

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Felipe Valle Fortes Rodrigues

**VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PLAQUETÁRIA E  
ANÁLISE DO IMPACTO SOBRE SUA VIABILIDADE CELULAR**

Porto Alegre  
Setembro de 2013



Felipe Valle Fortes Rodrigues

**VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PLAQUETÁRIA E  
ANÁLISE DO IMPACTO SOBRE SUA VIABILIDADE CELULAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Tor Huggo Gunnar Onsten

Porto Alegre  
Setembro de 2013



# Sumário

<b>1. Introdução:</b> .....	<b>1</b>
1.1 Histórico .....	2
1.2 Função Biológica das Plaquetas .....	6
1.3 Doação e Utilizações .....	10
1.4 Criopreservação .....	15
1.5 O papel do pH .....	16
1.6 Proposta .....	18
<b>2. Implementação de Protocolo de Criopreservação na rotina do Banco de Sangue do HCPA</b> .....	<b>19</b>
Abstract .....	19
Introdução .....	19
Materiais e Métodos Métodos .....	21
Obtenção do concentrado plaquetário .....	21
Criopreservação .....	21
Contagem Celular .....	21
Lactato, pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> .....	21
Agregação Plaquetaria .....	21
Citometria de fluxo .....	21
Recuperação Celular .....	22
Análise Estatística .....	22
Resultados .....	22
Discussão .....	24
Conclusão .....	28
Agradecimentos .....	29
<b>Referências:</b> .....	<b>29</b>



## 1.Introdução:

Em 1883, Giulio Bizzozero documentou o achado microscópico chamado por diversos autores de globulins, pequenos glóbulos, ou "*petites plaques*" como sem cor, redondas ou ovais e com um terço do tamanho de uma hemácia, consolidando as plaquetas como o 3º componente, juntamente com as hemácias e leucócitos, tendo atuação na coagulação e formação de trombos.

A transfusão de sangue já é uma idéia muito antiga e foi por muito tempo uma prática muito mais religiosa que científica. Os estudos envolvendo as células sanguíneas, sua compatibilidade e preservação permitiu a criação dos bancos de sangue, inicialmente representados por soldados compatíveis entre si, evoluindo para os banco de sangue atuais que permitem o fracionamento das porções celulares e do plasma com tipificação imunológica.

As plaquetas podem ser obtidas via aférese ou por fracionamento via centrifugação de sangue total. Elas possuem sistemas canaliculares que permitem o rápido contato com o meio extracelular e resposta a partir disto, liberando inúmeros fatores tróficos e de influência na coagulação. O foco nelas como componente secretor de inúmeros componentes vitais e comuns para os mais diversos tecidos, como VEGF, ADP, ATP e fatores tróficos neuronais, está além do simples conhecimento acerca de coagulação sanguínea; as plaquetas foram e são utilizadas para matrizes de regeneração tecidual assim como suplemento em cirurgias e doenças em que o sangramento profuso ocorre na sua falta.

Então, as plaquetas têm todo seu papel medicinal e biotecnológico restrito por dois fatores: armazenamento e doação. Até hoje não foi desenvolvido um substituto feito artificialmente para as plaquetas, de modo que a doação continua como a única forma de obtenção do material. Já quanto ao armazenamento, os órgãos de controle concordam que as plaquetas devem ser mantidas a 22°C por até cinco dias, restringindo possível contaminação, e sob agitação, para evitar dano excessivo. Isso cria o problema de desperdício após decorrido esse curto período de tempo.

No Hospital de Clinicas de Porto Alegre, a situação é igual a citada, cinco dias e depois segue-se o desperdício, com uma única diferença: temos a possibilidade de efetivar o protocolo de criopreservação. Este trabalho foi proposto e desenvolvido, para criar a rotina de congelamento de plaquetas, permitindo acesso à material de qualidade indiferente ao tempo de armazenamento.

## 1.1 Histórico

A prática de transfusão sanguínea humana como conhecemos atualmente atingiu sua maior aplicação em torno da segunda guerra mundial, contudo a idéia de transfusão é muito mais antiga e vai de mito a ciência. Temos na história de diversos povos a evidência de que o sangue sempre foi considerado uma força vital presente no indivíduo, percorrendo o sentido por vezes ritualístico em culturas indígenas de absorver a força e a personalidade bebendo o sangue alheio, ou ofertando-o aos deuses, como no caso de gregos e romanos. Esse sentido mítico do sangue permeou durante muito tempo até mesmo sua aplicação na medicina de até 1000 antes de cristo: na China, ele era a alma do indivíduo e fonte de todas as dores; no Egito, as propriedades curativas e restauradoras seriam passadas através de um banho com sangue, trazendo o rejuvenescimento e a cura para muitas doenças[19].

Uma invenção foi crucial para a transferência da fé nas propriedades sanguíneas para seu real conhecimento científico celular: o microscópio. Somente com ele que numerosos estudos foram feitos, de modo que em meados de 1658 a 1680, os biólogos alemães Jan Swammerdam e Anton Leeuwenhoek, respectivamente, citaram as hemáceas através da observação do sangue de rã. Mas devido ao seu reduzido tamanho, as plaquetas escaparam de observação até 1842, com autoria controversa, pois tanto o francês Alfred Donné quanto os ingleses George Gulliver e William Addison publicaram descrevendo pequenas partículas que podiam formar trombos mediante estímulo. Oito anos depois, o potencial de resposta a trauma foi descrito por Thomas Wharton, pela observação no microscópio óptico de que o sangue de rãs após trauma, apresentavam trombos contendo hemácias e aparentemente fibrina dando consistência e aderência. Contudo, até então não havia a relação de sangue circulante com essas partículas e a delimitação de que as plaquetas eram elementos individuais do sangue e não somente restos celulares de hemácias e linfócitos. Isso ocorreu com William Osler, que, pela observação das veias de filhotes de ratos recém eutanaziados, descreve esses pequenos glóbulos como elementos individuais da circulação. Em 1883, Giulio Bizzozero documentou a morfologia das plaquetas como sem cor, redondas ou ovais e com um terço do tamanho de uma hemácea, as classificou como "*petites*

*plaques*” e as consolidou como componentes sanguíneos presentes na coagulação, formação de trombos e sua nomenclatura [19,20].

O processo de transfusão sanguínea em si correu paralelo às descobertas celulares e teve seu início em meados de 1600, uma época em que para a medicina quase tudo curava-se com sangria. Contudo, a transfusão iniciou com sangue de cordeiro, visto que, para a mentalidade da época, este seria desprovido de vícios. O procedimento consistia em efetuar as sangrias e depois passar o sangue da carótida do cordeiro para o paciente, visando a cura de doenças mentais até febres, de modo que o procedimento resultava muitas vezes em ainda mais febre, reações hemolíticas e hemoglobinúria por causa da rejeição. Por fim, as reações e as mortes levaram os colégios de medicina Frances e Londrino juntamente com o Papa a proibirem as transfusões de animal para humano.

O retorno ocorreu com James Blundell, conhecido obstetra que pensou utilizar a transfusão de sangue para tratar hemorragia pós parto por um método inovador para a época: de humano para humano. Para tanto, ele desenvolveu um mecanismo que consistia basicamente de um funil com uma bomba, preenchido com água quente (figura 1).

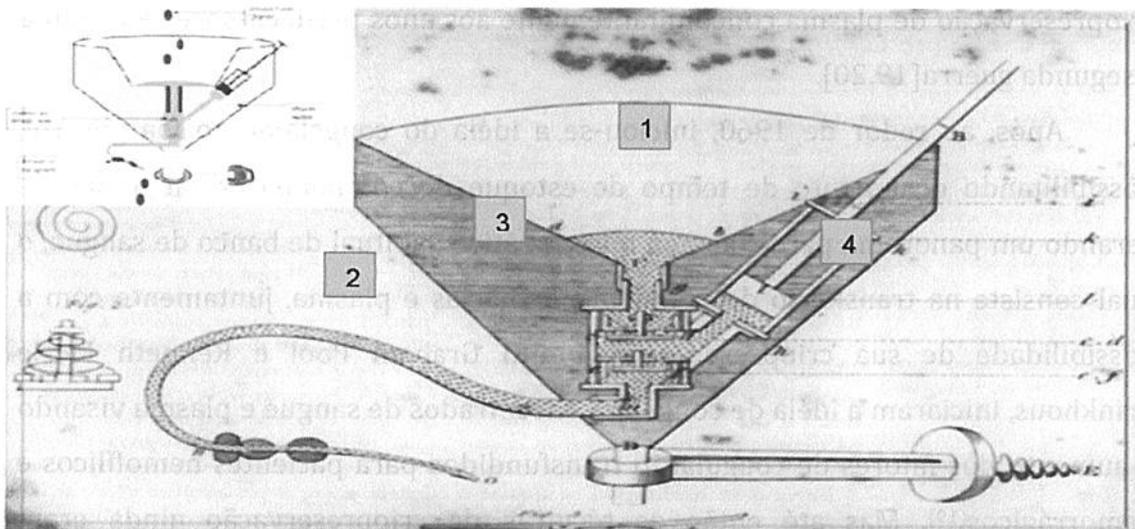


Figura 1. Desenho do primeiro aparato utilizado para extrair sangue. 1. Entrada do sangue 2. Saída do sangue 3. Câmara preenchida com água morna para manter a temperatura do sangue 4. Mecanismo para dar pressão na saída do sangue. [19]

A partir de então, as transfusões sanguíneas ganharam uso novamente e continuavam esbarrando em diversos problemas, como contaminação, rejeição e

bolhas de ar injetadas nos pacientes. A primeira atitude para contornar esses problemas e justificar seu uso foi utilizar sangue nos casos de hemorragia e nos quais a vida do paciente seria perdida de qualquer forma sem a transfusão. Concomitantemente foram sendo criadas novas técnicas como sistema fechado visando reduzir a entrada de ar, e novos conhecimentos, como as descobertas de Louis Pasteur sobre bactérias em 1865 e os antissépticos desenvolvidos por Joseph Lister. Finalmente a descoberta do sistema ABO por Karls Landsteiner, possibilitou a triagem e a transfusão sanguínea mais próxima de como a conhecemos hoje, ocorrendo a triagem Laboratorial pré-transfusão para evitar a rejeição.

