unidades criopreservadas, sendo assim não se fez necessário realizar nenhum outro teste de cultivo para identificação.

6.2 Resultados obtidos nas quatro fases

A tabela abaixo apresenta as medianas dos resultados obtidos neste estudo, para avaliar a qualidade dos concentrados de plaquetas criopreservados nas quatro fases, considerando críticas para esta metodologia as fases II e III (pré e pós congelamento).

Tabela1. Dados das quatro fases expressos em mediana e amplitude.

	FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV
N° de plaquetas	2,84X10¹¹ (2,14 - 3,92)	3,04X10¹¹ (2,24 - 4,03)	2,27X10¹¹ (1,16 - 3,75)	2,05X10¹¹ (1,10 - 3,64)
VPM	7,3 (5,8 - 9,0)	7,3 (5,4 - 9,2)	8,8 (7,4 - 9,6)	9,0 (7,6 - 10,3)
CD61+ (%)	99 % (95 - 99)	99 % (89 - 99)	97 % (84 - 99)	97 % (89 - 99)
CD62P+ (%)	15 % (5 - 59)	23 % (7 - 77)	44 % (10 - 88)	28 % (13 - 93)
Anexina V+ (%)	16 % (9 - 25)	13 % (8 - 21)	11 % (8 - 34)	9 % (6 - 22)
Anexina V+ PI+ (%)	40 % (22 - 51)	44 % (28 - 53)	53 % (39 - 61)	57 % (45 - 64)
LDH (U/l)	538 (88- 1290)	747 (4 - 3079)	1428 (662 - 2303)	1669 (662 - 2127)
Glicose (mg/dL)	227 (1 - 396)	217 (3 - 365)	192 (2 - 352)	196 (2 - 362)
pH	7,397 (6,968 - 7,783)	7,214 (6,890 - 7,672)	7,185 (6,076 - 7,528)	7,133 (6,083 - 7,449)

6.3 Comparação entre as fases críticas (II e III) de criopreservação

A mediana do período de congelamento e descongelamento das CPAF foi de 17 dias (10 a 40 dias), não houve diferença significativa entre as bolsas criopreservadas no mínimo de 10 dias e no máximo de 40 dias.

Tabela 2. Mediana dos testes realizados para fases pré e pós-congelamento com análise estatística.

	FASE II pré	FASE III pós	p
N° de plaquetas	3,04X10¹¹ (2,24 - 4,03)	2,27X10¹¹ (1,16 - 3,75)	< 0, 0001
VPM	7,3 (5,4 - 9,2)	8,8 (7,4 - 9,6)	< 0, 0001
CD61+ (%)	99 % (89 - 99)	97 % (84 - 99)	0, 027
CD62P+ (%)	23 % (7 - 77)	44 % (10 - 88)	0, 067
Anexina V+ (%)	13 % (8 - 21)	11 % (8 - 34)	0,33
Anexina V+ PI+ (%)	44 % (28 - 53)	53 % (39 - 61)	0, 0007
LDH (U/l)	747 (4 - 3079)	1428 (662 - 2303)	0, 055
Glicose (mg/dL)	217 (3 - 365)	192 (2 - 352)	<0, 0001
pH	7, 214 (6, 890 - 7, 672)	7, 185 (6, 076 - 7, 528)	<0, 0001

6.4 Volume, concentração de plaquetas e leucócitos

A mediana de volume das 20 unidades de CPAF utilizadas neste trabalho na fase I foi de 276 ml (192-304 ml) e a mediana de plaquetas/U de $2,8 \times 10^{11}$ ($2,23 - 3,92 \times 10^{11}$), após a criopreservação a mediana do volume foi de 115 ml (107-123 ml) e o a mediana de plaquetas/U de $2,22 \times 10^{11}$ ($1,16 - 3,75 \times 10^{11}$), obtendo valor de $p < 0, 0001$. O número absoluto de plaquetas por unidade criopreservada caiu de $3,04 \times 10^{11}/U$ na fase II para $2,27 \times 10^{11}/U$ na fase III (redução de 25,32%). Todos concentrados de plaquetas obtidos por aférese utilizados neste estudo estavam

leucorreduzidos, continham menos do que 10^6 de leucócitos por unidade, não influenciando os resultados, uma vez que ele não altera a porcentagem de recuperação plaquetária e não interfere nos testes funcionais.