O principal fator que estimulou a busca e consolidou os conhecimentos sobre transfusão foram as guerras: a guerra franco prussiana já teve transfusões; na primeira guerra mundial, em que Albert Husin e Luis Agote descobriram que o citrato de sódio evitava a coagulação do sangue; a posterior suplementação com glicose permitira o bom armazenamento; por seqüência na segunda guerra mundial, tivemos a formação de bancos e de unidades de sangue levados a batalha para dar suporte aos soldados. Culminando ,em 1937 , na formação de um banco de sangue em Chicago, visando a preservação de sangue por um prazo de dez anos. Além disso, descobriu-se o sistema Rh, novas soluções de preservação e a criopreservação de plasma concomitantemente aos anos predecessores e durante a segunda guerra[19,20].

Após, ao redor de 1960, iniciou-se a idéia do congelamento via glicerol, possibilitando o aumento de tempo de estoque de componentes sanguíneos e gerando um panorama parecido com nossa prática habitual de banco de sangue, o qual consiste na transfusão de plaquetas, hemácias e plasma, juntamente com a possibilidade de sua criopreservação. Judith Graham Pool e Kenneth Merle Brinkhous, iniciaram a idéia de congelar concentrados de sangue e plasma visando o aumento dos fatores de coagulação transfundidos para pacientes hemofílicos e hemorrágicos<sup>(19)</sup>. Mas até então as técnicas de criopreservação ainda eram limitantes e prezava-se pelo uso de plasma para tratar esses pacientes quando sangue total ou o plasma fresco rico em plaquetas não estava disponível [21,22].

Visando resolver o problema da falta de material fresco e aumentar a possibilidade de tratamento dos pacientes hemorrágicos, pesquisou-se formas de preservar as plaquetas. Desse modo, na década de 60 e 70 foram percorridas

diversas hipóteses, indo do resfriamento a 4°C, armazenamento em gelatina, até o próprio congelamento com resultados diversos, até que nos anos 80, comprovou-se que as plaquetas congeladas em DMSO são viáveis ao transplante e uma ferramenta importante e eficaz para o tratamento de pacientes [56], e que o melhor modo de armazenamento é por 5 dias a 22°C [22].

Todo esse percurso histórico caracterizou a prática clínica dos bancos de sangue atuais, com transfusão e armazenamento do material biológico doado. Assim, seja comprovada pela fé ou pela ciência, o sangue trata os males que afetam a população humana praticamente desde o início da nossa história, mesmo que sem a delicadeza técnica que possuímos hoje.

Atualmente encontramos um ponto crítico: a relação entre demanda do material coletado e o número de doações pode variar para ambos os lados, ou levando à falta de material para os pacientes ou descartando material viável pelo prazo de validade. As plaquetas enquadram-se normalmente nesse ponto por terem seu tempo viável de somente cinco dias quando preservadas a 22°C. Isso torna crucial que esse material seja congelado para uso futuro, valorizando a doação e o respeito por ela e também melhorando o atendimento aos pacientes na clínica.

## 1.2 Função Biológica das Plaquetas

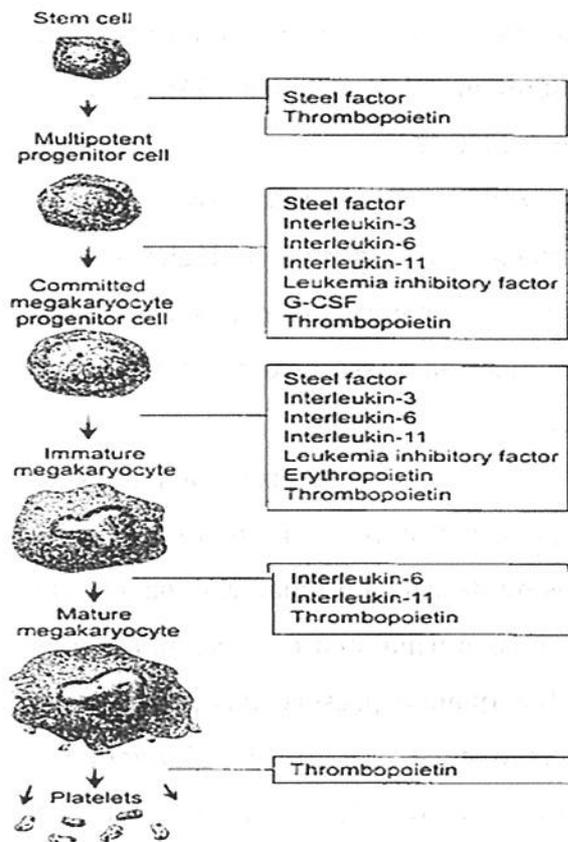


Figura 2: formação de plaquetas a partir da medula óssea, com os fatores tróficos de cada fase [23]

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados ( $3.6 \times 0.7 \mu\text{m}$ ) limitados por uma membrana, fruto da degranulação dos megacariócitos provindos de células tronco da medula óssea, após a invaginação da sua membrana e a divisão do seu citoplasma pelos canais de demarcação de plaquetas. A figura ao lado demonstra a maturação plaquetária, elucidando alguns dos principais elementos que servem como fatores tróficos.

Morfologicamente elas podem ser divididas em quatro zonas: zona periférica, zona estrutural, zona das organelas e zona de membrana. A zona de membrana consiste em dois tipos de

canais(sistema): o sistema canalicular aberto é um remanescente dos canais de demarcação de plaquetas dos megacariócitos, sendo uma invaginação da membrana plasmática para dentro do citoplasma; já o sistema tubular denso, contém material originado do retículo endoplasmático rugoso do megacariócito, servindo de armazenamento de cálcio, contendo enzimas(ciclooxigenase e tromboxano sintetase,por exemplo) que produzem tromboxano  $A_2$  a partir de ácido aracnóico e adenilato ciclase. A zona periférica consiste na membrana celular recoberta por um espesso glicocálice formado a partir de glicoproteínas, glicosaminoglicanas e proteínas, como fatores de coagulação, absorvidos do plasma. A zona estrutural é formada por microtúbulos, actinas, proteínas ligadoras de actina, realizando a manutenção da forma discoidal das plaquetas de dois a quatro micrômetros e a mudança para um formato mais estrelado quando ativadas. A zona de organelas é a chave para sua

função fisiológica, contendo além de mitocôndrias, peroxissomos, glicogênio e os grânulos plaquetários. Os grânulos alfa são mais numerosos, possuindo fibrinogênio, fatores de coagulação, plasminogênio, tromboxano A<sub>2</sub>, inibidor do ativador de plasminogênio e fator de crescimento derivado de plaquetas. Os grânulos delta são mais densos e menos numerosos, contendo ADP, ATP, serotonina e histamina. Por fim, os grânulos gama, são responsáveis pela dissolução de coágulos, contendo enzimas hidrolíticas. [12]

A função fisiológica das plaquetas consiste basicamente de cinco momentos: adesão, agregação, secreção, formação e posterior retração do coágulo. Desse modo, elas devem estar presentes em todos os vasos do corpo para que possam realizar sua função, submetendo-se do forte fluxo arterial ao mais brando das veias e capilares [23]. Então quando ocorre a lesão do vaso sanguíneo, elas precisam de um fator bioquímico que proporcione sua adesão, isso ocorre quando a lesão expõe o colágeno da matriz extra celular e esse liga-se ao complexo protéico GPIb da membrana da plaqueta e ao fator de Von willebrand; em condições de alto fluxo de cisalhamento, a proteína plasmática Von Willebrand exerce maior influência na adesão [24]. Desse modo o fator de Von Willebrand pode realizar a primeira associação da plaqueta ao sítio de lesão [1], utilizando-se da proteína de matriz trombospondina-1 para a adesão nesse processo [2]. Após, a glicoproteína GPIb também promove o rolamento, via p-selectinas, no local da lesão, ativando as plaquetas e permitindo que os receptores GPIIb/IIIa e integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  liguem-se ao fibrinogênio e liberem seus grânulos. Nesse processo a membrana plasmática das plaquetas sofrem alterações que levam a formação de pseudópodos que interagem entre as plaquetas, formando uma rede, e também os grânulos movem-se para a periferia para sofrer exocitose [25].

A função secretora das plaquetas é complexa, envolvendo cerca de 300 proteínas, que vão desde ADP, proteínas de adesão, proteínas de recrutamento, proteínas para agir na remodelação do trombo, VEGF, IL-8, outras moléculas quimiotáticas da resposta inflamatória, e até mesmo seqüestrando moléculas de adesão, como as p-selectinas e integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , em grânulos alfa e os transferindo para a superfície plaquetária para facilitar sua agregação com outras plaquetas [27]. Assim, para que ocorra a secreção de todas essas moléculas, primeiramente ocorre a ativação de proteína G, que ativa fosfolipase C, que ativa IP<sub>3</sub> e DAG, as quais fazem suas

cascatas de sinalização, ativando as ATPases do sistema tubular denso, liberando cálcio para a exocitose e o aumento da atividade dos microtúbulos para mover os grânulos. Após, ocorre a fusão dos grânulos com a membrana plasmática via interação das v-SNAREs da membrana plasmática e receptores VAMP e t-SNARE presentes nos grânulos, culminando na liberação destes e na sinalização celular realizada pelas plaquetas [26,23].

Em termos de hemostase, a secreção serve basicamente a dois termos: agregar mais plaquetas e realizar vasoconstrição. Para tanto, as plaquetas liberam, pelo mecanismo citado acima, ADP, ATP, GTP, tromboxano A<sub>2</sub>, fator de Von Willebrand, fibrinogênio, fibronectina e serotonina realizando um efeito de agregação: aumento da interação das plaquetas com o endotélio, com outras plaquetas no local da lesão e com as circulantes. Aqui, a membrana plasmática plaquetária tem uma função vital: elas sofrem um flip-flop, expondo fosfolípidos negativos, os quais permitem a ligação dos fatores de coagulação nas plaquetas no sítio de lesão. Essa ligação ocorre principalmente com os fatores V e X, que realizam a cascata de ativação da protrombina em trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina, formando um rede que estabiliza o tampão plaquetário. Além disso, as moléculas de adesão, p-selectinas GPIIb/IIIa, expressas nas membranas das plaquetas ligam-se aos receptores PSGL1 dos leucócitos e às células T via CD40, agregando-os ao tampão [25]. Após, as plaquetas sofrem sinalização do endotélio via ativador de plasminogênio tecidual, liberando os grânulos gama, e cumprindo seu papel na retração do coágulo, diminuindo a incidência de trombos.