Gráfico 1. Análise dos dados do número absoluto de plaquetas criopreservadas nas fases pré e pós-congelamento.

6.5 Análise do pH

No processo de pré-congelamento obteve mediana de 7,214 (6,890-7,672) e pós-descongelamento mediana de 7,185 (6,076-7,528), não houve alteração significativa do pH entre as fases II e III ($p=0,0005$).

Gráfico 2. Análise do pH na fase pré e pós-congelamento.

6.6 Ativação plaquetária

Na análise da expressão do marcador CD62P+, as plaquetas apresentaram positividade de 23% (7-77%) na fase II e aumentaram para 44% (10-88%) na fase III ($p=0,067$), indicando alterações morfológicas e ativação plaquetária.

Gráfico 3. Análise do processo de ativação por meio do marcador CD62P+ nas fases pré e pós-congelamento.

6.7 Análises do marcador anexina V+

Não se verificou aumento do índice de apoptose, mostrada pela marcação da anexina V de 13% (8-21%) na fase II para 11% (8-34%) na fase III ($p=0,33$).

Gráfico 4. Análise imunofenotípica para marcador anexina V+ nas fases pré e pós-congelamento.

Através da combinação dos marcadores Anexina V+ e PI+, foi avaliado a apoptose tardia, encontramos a porcentagem de plaquetas que expressaram positividade para estes marcadores de 44% (28-53%) para fase II para 53% (39-61%) para fase III ($p=0,0007$).

Gráfico 5. Análise imunofenotípica de anexina V+ e PI+ nas fases pré e pós-congelamento.

6.8 Avaliações do metabolismo plaquetário

Na dosagem de desidrogenase láctica (DHL) apresentou aumento nos resultados das fases pré e pós-congelamento, podendo estar ligado ao processo de mudanças morfológicas e apoptose tardia, com mediana de 747,5 U/L (4-3079 U/L) na fase II para 1.428,5 U/L (662-2303 U/L) na fase III ($p=0,55$).

Gráfico 6. Dosagens de DHL para fases pré e pós-congelamento.

Para dosagem de glicose nota-se uma diminuição dos resultados no decorrer dos testes, obtendo as medianas de 217,5 mg/dL (3-365 mg/dL) na fase II para 192,5 mg/dL (2-352 mg/dL) na fase III com valor de $p=0,0001$ apresentando significância estatística, mas baixa relevância para aplicabilidade da técnica.

Gráfico 7. Análises dos resultados da glicose livre no plasma nas as fases pré e pós-congelamento.

6.9 Microagregação e Retração do coágulo

Para análises de função plaquetária, foram realizados os testes de retração de coágulo (ANEXO I) e o microagregação, com resultados positivos em todas as fases testadas na mínima concentração de células (ANEXO II).

6.10 Pós-criopreservação

Foi acrescentada a fase IV neste estudo, notando-se uma necessidade de qual seria o tempo hábil para manipulação da bolsa e direcionamento para transfusão, implicando em um possível período de validade pós a criopreservação, também para avaliar se a concentração de DMSO não levaria a maiores danos quando a temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, resultados dispostos tabela abaixo.

Tabela 3. Expressão das medianas e análise estatística entre as fases pós-congelamento e após 2 horas de armazenamento.

	FASE III pós	FASE IV 2 horas	p
N° de plaquetas	2,27X10¹¹ (1,16 - 3,75)	2,05X10¹¹ (1,10 - 3,64)	0,004
VPM	8,8 (7,4 - 9,6)	9,0 (7,6 - 10,3)	0,1
CD61+ (%)	97 % (84 - 99)	97 % (89 - 99)	0,33
CD62P+ (%)	44 % (10 - 88)	28 % (13 - 93)	0,07
Anexina V+ (%)	11 % (8 - 34)	9 % (6 - 22)	0,086
Anexina V+ PI+ (%)	53 % (39 - 61)	57 % (45 - 64)	0,24
LDH (U/l)	1428 (662 - 2303)	1669 (662 - 2127)	0,84
Glicose (mg/dL)	192 (2 - 352)	196 (2 - 362)	<0,0001
pH	7,185 (6,076 - 7,528)	7,133 (6,083 - 7,449)	<0,0001

7 DISCUSSÃO

Quando realizado a análise visual da presença de *swirling* em todas as fases apresentaram resultados positivos, implicando que existe integridade plaquetária mesmo após a criopreservação, e sobre a ausência de grumos mesmo após o descongelamento, acredita-se estar ligado a utilização da bolsa de plaquetas do kit de coleta convencional de bolsas triplas pois, ele é mais adequado para o processo de congelamento devido a sua fabricação ser direcionada também pra produção de crioprecipitado, diferente do kit de obtenção de plaquetas por aférese que são indicados para armazenamentos com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os resultados negativos para os testes microbiológicos em todas as unidades aqui testadas nas fases I e III mostraram que a esterilidade do processo de produção e armazenamento da fase inicial foi mantida mesmo após o processo de criopreservação, confirmando a hipótese deste estudo como forma de prolongar a validade sem levar a riscos de contaminação. Sendo assim não se fez necessário a realização de outros testes de identificação microbiológica, pois os resultados foram cem por cento negativos na cultura automatizada no sistema Bact Fx durante a incubação no período de 7 dias.

Sobre o período de armazenamento em freezer -80°C , as bolsas foram mantidas por no mínimo 10 dias e no máximo de 40 dias, tempo este estipulado conforme a disponibilidade das bolsas para realização deste trabalho. Todas CPAFs foram processadas e analisadas pela mesma metodologia aqui descrita, não implicou em nenhuma alteração que estivesse ligada ao período em que as bolsas ficaram criopreservadas.

Avaliando a concentração de plaquetas em números absolutos por unidade, encontramos uma mediana de $2,84 \times 10^{11}$ ($2,14 - 3,92 \times 10^{11}$) para fase I e $3,04 \times 10^{11}$ ($2,24 - 4,03 \times 10^{11}$) para fase II, notou-se um discreto aumento da concentração de plaquetas por unidade, pois a técnica de redução de volume concentrou as plaquetas após a remoção do plasma. A mediana de volume neste trabalho na fase I foi de 276 ml (192-304 ml) e para fase II 115 ml (107 – 123 ml). Na fase III

encontramos em número de plaquetas/U de $2,27 \times 10^{11}$ ($1,16 - 3,75 \times 10^{11}$) mostrando que não houve perda relevante entre as fases críticas do congelamento.

A porcentagem da perda de plaquetas foi de 7,4% comparando as fases pré e pós criopreservação, sendo inferior a encontrada em literatura, segundo os autores que fizeram o uso de DMSO a 5%, a menor porcentagem de perda foi 15% observada por FUNKE et al. (1995), de 19% por SCHIFFER et al. (1976) e 21% para SPECTOR et al. (1977). Os resultados obtidos neste estudo não implicaram na qualidade final do hemocomponente e não se justifica a perda devido ao processo de criopreservação com o uso do DMSO a 5%, podendo estar ligado a mudança de bolsas que antecede a fase de congelamento.

Junto da avaliação da concentração de plaquetas, notou-se a importância de analisar o VPM (volume plaquetário médio), que representa a integridade da membrana destas células. Neste estudo o VPM nas fases pré-congelamento (fase II) teve mediana de 7,3fl (5,4 – 9,2 fl) e nas fases pós-congelamento (fase III) mediana de 8,8fl (7,4 – 9,6 fl), fases consideradas críticas na técnica de criopreservação, não mostrando alteração significativa com $p < 0,0001$, mesmo com o processo de congelamento com uso do DMSO. Os resultados foram concordantes ao encontrado em literatura, onde os valores de referência para fases de criopreservação em trabalhos como o de LANDI (2003) mostrou valores próximos de 6,5 e 9,6 fl para as fases pré e pós-congelamento respectivamente, mas o autor atribuiu essa mudança significativa entre as fases, a técnica utilizada em seu trabalho, pois o DMSO não altera a morfologia plaquetária.