Assim, podemos perceber que as plaquetas são fundamentais na reação fisiológica do organismo à perda de sangue e dano tecidual, visto que além da cascata coagulatória citada brevemente acima, o fator de derivado de plaquetas estimula a proliferação de músculo liso e fibroblastos para a reparação do tecido [12].

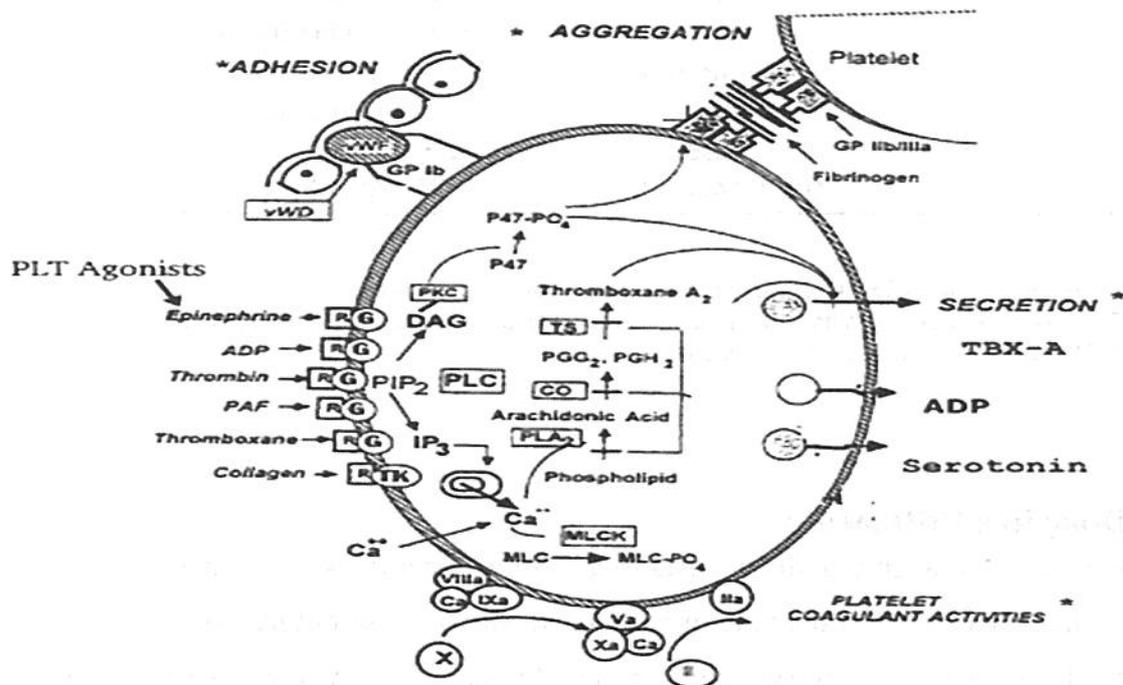


Figura 3: Demonstração da função plaquetária: adesão, secreção e agregação. [34]

Tabela 1: Receptores e seus receptivos ligantes envolvidos na função plaquetária. [25]

Função Plaquetária	Ligantes	Receptores
Adesão	vWF	GPIb/V/IX
	TSP1	GPIb/V/IX,CD36
	Colágeno	$\alpha_2\beta_1$ GPVI,CD6
	Fibrinogênio	$\alpha_{IIb}\beta_3$
	Fibronectina	$\alpha_5\beta_1$
	Vitronectina	$\alpha_v\beta_1$
	Laminina	$\alpha_6\beta_1$
	Cisalhamento	GPIb/V/IX
Ativação	Trombina	PAR1,PAR4,GPIb/V/IX
	ADP	P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>12</sub>
	TxA <sub>2</sub>	TP $\alpha$ ,TP $\beta$
	Epinefrina	$\alpha_{2A}$
	Serotonina	5HT2A
	MMP-2, MMP-1	?
	Complexo Imune	Fc $\gamma$ IIa
	Complemento	C1q,C3a,C5a
	Plasmina	?

	Streptoquinase	?
<b>Agregação</b>	Fibrina	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado
	vWF	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado, GPIb/V/IX
	TSP-1	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado, CD36, IAP
	Fibronectina	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado
	sCD40L	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado
	Gas6	Axl
	SDF-1, TARC, MDC	CXCR4, CCR4

vWF, Von willebrand factor; TSP1, trombospondina-1; ADP, adenosina difosfato;  $T_xA_2$ , tromboxano  $A_2$ ; MMP, metaloproteinase de matriz; IAP, proteína associada à integrina; SDF, fator derivação estromal; MD, quimiocina derivada de macrófago

### 1.3 Doação e Utilizações

Seja qual for a gravidade do estado em que encontra-se o paciente e sua necessidade de componentes sanguíneos a partir disto, ele só obterá este recurso a partir da doação voluntária de sangue. Graças aos avanços sociais que acompanharam o conhecimento científico na sociedade, o hábito de doar sangue e repor os estoques sanguíneos está sendo cada vez mais embutido na cultura.

Desse modo, quando um cidadão encontra-se apto e realiza a doação dos seus componentes sanguíneos, estes passam por triagens e procedimentos que vão desde um questionário, que funciona como um depoimento direcionado em que enquadra-se o sangue do paciente como seguro para doação ou não, até os testes laboratoriais para verificar a presença de antígenos específicos das doenças mais comuns e tipagem de compatibilidade. As plaquetas enquadram-se dentro desse panorama, de modo que o sangue total é doado em um sistema fechado constituído de 3 bolsas, as quais serão centrifugadas e fracionadas de acordo com a necessidade em plasma, hemácias e plaquetas. Assim, mantêm-se de 60 a 75% das plaquetas do sangue total coletado, elas ficam sadias, pois a bolsa é permeável a dióxido de carbono e oxigênio [28].

Outro modo de coletar algum componente requerido é por aférese. O paciente é ligado à máquina de aférese, para que seu sangue passe por ela e retorne retirando somente o componente desejado. Existem diversos modelos e fabricantes, mas os princípios básicos são os mesmos: o sangue total passa dentro de uma membrana circular com porosidade específica, como demonstrado na figura 4, ou é

centrifugado, valendo-se da densidade de cada componente sanguíneo para isolá-lo [29].

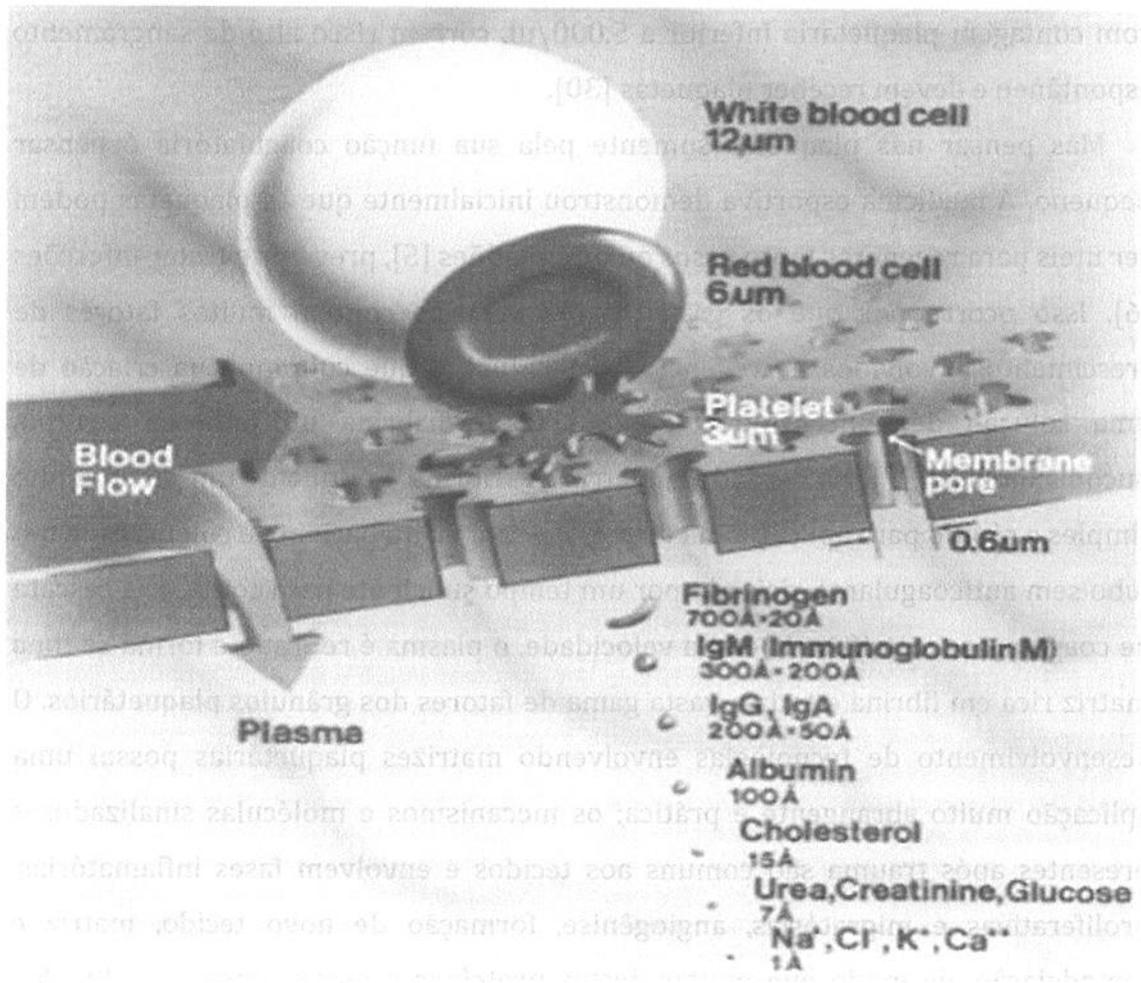


Figura 4 : Funcionamento da membrana de aférese [29]

Seja qual for a forma de coleta, o concentrado de plaquetas é mantido sob agitação a 22°C, podendo ser mantido por até 5 dias. O maior benefício da aférese é que consegue-se um valor até oito vezes maior de células do que através de uma doação normal ( $3 \times 10^{11}$  e  $5 \times 10^{10}$  respectivamente). Os motivos para uma transfusão plaquetária são os mais diversos, podendo também variar a contagem para cada caso, como: paciente oncohematológico estável; mielograma e biópsia de medula óssea; punção lombar em paciente leucêmico pediátrico estável; coagulação Intravascular Disseminada; broncoscopia em pacientes de transplante de medula óssea; trombocitopenia Neonatal Aloimune; cirurgia em leucemia; Trombocitopenia secundária a transfusão; bypass cardiopulmonar; neurocirurgia;

presença de sangramento ativo com menos que 100.000 plaquetas  $\text{mm}^3$  ou tempo de sangramento aumentado ou pacientes com defeitos qualitativos de plaquetas, trombocitopatias [29,30], e por fim temos a linha geral de que pacientes estáveis com contagem plaquetária inferior a 5.000/ $\mu\text{L}$  correm risco alto de sangramento espontâneo e devem receber plaquetas [30].

Mas pensar nas plaquetas somente pela sua função coagulatória é pensar pequeno. A medicina esportiva demonstrou inicialmente que as plaquetas podem ser úteis para regenerar tanto ossos quanto tendões [5], prevenir e tratar infecções [6]. Isso ocorre por que os grânulos plaquetários contêm muitos fatores de crescimento envolvidos na regeneração tecidual, o que culminou na criação de uma solução de concentrado de plaquetas e fibrina utilizada na cirurgia bucomaxilofacial [7]. Na verdade, a matriz de fibrina é obtida de um modo muito simples e rápido para aplicação na cirurgia: o sangue do paciente é coletado em um tubo sem anticoagulante, deixado por um tempo suficiente para começar a cascata de coagulação, centrifugado a alta velocidade, o plasma é retirado e forma-se uma matriz rica em fibrina e toda a vasta gama de fatores dos grânulos plaquetários. O desenvolvimento de tecnologias envolvendo matrizes plaquetárias possui uma aplicação muito abrangente e prática; os mecanismos e moléculas sinalizadoras presentes após trauma são comuns aos tecidos e envolvem fases inflamatórias, proliferativas e migratórias, angiogênese, formação de novo tecido, matriz e remodelação, de modo que muitas destas proteínas e mecanismos são ativados pelas plaquetas.

Matrizes de fibrina mais atuais retiram os leucócitos para evitar possível ação de proteases e hidrolases e utilizam cloreto de cálcio para maximizar a presença de fatores de crescimento plaquetário. Vários avanços como este possibilitou hoje termos diferentes modos de aplicação a partir da necessidade técnica do procedimento cirúrgico: uma formulação líquida com meio de cultura usado em cirurgia geral (figura 5.3); formato de massa maleável, usada para fornecer a base do implante de tábula nas próteses dentária (figura 6); conformação firme, formando um "scaffold", utilizado para revestir grades usadas em úlceras (figura 5.2), aplicação de células tronco e revestir implantes ósseos e para fechar extração dentária com completa regeneração epitelial (figura 5.1) [31]

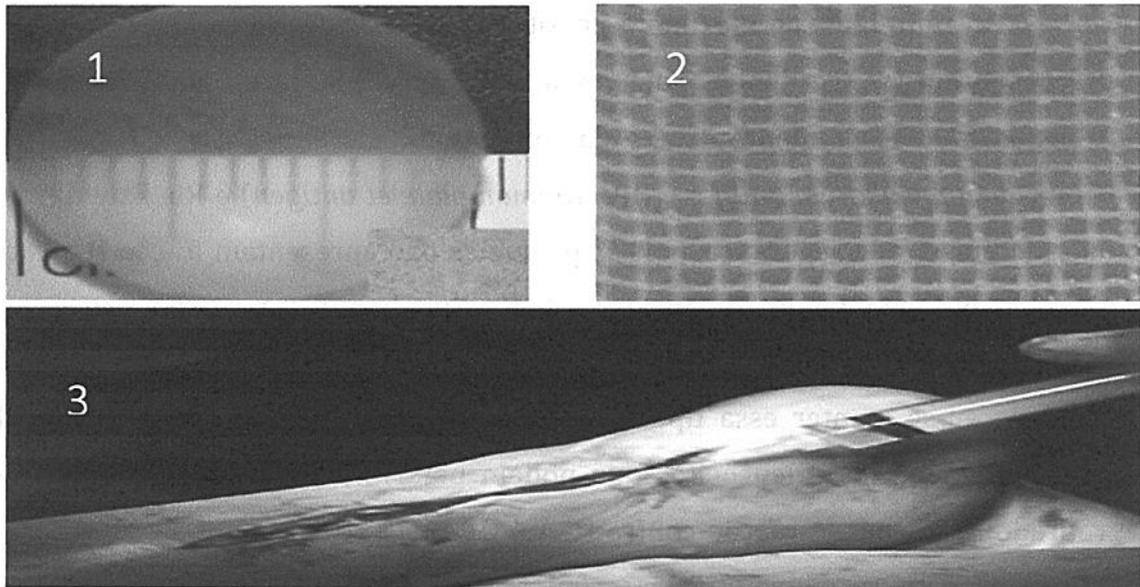


Figura 5: 1. *Scaffold* utilizado para implante com célula tronco 2. Grade recoberta com a matriz a partir de plaquetas 3. Aplicação da matriz para acelerar a regeneração cirúrgica [31]

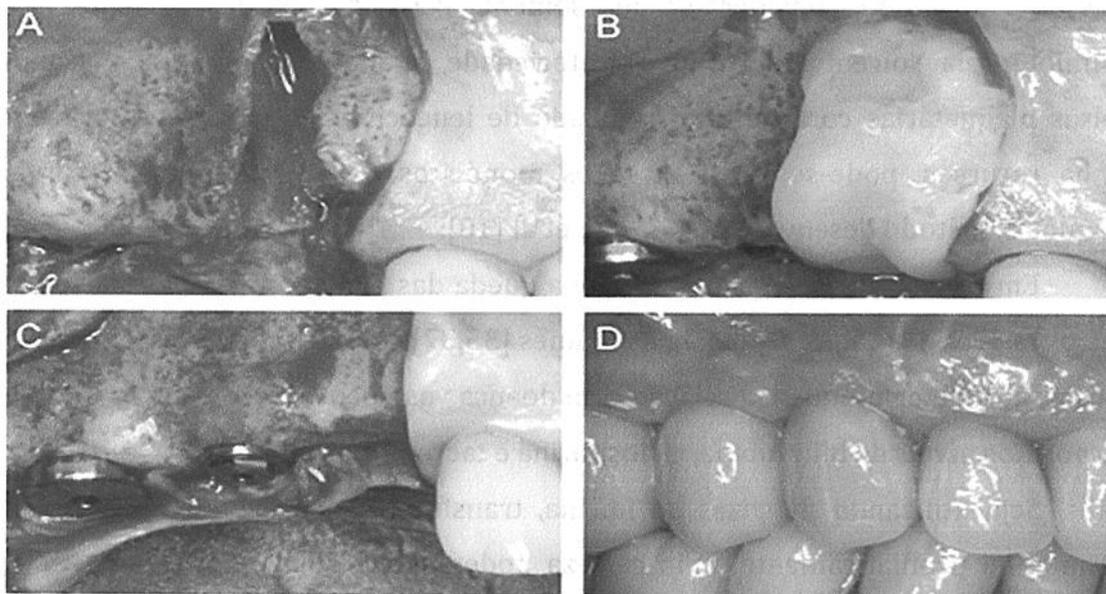


Figura 6: Utilização de *scaffold* para implantes dentários [31]

A razão de existência das tecnologias envolvendo plaquetas é o transplante do material biológico no paciente, seja pelas matrizes ou por transfusão. Nesses casos, sempre há o risco de rejeição, ou aloimunização após transfusões repetidas. A transfusão plaquetária, para estes termos, deve ser monitorada após uma hora via contagem; caso após o decorrido tempo ocorra aumento inferior a  $4500/\mu\text{L}$  [35], é estabelecido que pode estar ocorrendo algum tipo de ataque as células.

Para diminuir ao máximo a possibilidade destas reações, são retiradas as frações branca e vermelha. Somado a isso, pode-se fazer a tipificação e a transfusão correspondente dentro da compatibilidade antigênica, sistema ABO, HLA (*human leukocyte antigen*), HPA (*human platelet antigen*) e Rh. Este último é um mecanismo de segurança, pois as plaquetas não apresentam fração D positiva ou negativa, não tendo Rh, inclusive Cid et al demonstra reação negativa na transfusão de 4700 pacientes[36]. Mas a literatura é controversa quanto a isso e estabeleceu-se manter essa tipificação de Rh pré-transfusão por segurança das possíveis hemácias e leucócitos que podem persistir, mesmo sendo aférese ou retirado as frações. A reação contra HLA e HPA ocorre, na maioria dos casos, em pacientes com trombocitopenias crônicas e câncer, porque nestes casos são comuns as transfusões repetidas frequentemente, representando um número massivo de células; além disso, as comorbidades dessas doenças, como esplenomegalia e infecções recorrentes, favorecem a reação ao transplante[37]. Mas de todo modo, considera-se que somente cerca de 5% dos pacientes sob quimioterapia sofrem efeitos de refratoriedade quando transfundidos usando bolsas plaquetárias com número reduzido de leucócitos [9]. Caso o laboratório tenha recursos, pode-se verificar se os monócitos do paciente vão atacar as plaquetas, método desenvolvido por Lim et al [10].

Em alguns casos, registrou-se que a queda das plaquetas estava relacionada a outros fatores fisiológicos que não os imunes [35,37], não definiu-se exatamente as causas, mas determinou-se a relação com doença vaso oclusiva, irradiação total do corpo, altos níveis de bilirrubina, ciclosporina e tacrolima [35].

Seja utilizando matrizes de fibrina, transfundindo pacientes em cirurgia, trauma, ou profilaticamente, uma certeza podemos ter sobre as plaquetas: elas salvam vidas. Até hoje, não temos um substituto viável que balanceie custo e eficiência como as plaquetas, tornando-as um material precioso dentro dos hospitais do mundo. Mas, todo esse preciosismo, toda essa aplicação de suporte à vida e ao tratamento, tem um prazo de validade curto nos bancos de sangue: cinco dias a 22°C. O que significa que estamos legitimamente jogando fora o material biológico como rotina. Muitos lugares no mundo, já no século passado, resolveram esse problema: congelamento.