Para análise de pH os resultados foram mantidos acima de 6,4 até o último dia de armazenamento como recomenda a Portaria GM- MS nº 158 em anexo VI. Na fase I o pH mediano de 7,397 (6,968 – 7,783) mostrou a boa relação entre a concentração de plaquetas coletadas *versus* volume plasmático para o concentrado de plaquetas obtidos por aférese. Na fase II notou-se discreta diminuição do pH para mediana de 7,214 (6,890 – 7,672) após redução do volume plasmático, tornando possível uma interpretação de que o volume final escolhido neste estudo, foi satisfatório para não alteração significativa do pH. Nas fases III e IV houve uma diminuição nos valores da mediana para 7,185 (6,076 – 7,538) e 7,133 (6,083 –

7,449) respectivamente, valor de $p < 0,0001$, alteração esta esperada já que a plaqueta foi mantida com DMSO após descongelamento, durante 2 horas armazenadas a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, mas não significativa que implica-se na não utilização do hemocomponente ao final da fase IV.

Na avaliação da expressão das glicoproteínas de membrana específicas e integridade plaquetária, apresentou alta taxa de marcação de CD61+ de 99% (89-99%) fase II, pois trata-se de um concentrado de plaquetas obtidos por aférese, sendo um hemocomponente mais puro isento de outros tipos celulares, com valor de $p = 0,027$ para fases II e III, e uma discreta perda na fase III CD61+ de 97% (89-99%) devido a técnica de mudança de bolsa para congelamento acaba ocorrendo uma perda de plaquetas, assim reduzindo a porcentagem de marcadores positivos mas sem prejudicar a amostra final.

Na avaliação da porcentagem de ativação plaquetária utilizando marcador CD62P+, encontrou-se um aumento gradativo em cada fase. A literatura mostra que é esperado uma variação de 12% a 25% de plaquetas positivas para CD62P+ em concentrado de plaquetas coletados por aférese (METCALFE et al.; 1977). Os resultados das amostras iniciais (fase I) estão concordantes com a literatura, pois a mediana foi de 15% (5 - 59%) e todos os estudos apresentaram aproximadamente um percentual de ativação pré-congelamento de 20% para plaquetas de início de estoque, este estudo obteve melhores resultados em relação à literatura para as outras fases como, na fase pré-congelamento a mediana foi 23% (7 - 77%) CD62P+ e na fase pós-congelamento de 44% (10 - 88%). Segundo LANDI (2003) as plaquetas coletas “secas” e criopreservadas com DMSO a 5% apresentaram ativação de 59,1% CD62P+ pós criopreservação, ROTHWEEL et al. (2000) apresentou 41% de plaquetas ativadas pós criopreservação.

Ressaltamos que este estudo utilizou plaquetas de quinto dia de estocagem e obteve resultados de ativação menores que os encontrados em literatura, onde utilizaram plaquetas de dia zero ou plaquetas “secas”.

Ao contrário do marcador CD62P+, o marcador Anexina V+ tem seu aumento lentamente nos primeiros dias de estocagem e rapidamente após esse período,

pode não refletir os processos de ativação, mas sim o início da apoptose. Os resultados encontrados foram adequados conforme literatura, ou seja, $\pm 20\%$ Anexina V+, pois era esperado um grau de positividade para este marcador justificado pelo período de estocagem de cinco dias antecedente ao processo de criopreservação.

Para as fases críticas, o marcador Anexina V+ obteve mediana 11% (8 – 34%) pós-congelamento, resultados não significativos estatisticamente neste parâmetro ($p=0,33$), menor que outros estudos como o de LANDI (2003) que obteve Anexina V+ próximo a 30% em plaquetas “secas” e uso de DMSO 5%, e MATSUBAYASHI et al (1999) e SHAPIRA et al (2000), que apresentaram Anexina V+ aproximadamente a 10% para plaquetas obtidas de sangue total criopreservadas no dia zero.

Os concentrados de plaquetas obtidos por aférese no quinto dia podem apresentar resposta agregatória diminuída, além disso, o processo de criopreservação diminuiria ainda mais esta resposta, mas os testes funcionais aplicados neste estudo como microagregação e retração do coágulo apresentaram bons resultados para doses convencionais mínimas de 3×10^6 de plaquetas utilizadas para realização dos testes, com formação do coágulo e microagregados em tempo hábil e de fácil visualização em microscopia eletrônica (ANEXO I E II).

Na análise da taxa de células necróticas ou tardiamente apoptóticas, através da combinação dos marcadores PI+ e Anexina V+, encontramos resultados estatisticamente significantes, valor de $p=0,0007$ e mediana de 44% (28 – 53%) fase pré e 53% (39 – 61%) fase pós-criopreservação, não encontrado resultados em literatura para comparação, dado este acrescentado no trabalho como forma de colaboração de resultados.