## 1.4 Criopreservação

Desde a década de 90, passamos da manutenção por 1 hora pré transfusão, para armazenamento a 4°C por 24h, daí então para cinco dias a 22°C, com bolsas melhores que permitem a passagem de gases e as tecnologias de “*scaffolds*” a partir de homogeneizados plaquetários. Ou seja, o conhecimento demonstrou a importância das plaquetas, associando conhecimento com tecnologia para a melhor atenção à condição do paciente, e o congelamento é justamente isso: a forma mais viável hoje de se preservar o material e mantê-lo disponível, o próximo passo que tecnologia e conhecimento permitem.

Quando qualquer célula ou fração celular que contenha membrana entra em processo de congelamento, a formação de cristais pelas moléculas de água normalmente resultam na lise da membrana com perda da função e integridade. A partir disso, desenvolveu-se vários criopreservantes e métodos de congelamento [38], boa maioria deles foram testados para as plaquetas, glicerol, etileno glicol, propileno glicol, dextran e DMSO. Gao et al e outros autores, demonstraram que o melhor criopreservante é o DMSO, dentro da concentração limite de 2M [39,40], de modo que ele forma pontes de hidrogênio com as moléculas de água da célula possibilitando a queda relativamente segura da temperatura [40].

O maior problema de se criopreservar e depois transfundir um tecido é que as substâncias crioprotetoras são bastante tóxicas, inclusive o próprio DMSO cria poros em membranas lipídicas a concentrações de 30% [11]. Visando evitar danos ao paciente, é aceita uma concentração de 1g de DMSO por quilograma do paciente para transfusão e até 10% de volume na solução no ato de congelamento, esses dados baseiam-se no fato de que ele não é altamente tóxico além de não depositar-se no corpo de modo permanente ou mutagênico [41].

Mesmo o DMSO sendo seguro e utilizado no mundo todo, pensou-se num modo simples de diminuir muito sua concentração: centrifugação.

O exército dos países baixos já ha alguns anos congela plasma, hemácias e plaquetas para suprir seus soldados em missões de paz. Essa prática, que começou com o alojamento de soldados doadores e hoje encontra-se com os hemocomponentes congelados levados a campo de batalha, tem sido de vital importância, segundo seus próprios relatos [42]. Eles reafirmam a necessidade e importância da transfusão plaquetária para salvar a vida dos soldados com

hemorragia massiva, sendo inclusive as plaquetas congeladas mais eficientes; outro fator importante, é o lugar em que encontram-se, pois em países de terceiro mundo não é confiável a obtenção de sangue dos hospitais ou até mesmo de seus próprios soldados devido a infecções e parasitoses, portanto, a prática de congelamento tem papel vital no suporte aos soldados [42].

Afora experiências militares, eles efetuaram a aplicação de plaquetas pós congelamento em pacientes com sangramento constante e contagem de plaquetas baixas, obtendo a parada do sangramento em vinte minutos. Então, as experiências do banco de sangue militar dos países baixos demonstra que os princípios da congelamento podem realizar um papel vital dentro do funcionamento dos bancos de sangues do mundo. O método usado foi desenvolvido por Valeri et al, ele foi inovador em duas coisas simples: economia de uma hora no descongelamento das plaquetas ao descartar o passo da lavagem e economiza de espaço pela simples idéia de centrifugar a bolsa já com DMSO e a retirada posterior do excesso do plasma. [43]

Valeri, assim como os dados clínicos dos países baixos, demonstram que o congelamento de plaquetas conquistou seu espaço na prática clinica de alguns lugares do mundo por ser confiável e seguro para os termos de coagulação.

## 1.5 O papel do pH

Toda a carga de proteínas na forma de fatores tróficos e sinalizadores que envolvem a função e as diversas aplicações plaquetárias geram e sofrem efeito de alterações no pH. Logo que ocorre algum dano, seja fratura ou em tecidos moles, temos pH ácido que vai migrando para alcalinidade ao longo do processo de cura [15,16], um teoria para explicar isso é que o ambiente ácido faz com que as plaquetas produzam mais fatores de crescimento[17].

Em plaquetas humanas, a regulação do pH ocorre prioritariamente pelo NHE (*sodium hydrogen exchanger*), uma proteina transmembrana com 7 isoformas, cuja ativação dá-se pelo gradiente balanceado de sódio e hidrogênio, sendo rapidamente ativado quando ocorre acidificação pelo acúmulo destes para manter a alcalinidade que permite uma permeabilidade aumentada ao  $Ca^{+2}$ , ou pelos agonistas plaquetários, como trombina, que ligam-se alostericamente ao receptor e o tornam mais suscetível à gradientes mais alcalinos de pH para aumentar a

atividade da plaqueta em torno do pH fisiológico[44]. Então, somente com a ação do NHE já podemos destacar que o pH modula as fases da função plaquetária, principalmente agregação e secreção [18]. O papel do  $\text{HCO}_3^-$  é citado tanto relacionado ao stress oxidativo quanto ao pH, mas sua atuação especificamente nas plaquetas é dúbia e o NHE apresenta efeito mais expressivo confirmado[44].

O trabalho com plaquetas e justificativa para sua criopreservação giram ao redor do fator tempo. O armazenamento por cinco dias é devido ao risco de proliferação bacteriana, envolvendo também suas toxinas e produtos metabólicos, mas isso até pode ser contestado ou prevenido com adventos de novas tecnologia. Contudo, é ainda mais importante do que isto, o dano que as plaquetas sofrem naturalmente quando armazenadas, envolvendo modificação da forma, aumento da expressão de fosfatidilserina e de integrinas na membrana, aumento na produção de lactato [45] e diminuição do pH, de modo que o European Blood Bank Regulation estabelece uma janela entre 6.4 e 7.4 para que o pH esteja aceitável considerando as alterações de função [46].

Raymond et al [47] demonstrou que o pH é um fator vital para se analisar o impacto da transfusão in vivo; ele está diretamente relacionado com o tempo de sobrevivência das plaquetas e com a recuperação delas no paciente. Além disso, o aumento do pH pode ser devido à produção de lactato na célula, visto que ele também demonstrou uma relação inversa dentro dos mesmos parâmetros das plaquetas. Muitos autores corroboram essas descobertas em vista de estabelecer o controle dos níveis de pH, lactato, pressão de  $\text{O}_2$  e de  $\text{CO}_2$  como o padrão de qualidade das plaquetas armazenadas [45,47]

Tang et al [44] demonstrou a preservação do pH pré e pós congelamento. A partir disso, podemos induzir que ocorre a preservação do mecanismo de controle de pH nas células plaquetárias e que este pode ser um mecanismo válido para a obtenção de parâmetros de eficiência tanto da técnica de congelamento quanto da utilização na transfusão, principalmente se associado a aferição do lactato produzido.

## 1.6 Proposta

A possibilidade de criopreservar plaquetas é uma realidade para muitos lugares do mundo. No Brasil, isso torna-se um pouco mais complexo devido à necessidade de profissionais capacitados e treinados para trabalhos em criobiologia e, ainda mais difícil, ultra freezers de  $-80^{\circ}\text{C}$  ou equipamento para manipulação de nitrogênio líquido. Aqui no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) temos todos esses pré-requisitos.

Em 2012, o HCPA produziu via doação numa média anual 1500 bolsas de plaquetas por aférese e 12000 a partir de doações de sangue total. De todo esse estoque, cerca de 20% teve que ser descartado devido a estreita janela de validade das plaquetas, representando um prejuízo, somente no valor das bolsas de coleta, de 145000 reais. O maior prejuízo não é pecuniário, mas sim o trabalho dos profissionais envolvidos desde a coleta até a triagem laboratorial, e principalmente o material biológico obtido via doação.

Além disso, como o estoque apresenta baixa durabilidade, muitas vezes a demanda a partir dos pacientes do hospital obriga a transfusão de plaquetas fora da compatibilidade ABO. Isso demonstra que o hospital está sujeito ao prejuízo, tendo todo o material necessário para remediar esse fato através da criobiologia.

O banco de sangue do HCPA é obrigado a jogar fora a parcela de plaquetas da doação de muitas pessoas devido ao prazo de validade do material; isso prejudica sua imagem frente aos doadores, visto que pode desincentivar todo o processo, invalidando os intensos programas de conscientização das pessoas sobre a importância da doação. Estamos perdendo todo o potencial terapêutico deste material e diminuindo a possibilidade de repô-lo. Tendo em vista todos esses problemas, propomos instaurar a resolução mais simples e efetiva: validar o protocolo de criopreservação plaquetário.

## 2. Implementação de Protocolo de Criopreservação na rotina do Banco de Sangue do HCPA

Rodrigues F<sup>1</sup> ; ONSTEN, Tor Gunnar Hugo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Felipe Rodrigues, estudante de biomedicina na UFRGS. E-mail, autor correspondente: felipe.vfr@gmail.com

<sup>2</sup>Tor Gunnar Hugo Onsten, Phd. Chefe do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### Abstract

As plaquetas apresentam um armazenamento problemático devido a sua duração de 5 dias a 22°C sob agitação. O procedimento de criopreservação torna-se uma alternativa viável para o estoque por longos períodos, possibilitando a formação de um estoque tipificado quanto aos principais antígenos, prevenindo reações à transfusão. Neste trabalho, nós utilizamos as técnicas mais avançadas para permitir tanto a redução do volume, ocupando menos espaço físico, quanto a menor reação possível do paciente ao criopreservante. Para tanto, utilizamos bolsas aférese coletadas no banco de sangue do HCPA, procedendo com a centrifugação da bolsa já contendo o dimetil sulfoxido (DMSO) para criopreservação, com a retirada do excesso de plasma. Pré manipulação e pós descongelamento, no tempo de 7 dias, foi realizada a contagem celular, a recuperação, a gasometria, medida do lactato e citometria de fluxo para analisar a integridade dos receptores plaquetários. Nestes Parâmetros encontramos alterações significativas no pH, lactato e na análise preliminar dos receptores plaquetários, mas concluímos que os dados estão dentro dos parâmetros do guia inglês e americano de transfusão, assim como do utilizado no banco de sangue do hospital.

Palavras chave: CD 42b, criopreservação, plaquetas, DMSO.