Nas análises do metabolismo plaquetário, os resultados de DHL se encontraram elevados no decorrer das fases, estando diretamente ligado aos processos de lise plaquetária e apoptose tardia, concordante aos testes de citometria de fluxo para Anexina V+.

Na fase pré-congelamento encontramos uma mediana de 747,5 U/L (4 – 3079) e pós descongelamento 1428,5 U/L (662 – 2303%), com $p=0,55$, concordante

aos encontrados em literatura realizados com plaquetas “secas”, como o de LANDI (2003) que obteve 679,5 U/L na fase pré-congelamento e 2.018 U/L na fase pós-congelamento, porém os resultados de metabolismo plaquetário não tem sido comentado em outros trabalhos.

Em relação às dosagens de glicose notou-se uma discreta diminuição no decorrer das fases de criopreservação, o que correlacionamos ao processo de mudança de conformidade e ativação que reduz o metabolismo plaquetário e sua atividade metabólica, onde as plaquetas convertem 55% da glicose em lactato, implicando também no aumento do DHL como descrito anteriormente. O valor de $p < 0,0001$ apesar de ter significância estatística não se notou mudança nas fases críticas que impactassem na metodologia, pois na fase II apresentou mediana de 217mg/dL (3 – 365 mg/dL) e fase III 192mg/dL (2 – 352 mg/dL), não foi encontrado valores citados por outros autores.

Para os testes de função plaquetária, realizado com as técnicas de microagregação e retração de coágulo, obtendo resultados positivos em todas as fases das 20 unidades analisadas. Apresentou a formação de microagregados em doses mínimas 3×10^6 e máximas 6×10^6 de plaquetas, concordante com os testes imunofenotípicos que mostrou uma porcentagem de plaquetas íntegras.

Em todas as fases analisadas houve formação de coágulo, em tempo menor do que a técnica recomenda para incubação a 37°C , ou seja, plaquetas íntegras e funcionais em presença de plasma pobre em plaquetas ativaram quando estimuladas pela trombina. Resultados para melhor visualização foi disposto em tabelas no ANEXO I e II.

Neste estudo conseguimos obter um hemocomponente com uma maior concentração de plaquetas em um menor volume de plasma, além do uso de DMSO a 5%, mostrando que a concentração do mesmo foi adequada, não causando alterações no meio, sem sua remoção ou diluição do hemocomponente na fase final. Em parâmetros gerais as plaquetas criopreservadas neste estudo apresentaram resultados satisfatórios para futuramente ser passível de uso transfusional. Isso possibilita a modificação de um produto para fins transfusionais mais adequado e com menores interferentes.

8 CONCLUSÃO

- Para a metodologia de criopreservação de plaquetas, a técnica desenvolvida neste estudo, obteve resultados positivos em comparação com a literatura, mantendo os padrões necessários de esterilidade e qualidade para fins transfusionais, podendo ser utilizado como forma de prolongar a validade dos concentrados de plaquetas obtidas por aférese e a manutenção dos estoques em níveis críticos.
- Em relação a outros estudos, nota-se que as plaquetas obtidas por aférese do modo convencional com a adequação da relação volume de plasma versus a concentração de plaquetas é mais satisfatório para a técnica de criopreservação do que as plaquetas coletas “secas”, pois os resultados foram melhores, como visto na avaliação do pH e plaquetas em número, sem mudança significativa e dose transfusional final foi satisfatória.
- Nos concentrados de plaquetas obtidos por aférese criopreservados, apresentaram uma perda de plaquetas em número absoluto, evidenciado pelo processo de manipulação e troca de bolsas pela técnica de redução de volume e não pela metodologia de criopreservação.
- A metodologia de criopreservação apresentou discreto aumento na ocorrência de ativação plaquetária e apoptose tardia, quando comparados aos resultados pré congelamento (plaquetas de quinto dia). Porém, não refletiram negativamente no resultado final do potencial de adesão, ativação e agregação das plaquetas evidenciadas nos testes de função, microagregação e retração do coágulo.
- A utilização do crioprotetor DMSO a 5% foi bem aceito na técnica de criopreservação de plaquetas, pois não implicou em maiores estímulos de ativação e ocorrência de lise pós descongelamento, conclui-se pelos resultados de LDH e anexina V que se mantiveram próximos e com desvio padrão aceitáveis, além dos encontrados em literatura. Associando apenas uma baixa toxicidade do crioprotetor

quando armazenada as plaquetas em temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ pós-descongelamento e agitação (fase IV), mesmo assim as amostras responderam bem aos testes funcionais.