### Introdução

Desde a década de 1960 já pensa-se em criobiologia, mas inicialmente as plaquetas não foram seu foco. Para necessidades imediatas, mantê-las sob agitação por 5 dias a 22°C era o suficiente na época. Contudo, isso não

se adéqua mais a necessidade atual, quando estamos em constante falta de material compatível com o paciente. Aqui no HCPA, no ano de 2012, recebemos 1500 doações de aférese e 12000 doações de plaquetas

de sangue total, de modo que 20% de todo esse material foi descartado por terem vencido os 5 dias de validade estabelecidos nas normas internacionais, levando a transfusão de material fora da compatibilidade hematológica.

A criopreservação plaquetária é uma realidade no mundo, sendo utilizada clinicamente já em 2002, quando Saroj Vadhan-Raj et al demonstrou a eficiência de plaquetas criopreservadas utilizadas em pacientes trombocitopênicos pela ação da quimioterapia; além disso, os Países Baixos e a Austrália fazem uso delas em tempos de guerra para suprir as necessidades em campo de batalha dos soldados e nos hospitais militares. Contudo, esta prática de congelamento no Brasil não chega a ser uma rotina devido ao alto custo dos freezers e de pessoal qualificado, quesitos que o HCPA já abrangia previamente ao trabalho. Além disso, estudos comprovaram que elas além de serem viáveis para a transfusão pós congelamento, são mais eficientes na hemóstase em alguns casos.

Diversos métodos e criopreservantes foram propostos e testados na literatura, concluindo-se que o DMSO é o melhor para as

plaquetas. A toxicidade dos criopreservantes e a concentração estreita que pode ser ministrada no paciente normalmente levam a lavagens e perda de células. Aqui, utilizamos o protocolo estabelecido por Valeri et al, com a centrifugação da bolsa já com o criopreservante e o descarte do sobrenadante. Com isso, a concentração de DMSO fica muito abaixo do limite de 1g/kg permitida.

Nesse trabalho, propusemos aplicar as técnicas padrão ouro no mundo para instaurar o protocolo de criopreservação plaquetária no HCPA, para resolver o problema de desperdício e de transfusões fora de compatibilidade através do estabelecimento de um banco de plaquetas congeladas, que podem servir tanto à rotina do HCPA quanto ao resto do Estado. Além disso, sendo o HCPA um hospital escola muito envolvido com o conhecimento científico, com a expansão do tempo de armazenamento possibilitamos o aumento da produção científica sobre o tema.

## **Materiais e Métodos**

### **Métodos**

#### **Obtenção do concentrado plaquetário**

As bolsas de plaquetas foram obtidas após análise sorológica e com 2 a 4 dias de estoque sob agitação constante, através de doação rotineira no setor de Apherisis do banco de sangue do HCPA.

#### **Criopreservação**

Foram utilizadas bolsas estocadas a 2-3 dias pós-doação. As plaquetas foram congeladas seguindo o protocolo desenvolvido por Valeri et al. As bolsas (n=9) foram recebidas, pesadas e tiveram a adição de 5% de DMSO 99% (Farmoterápica), após foram centrifugadas por 10 minutos a 1200g. Foram colocadas em extrator manual e retirado a excesso de plasma visando um volume final de 50 ml. Após o pellet foi gentilmente resuspendido utilizando uma gaze de nylon, acondicionado em uma bandeija de alumínio e levada imediatamente ao freezer -80°C por 7 dias.

#### **Contagem celular**

A contagem plaquetária e leucocitária foi realizada em aparelho automatizado (Mindray,BC-2800),

imediatamente ao recebimento da bolsa e após o descongelamento.

#### **Lactato, pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>**

Imediatamente ao recebimento da bolsa e 45 minutos pós descongelamento, foi retirada alíquota de 3 ml para a realização da contagem do Lactato, pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> em aparelho automatizado Siemens Rapid Lab 1265.

#### **Agregação Plaquetaria**

Imediatamente após o descongelamento foi retirado 3 ml de plasma e centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos. Após, procedeu-se com a agregação no agregômetro MYR-4(Qualitem) com Colágeno (Chrono-log Corporation), adicionando-se 1µg de colágeno 2µg/ml em 500µl de amostra. A agregação foi aferida pela absorbância no decorrer de 5 min; o plasma autólogo descongelado a partir da bolsa foi utilizado como controle. O grupo “pré congelamento” foi submetido ao mesmo protocolo.

#### **Citometria de fluxo**

Foi seguido o protocolo modificado de Angela Latorraca et al. Após o descongelamento, obteve-se uma alíquota de 500µl, sendo adicionado

igual volume de paraformaldeído 1% e incubado por 10 minutos. Após, lavou-se 3x com PBS, incubou-se anticorpo monoclonal CD42b na proporção 1:20 por 20 minutos. Além disso, ajustou-se a concentração entre 500 a 1000 plaquetas/ $\mu$ l. As amostras foram lidas no citômetro Attune (Life Technologies). Foram utilizadas plaquetas recém coletadas como controle.

### **Recuperação Celular**

Foi realizada a porcentagem de perda via proporção simples comparando-se a contagem plaquetária pré protocolo de criopreservação e pós descongelamento.

### **Análise Estatística**

Foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5 para realizar teste t pareado. No caso da citometria foi realizado o teste "t one sample"

## **Resultados**

A integridade celular das plaquetas foi analisada pré congelamento e pós congelamento, como demonstrado na tabela 2. A

recuperação média foi elevada dentro do protocolo proposto, atingindo 85%(tabela 3). O pH ficou dentro do parâmetro limite de 6,4 a 7,4 estabelecido pelo guia europeu de transfusão[32] e do Americano[30], mas teve alteração estatística significativa dentro destes limites(figura 8, A). A contagem de Leucócitos(WBC) também respeitou o limites estabelecidos dentro do guia europeu de transfusão ,mas é uma medida de qualidade transfusional e não celular sobre o congelamento de plaquetas(tabela 2). A pressão parcial de oxigênio não teve alteração significativa, provavelmente devido a variedade de valores individuais das bolsas utilizadas (Figura 8, E). A pressão parcial de dióxido de carbono teve perda significativa estatisticamente(figura 8,D), talvez para servir de fator tamponante ao aumento do lactato, mas para essa afirmação seria necessário medir  $\text{HCO}_3$ . A produção de lactato no plasma autólogo em que as plaquetas foram congeladas teve aumento significativo (figura 8, B).

Tabela 2: Qualidade in Vitro das Plaquetas\*

	Pré Congelamento	Pós Congelamento
Contagem (x10 <sup>11</sup> céls/ml)	1,63 (+- 0,42)	1,4 (+- 0,34)
pH	7,21 (+- 0,09)	7,07 (0,15)#
Lactato (mmol/L)	7,14 (+- 1,25)	8,26 (+-1,68)#
pCO2 (mmHg)	19,41 (+- 2,67)	28,11 (+- 6,33)#
pO2 (mmHg)	84,75 (+-24,3)	48,53 (+-30,47)
WBC (céls/ml)	0,29 (+- 0,24)	0,59 (+-0,43)
CD42a <sup>''</sup>	92,17	93,02 (+-1,84)
CD42b <sup>''</sup>	91,9	87,51 (+-1,58) <sup>''</sup> #
Agregação(%)	68,44 (+- 27,48)	20,39 (+-23,66)

\* Média (+- Desvio Padrão);

# p < 0,05 comparando Pós Descongelamento com Pré Congelamento via teste t pariado

<sup>''</sup> one sample t test

<sup>'''</sup># p<0,05 comparado com controle via one sample t test

Na agregação plaquetária, a alteração não foi significativa (figura 8, C); contudo, devido a média no pós descongelamento ser inferior ao desvio padrão, o teste estatístico não é confiável para o n estabelecido. Necessitaria-se, então, um número maior de amostras para um teste mais robusto.

A ligação plaquetária ao fator de Von Willebrand no endotélio requer o receptor GP-b-IX-V nas plaquetas [33]. Na análise de expressão dos marcadores CD42a e CD42b, glicoproteína IX e glicoproteína Ib respectivamente, somente o CD42b teve diminuição significativa pós descongelamento.

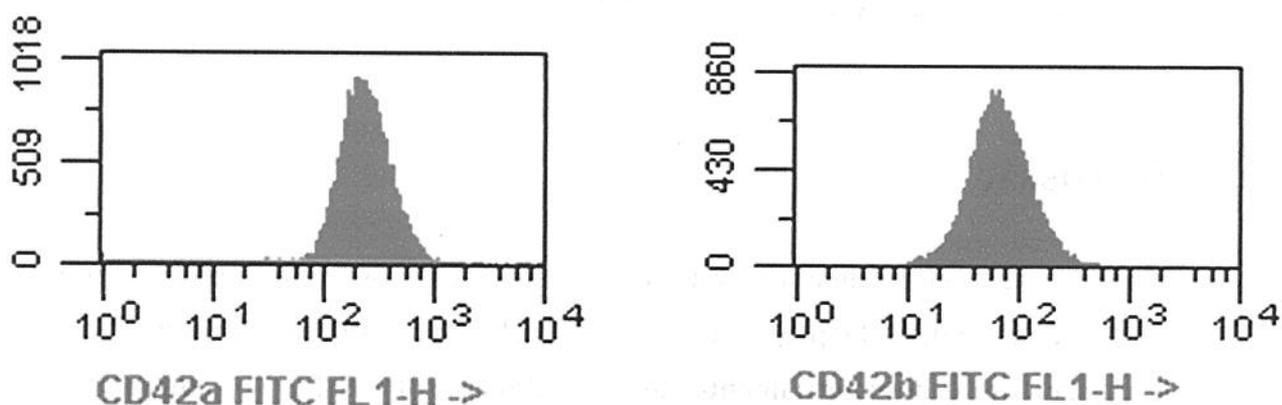


Figura 7: A expressão dos marcadores de ativação presentes na superfície plaquetária pode ser alterada pelo processo de congelamento. A figura demonstra a marcação, pós descongelamento, para glicoproteína IX(cd42a) e glicoproteína Ib(cd42b)