- Neste trabalho, não foi utilizado nenhuma solução aditiva além do crioprotetor, não se fez necessário à sua remoção, e também não se utilizou nenhum insumo de alto custo. Teve seu desenvolvimento todo realizado em laboratório de rotina de um Hemocentro, concluindo que esta técnica seja apta a utilização por qualquer serviço que necessite manterem-se os estoques fora dos níveis críticos.

- Nesta metodologia de criopreservação foi levantada a possibilidade de se obter um hemocomponente modificado e apto ao uso transfusional seguindo os critérios de qualidade necessários para uma gama de situações que os serviços de hemoterapia possuem como os fenótipos raros, estoques baixos, doadores sazonais e situações de emergências. Com resultados positivos esse estudo sugere que possam ser utilizados futuramente os concentrados de plaquetas obtidos por aférese no quinto dia e criopreservados, para fins transfusionais. Mas necessitando de mais estudos no seguimento de função da coagulação e incremento plaquetário na fase clínica.

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, D. CHAMONE, F. Fisiologia da coagulação do sangue. In: BORDIN, O.; JUNIOR, D.M.L.; COVAS, D, T. **Hemoterapia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. Cap.5, p.41-46.

ALVING, B.M.; REID, T.J.; FRATANTONI, J.C.; FINLAYSON, J. S. Frozen platelets and platelet substitutes in transfusion medicine. **Transfusion**, v.37, p.866-76, 1997.

ANGELINI, A.; DRAGANI, A.; BERARDI, A.; IACONE, A.; FIORITONI, G.; TORLONTANO, G. Evaluation of four different methods for platelet freezing. In vitro and in vivo studies. **Vox Sang**, v.62, p.146-51, 1992.

BALDUINI, C.L.; MAZZUCCO, M.; SINIGAGLIA, F.; GRIGNANI, G.; BERTOLINO, G.; NORIS, P. et al. Cryopreservation of human platelets using dimethyl sulfoxide and glycerol-glucose: effects on "in vitro" platelet function. **Haematologica**, v.78, p.101-4, 1993.

BARBOSA, M. H. et al. Risk factors associated with the occurrence of adverse events in plateletpheresis donation. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 3, p. 191–195, 2014.

BRASIL. Lei nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 25, 04 fev. 2016. Seção I, p.73-74.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n.2, n.p., pub. 957, Janeiro, 2011.

CASTRO, V. Aloantígenos plaquetários humanos. In: **Hematologia – fundamentos e prática**. 1. ed. São Paulo. Atheneu. cap. 2. p.193- 200. 2007.

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

FUNKE, I.; WIESNETH, M.; KOERNER, K.; CARDOSO, M.; SEIFRIED, E.; KUBANEK, B. ET AL. Autologous platelet transfusion in alloimmunized patients with acute leukemia. **Ann Hematol**, 71(4):169-73, 1995.

HORNSEY, V. S. et al. Freezing of buffy coat-derived, leukoreduced platelet concentrates in 6 percent dimethyl sulfoxide. **Transfusion**, v. 48, p. 2508–2514, 2008.

JOHNSON, L. et al. PAS-G supports platelet reconstitution after cryopreservation in the absence of plasma. **Transfusion**, v. 53, p. 2268–2277, 2013.

JOHNSON, L.; COOREY, C. P.; MARKS, D. C. The homeostatic activity of cryopreserved platelets is mediated by phosphatidylserine-expressing platelets and platelet microparticles. **Transfusion**, v. 54, p. 1917–1926, 2014.

JOHNSON, L. N. et al. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. **Cryobiology**, v. 62, n. 2, p. 100–106, 2011.

KARPATKIN, S.; ZUCKER, B. M. Bioquímica e função das plaquetas. In: **Hematologia**. 5°. ed. São Paulo, Guanabara Koogan, cap. 120-122, p 805- 817, 1976.

LANDI, E. P. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v. 25, n. 1, p. 39–46, 2003.