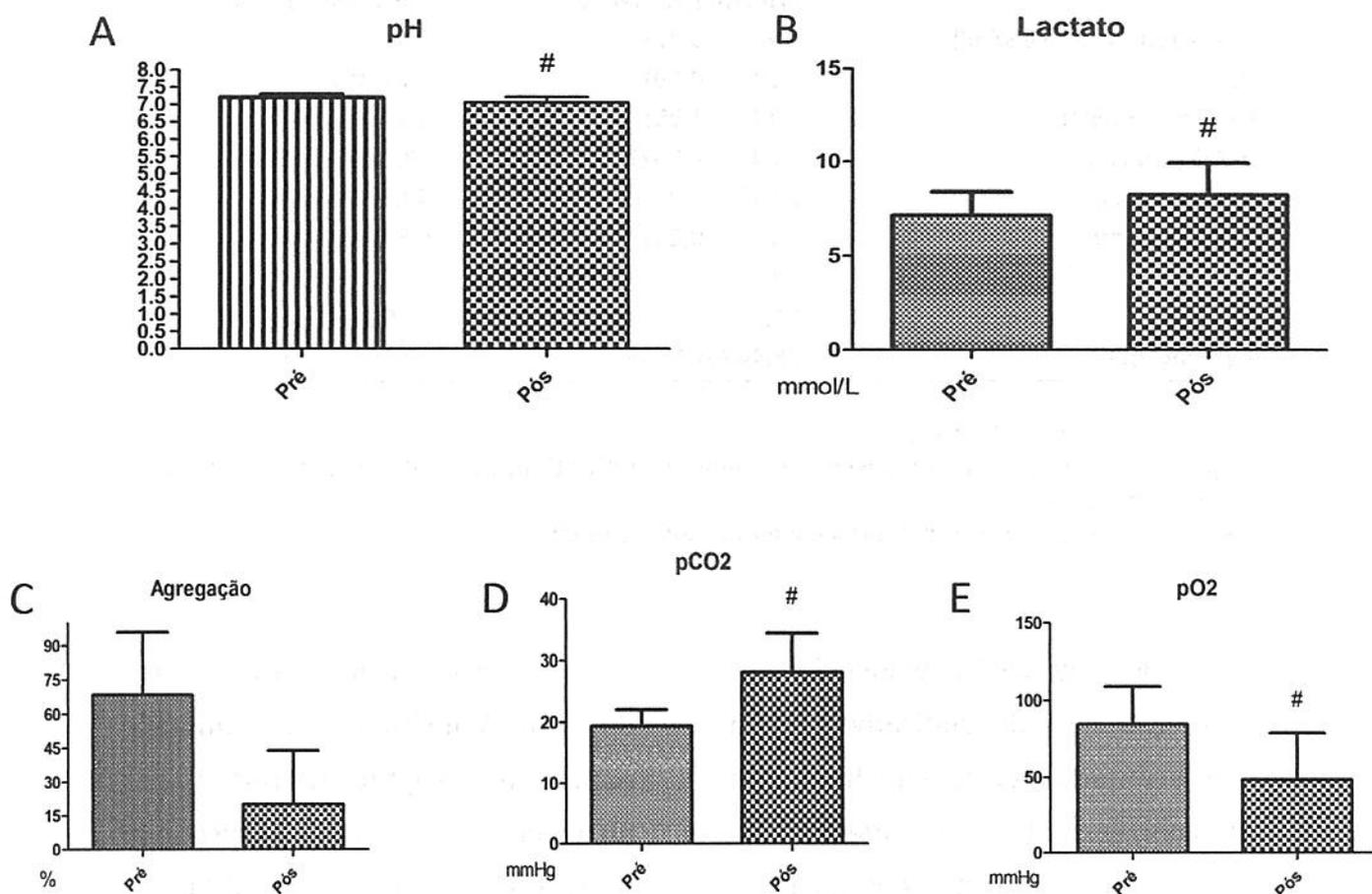


Figura 8: Análise da qualidade in vitro. O material foi aliquoteado e submetido à análise de gasometria total, pH e Lactato no mesmo equipamento; a análise Pré foi realizada imediatamente ao recebimento da amostra e Pós até uma hora após descongelamento (A, B, D, E). A agregação (C) foi realizada com colágeno, com bolsas entre 2 a 4 dias de estoque e uma semana congeladas.

Tabela 3 : Recuperação e DMSO\*

Recuperação (%)	85,76 (+- 8,39)
DMSO (ml)	6,69 (+-0,7)

\* Média (+- Desvio Padrão)

## Discussão

Nossos resultados demonstram a eficiência e análise de protocolo de congelamento e descongelamento de plaquetas concentradas em plasma

autólogo. Na literatura, muitos trabalhos utilizam aditivos, como Trombosol, SSP<sup>+</sup> e PAS (*platelets additive solutions*), para aumentar a

recuperação e preservar a célula. Visto termos o plasma na própria bolsa a ser criopreservada, não fez-se necessária a utilização de aditivos. Além disso, o objetivo final é implementar o protocolo na rotina do banco de sangue para diminuir o desperdício e consequentemente o custo, trabalhando com os elementos já existentes no hospital, pré requisito que uma solução crioprotetora não se enquadraria e ainda teríamos o viés do que a ANVISA permite ou não. Atualmente, o banco de sangue do HCPA obedece o manual de controle de qualidade da REDSANG, consistindo em contagem do número de plaquetas e leucócitos, pH e análise visual da bolsa. Dentro dos parâmetros já implementados os resultados apresentados enquadram-se perfeitamente.

Gao et al [40] demonstrou que o DMSO é o mais indicado para plaquetas dentre os possíveis criopreservantes, como HES, Dextran, Glicerol ou Etileno Glicol. O DMSO é um fator de toxicidade e pode causar reações adversas severas se não respeitada a concentração de 1mg/kg de paciente; no nosso protocolo o processo de centrifugação reduz drasticamente a concentração na

bolsa, permitindo aplicação em pacientes de diversas idades.

A importância de analisar o pH é por ele estar ligado a alteração da forma plaquetária de discoide para esférica. Já foi descrita alterações de morfologia plaquetária pós congelamento [48], mas esses resultados mostravam uma perda na contagem de plaquetas muito maior que o nosso protocolo, demonstrando que nosso trabalho, seja pelo protocolo em si ou por sais mais confiáveis nas soluções, pode ser considerado mais confiável para manter a morfologia. Além disso, Solberg et al., 1986 demonstrou que as mudanças morfológicas começam em torno de 6,7-6,8 e tornam-se irreversíveis em meio ácido com pH em níveis menores de 6,1, e ocorre o comprometimento da estrutura interna dos grânulos em pH básico, acima de 7,3. Desse modo, embora não tenhamos procedido com a análise morfológica nem com a análise da integridade dos grânulos internos, o pH estar dentro dos limites estabelecidos [30,32] e fora da margem estabelecida pelos resultados de Solberg, permite assegurar confiança na estrutura plaquetária dentro do nosso trabalho.

Van Der Meer [49] demonstrou existirem diferenças a partir de como é feita a calibração dos contadores automatizados para análise do pH com plaquetas estocadas, como o que nós utilizamos tanto no grupo pós como no pré congelamento. Esse viés de calibração não foi incluído no nosso trabalho; contudo, no estudo citado, o grupo de menor variação, provavelmente pela maior capacidade tamponante, foram as plaquetas mantidas em 100% do plasma, sem soluções preservantes como PAS, corroborando com o protocolo utilizado por nós, visto que tanto o nosso resultado como o encontrado pelo autor citado, estão dentro dos limites aceitáveis.

O lactato é um parâmetro muito usado para observar a qualidade das plaquetas, visto que elas ficam estocadas em uma bolsa com estoque limitado de glicose a partir do estado alimentado do doador e conseqüentemente pode variar um pouco de região para região. Nosso objetivo é demonstrar que no pós descongelamento, as plaquetas ainda estão tão viáveis quanto as estocadas dentro do período legal de 5 dias. Dentro deste panorama, Vassalo et al [50]

demonstrou que no 5º dia as plaquetas apresentam mais lactato do que nosso grupo pós congelamento e um aumento de 1,4 fmol/plaquetas/dia; Goodrich et al [51] chegou a resultados similares a partir desse dado, podemos concluir que as plaquetas descongeladas estão em um meio com melhores condições energéticas do que as armazenadas por 5 dias, corroborando com a eficiência do nosso protocolo e com a instauração dele no hospital. Contudo, pelos nossos dados, o congelamento ainda assim afeta de algum modo o consumo energético das plaquetas, talvez como uma consequência da produção de proteínas de defesa frente a queda da temperatura ou alguma toxicidade inicial induzida pelo DMSO. Conseqüentemente, caso utilizássemos plaquetas de 5 dias no estoque para o congelamento, estaríamos correndo o risco de aumentar muito além do aceitável o nível de lactato. Ainda devemos estabelecer esse ponto de corte para o tempo de estoque aceito para uma bolsa visando o congelamento, assim como pode ser feita a análise do consumo de glicose e produção de ATP para complementar o estudo.

Outro viés não controlado seria a contaminação com algum microorganismo produtor de lactato, mas considero improvável esse fato dado o experimento todo ter sido conduzido em ambiente estéril assim como a coleta, também não teria decorrido tempo para o microorganismo proliferar e produzir lactato significativamente em questão de horas ou armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$ , mas para as bolsas a serem transfundidas em pacientes, esse controle será feito.

A agregação, no nosso trabalho, não é um dado representativo pela variação do grupo, necessitando de um n mais representativo. Além do diferencial individual das amostras também foi percebida variação a partir do tempo de estoque, o que é completamente aceitável visto que o fabricante do colágeno sugere um máximo de 4 horas para a realização do teste. Assim esse fator permanece ainda para ser padronizado, caso seja considerado um parâmetro válido, pois a agregação não realizada normalmente pelos guias de controle de qualidade. Coêlho et al, 2011 [52] demonstrou a agregação no banco de sangue do Amazonas, demonstrou

uma queda acentuada da agregação envolvendo colágeno e ADP do 1° ao 5° dia, comprovando que a agregação plaquetária sofre influência já no tempo de estocagem e não seria um parâmetro válido para análise da integridade da função ou da célula plaquetária. Além disso, Jhonson et al, 2013 [53] demonstrou valores baixos de agregação pós congelamento, mesmo utilizando crioprotetores bem estabelecidos na literatura. Então, a agregação plaquetária ainda precisa de mais estudos e padronização para ser considerada um fator confiável no controle de qualidade.