LORENZI, F. T. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 2°. ed. Rio de Janeiro, Editora Médica e Científica LTDA, cap. 1-5, 1999.

LOURENÇO, D. M.; Trombopoese e dinâmica das plaquetas. In: **Hematologia – fundamentos e prática**. 1. ed. São Paulo. Atheneu. cap. 7. p. 69- 73. 2007.

LOURENÇO, D. M.; Estrutura e funções das plaquetas e das células endoteliais. In: **Hematologia – fundamentos e prática**. 1. ed. São Paulo. Atheneu. cap. 71. p. 789-793. 2007.

MARTINI, R.; et al. Contaminação bacteriana em concentrados plaquetários: identificação, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e sepse associada à transfusão. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 682-685, 2010.

MASSUMOTO, C. M.; MIZUKAMI, S. et al. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n.2, p. 93-98, 1997.

ORELLNA, M, D. **Diferenciação megacariocítica *in vitro* de células-tronco embrionárias**, 2014. 155 f. Tese Doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

OTTOBONI, M, A, P. **Qualidade de concentrados de plaquetas filtrados em fases diferentes do armazenamento**. 2004, 260 f. Tese Mestrado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

OLIVEIRA, H. P. A hemostasia primária e as púrpuras. In: **Hematologia Clínica**. 3°. ed. São Paulo, Editora Atheneu, cap. 21, p 467-491, 1988.

PICOLI, T.; BARBOSA, J. S.; VARGAS, G.; HÜBNER, S. O.; FISHER, G. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (DMSO) no congelamento de células madin-darbybovinekidney (MDBK). **Science and Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 159-168, 2015.

RAPAPORT, I. S. M. Mecanismos Hemostáticos. In: **Introdução à Hematologia**, 3º ed. São Paulo, Harper & Row do Brasil LTDA, cap. 23, p 330-357, 1978.

RAPAPORT, I. S. M. Plaquetas e Púrpuras plaquetopênicas In: **Introdução à Hematologia**, 3º ed. São Paulo, Harper & Row do Brasil LTDA, cap25, p 369-383, 1978.

RAZOUK, F. H.; REICHE, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Rev. Bras.Hematol.Hemoter.** v. 26, n. 2, p. 126–134, 2004.

REGO, M. E.; SANTANA, A. B. Hematopoese: cinética de hemácias, neutrófilos e plaquetas. In: BORDIN, O.; JUNIOR, D. M. L.; COVAS, D, T. **Hemoterapia**.3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. Cap.1, p.3-10.

RIBEIRO, A. A; KUTNER, J. M. Prevenindo a contaminação bacteriana de componentes sanguíneos. **Einstein**, p. 126-128, 2003.

ROTHWELL, S.W.; MAGLASANG, P.; REID, T.J.; GOROGIAS, M.; KRISHNAMURTI, C. Correlation of in vivo functions of fresh and stored human platelets. **Transfusion**, 40(8):988-93, 2000.

SANTIS, C. G; PRATA, L. K. Criopreservação de células-progenitoras hematopoiéticas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 1, p. 36-47, mar. 2009. ISSN 2176-7262.

SCHIFFER,C.A.; AISNER,J.; WIERNIK, P.H. Clinical experience with transfusion of cryopreserved platelets. **Br K Haematol**, 34(3):377-85, 1976.

SHIRLEY, S. W.; STEWART, B. H.; MIRELMAN, S. Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders. **Urology**, v.11, n.3, p. 215-220, 1978.

SPECTOR, J.I.; YARMALA, J.A.; MARCHIONNI, L.D.; EMERSON, C.P.; VALERI,C.R. Viability and function of platelets frozen at 2 to 3°C per minute with 4 or 5% DMSO and stored at -80°C for 8 months. **Transfusion**, 17(1):8-15, 1977.

TOSTES, Maria Aparecida V. et al. Influência da coleta, da produção e da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São Paulo, v. 30, n. 5, p. 367-373, 2008.

VERMYLEN, J.; VERSTRAETE, M. Fisiologia da Hemostasia. In: **Hemostasia**. 1º. ed. São Paulo, Editora Sarvier, cap1, p 1-15, 1982.

WHITE. G. J. Morfologia de plaquetas. In: **Hematologia**. 5º. ed. São Paulo, Guanabara Koogan, cap. 123, p 824- 838, 1976.