A citometria de fluxo representa dados preliminares por ser comparada a somente um controle, enquanto o ideal dentro do trabalho seriam controles dentro do estoque no 1° e 5° dia. Contudo, com esses dados já podemos identificar que há uma grande preservação dos receptor plaquetário GP Ib-IX-V no grupo pós congelamento, demonstrando que as plaquetas estão integras para serem ativadas quando em contato com o fator de Von Willebrand no endotélio, cumprindo seu papel coagulatório e o objetivo desse trabalho. Contudo, esse receptor não tem sua expressão

alterada com a ativação plaquetária [54], então não sabemos se nem quanto das plaquetas já estão ativadas quando entrarem em contato com o paciente, assim, seria interessante complementar o trabalho com CD62p ou medir cálcio para análise da ativação prévia.

Complementar aos dados *in vitro*, muitas vezes a translação *in vitro* para *in vivo* tratando-se de plaquetas pode ser complicada por não termos como controlar os mesmos fatores *in vivo* com a mesma reprodutibilidade. Dentro desse quesito, Khuri et al, 1998 [55] testou plaquetas criopreservadas em cirurgia

## Conclusão

Esse trabalho apresenta dados concretos e preliminares. Somente os concretos o enquadram no controle de qualidade aplicado hoje. Contudo, há uma variedade de dados que podem complementá-lo, mesmo que os resultados preliminares estejam de acordo com a literatura do

de *"bypass"* cardiopulmonar comparada com plaquetas frescas. Ele observou que a perda sanguínea não cirúrgica, não decorrente das incisões necessárias ao procedimento, e sim pelos defeitos de coagulação aumentados e característicos no caso de *"bypass"*, foram significativamente menores com as plaquetas criopreservadas. Então, a literatura comprova a eficiência das plaquetas congeladas dentro de sua proposta coagulatória e nossos estão em concordância com isso, mesmo que alguns parâmetros possam ainda ser investigados mais a fundo e nosso *n* expandido

desenvolvedor do protocolo utilizado por nós [43]. Então, podemos afirmar o sucesso da proposta inicial da aplicação do protocolo, somente são requeridos alguns experimentos a mais para podermos embasar com certeza científica sua instauração no Hospital de Clinicas de Porto Alegre

## Agradecimentos

Agradeço à paciência e ensinamentos da equipe do BSCUP e do setor de aférese do banco de sangue do HCPA, assim como ao meu orientador, Prof Tor Gunnar.

## Referências:

1. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *SeminThromb Hemost* 1995;21:130-136
2. Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, et al. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib(GPIb): an alternative/backup mechanism to vonWillebrand factor. *FASEB J* 2003;17:1490-1492
3. Bibbo C, Hatfield PS. Platelet-rich plasma concentrate to augment bone fusion. *Foot Ankle Clin* 2010;15:641-649.
4. Jungbluth P, Wild M, Grassmann JP, et al. Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs. *J Orthop Res* 2010;28:1448-1455.
5. Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GA, Orchard J. Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clin J Sport Med* 2011;21:37-45
6. Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res* 2008;26:404-410.
7. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB (2009) In vitro effects of Choukroun's PRF on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108(3):341-352
8. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med*

- Oral Pathol Oral Radiol Endod  
101:e37-e44
9. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusion. *N Engl J Med* 1997; 337:1861-9.
  10. Lim J, Kim Y, Han K, Kim M, Lee KY, Kim WI, et al. Flow cytometric monocyte phagocytic assay for predicting platelet transfusion outcome. *Transfusion* 2002;42:309-16.
  11. Andrey A, Anwar J. Modelating the Structures and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimetil Sulfoxide. *Phys. Chem. B*, 2007, 111 (35), pp 10453-10460
  12. Ross, H.M.; Pawlina, W. *Histologia Texto e Atlas: Em correlação com biologia molecular e celular*. 5ªed. Editora Guanabara Koogan, 2008
  13. Johnson LN, Winter KM, Reid S, Hartkopf-Theis T, Marks DC. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. *Cryobiology*. 2011 62(2):100-6
  14. Sigma. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide. Produto número: M5655
  15. Swenson O and Lloyd Claff C. Changes in the hydrogen ion concentration of healing fractures. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946;61:151-154.
  16. Hollinger J, Wong MEK. The integrated process of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:594-606
  17. Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Rep Reg* 2002;10:336-340
  18. Hashizume T, Sato T. Influence of cytoplasmic pH on the aggregation and Ca<sup>2+</sup> mobilization in rabbit platelets. *BiolPharm Bull* 1999;22:663-6.
  19. Kaadan N A, Angrini M. *Blood Transfusion in History*, Aleppo University, Syria.
  20. Steinhubl, S. R. (2011). "Historical observations on the discovery of platelets, platelet function testing and the first antiplatelet agent." *Curr Drug Targets* 12(12): 1792-1804

21. Baldini, M., N. Costea, et al. (1960). "The viability of stored human platelets." *Blood* 16: 1669-1692.
22. Novel Treatment Modalities: New Platelet preparations and substitutes. *British Journal of Haematology*, 2001, 114, 496±505
23. Kickler T S. Platelet biology – an overview. *Journal Compilation* © 2006 LMS Group *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* doi: 10.1111/j.1778-428X.2006.00013.x
24. Angiolillo J D, Ueno M, Goto S. Basic Principles of Platelet Biology and Clinical Implications. *Circulation Journal* Vol.74, April 2010.
25. Jurk, K., and B. E. Kehrel. "Platelets: Physiology and Biochemistry." [In eng]. *Semin Thromb Hemost* 31, no. 4 (2005): 381-92.
26. Lee, D. H., and M. A. Blajchman. "Novel Treatment Modalities: New Platelet Preparations and Substitutes." *Br J Haematol* 114, no. 3 (2001): 496-505.
27. Ren, Q., S. Ye, and S. W. Whiteheart. "The Platelet Release Reaction: Just When You Thought Platelet Secretion Was Simple." *Curr Opin Hematol* 15, no. 5 (2008): 537-41.
28. Rendu, F., and B. Brohard-Bohn. "The Platelet Release Reaction: Granules' Constituents, Secretion and Functions." [In eng]. *Platelets* 12, no. 5 (Aug 2001): 261-73.
29. Principles of Blood Separation and Apheresis Instrumentation. Dobri Kiprov, M.D., H.P. Medical Center, San Francisco, CA
30. Guidelines for the Administration of Platelets. New York State Council on Human Blood and Transfusion Services. 6<sup>o</sup>ed, 2006
31. Hoshi, R., S. Murata, R. Matsuo, A. Myronovych, I. Hashimoto, H. Ikeda, and N. Ohkohchi. "Freeze-Dried Platelets Promote Hepatocyte Proliferation in Mice." [In eng]. *Cryobiology* 55, no. 3 (Dec 2007): 255-60
32. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the UK, The Stationery Office, 2005
33. Berndt MC, Ward CM, Booth WJ, Castaldi PA, Mazurov AV, Andrews RK: Identification of Asp-514 to Glu-542 as a glycoprotein Ib-IX complex receptor recognition sequence in von Willebrand Factor. Mechanisms of modulation of vonWillebrand Factor by ristocetin and botrocetin. *Biochemistry* 31:11144, 1992
34. Kicler T. S; Platelet biology – an overview. *Transfus Altern*

- Transfus Med.2008; doi:  
10.1111/j.1778-  
428X.2006.00013.x
35. Slichter, S. J. "Evidence-Based Platelet Transfusion Guidelines." [In eng]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program (2007): 172-8.
  36. Cid, J., X. Ortin, E. Elies, D. Castella, M. Panades, and C. Martin-Vega. "Absence of Anti-D Alloimmunization in Hematologic Patients after D-Incompatible Platelet Transfusions." [In eng]. Transfusion 42, no. 2 (Feb 2002): 173-6.
  37. Rebullá, P. "A Mini-Review on Platelet Refractoriness." Haematologica 90, no. 2 (2005): 247-53.
  38. Day, J.D.; Stacey, G.N. Methods in Molecular Biology:Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2ed.Human Press,2007.368 pág.
  39. Taylor, M. A. "Cryopreservation of Platelets: An in-Vitro Comparison of Four Methods." J Clin Pathol 34, no. 1 (1981): 71-5.
  40. Gao, D. Y., K. Neff, H. Y. Xiao, H. Matsubayashi, X. D. Cui, P. Bonderman, D. Bonderman, et al. "Development of Optimal Techniques for Cryopreservation of Human Platelets. I. Platelet Activation During Cold Storage (at 22 and 8 Degrees C) and Cryopreservation." [In eng]. Cryobiology 38, no. 3 (May 1999): 225-35.
  41. Gaylord Chemical Company: Technical Bulletin Reaction Solvent Dimethyl Sulfoxide(DMSO).Cas registry number:67-68-5
  42. Lelkens, C. C., J. G. Koning, B. de Kort, I. B. Floot, and F. Noorman. "Experiences with Frozen Blood Products in the Netherlands Military." Transfus Apher Sci 34, no. 3 (2006): 289-98
  43. Valeri, C. R., G. Ragno, and S. Khuri. "Freezing Human Platelets with 6 Percent Dimethyl Sulfoxide with Removal of the Supernatant Solution before Freezing and Storage at -80 Degrees C without Postthaw Processing." Transfusion 45, no. 12 (2005): 1890-8.
  44. Tang, M., W. F. Wolkers, J. H. Crowe, and F. Tablin. "Freeze-Dried Rehydrated Human Blood Platelets Regulate Intracellular Ph." Transfusion 46, no. 6 (2006): 1029-37.
  45. Devine, D. V., and K. Serrano. "The Platelet Storage Lesion." Clin Lab Med 30, no. 2 (2010): 475-87.
  46. Dekkers, D. W., I. M. De Cuyper, P. F. van der Meer, A. J. Verhoeven, and D. de Korte. "Influence of Ph

- on Stored Human Platelets." *Transfusion* 47, no. 10 (2007): 1889-95
47. Goodrich, R. P., J. Li, H. Pieters, R. Crookes, J. Roodt, and P. Heyns Adu. "Correlation of in Vitro Platelet Quality Measurements with in Vivo Platelet Viability in Human Subjects." *Vox Sang* 90, no. 4 (2006): 279-85.
  48. Baythoon, H., E. G. Tuddenham, and R. A. Hutton. "Morphological and Functional Disturbances of Platelets Induced by Cryopreservation." *J Clin Pathol* 35, no. 8 (1982): 870-4.
  49. van der Meer, P. F., A. P. van Zanten, R. N. Pietersz, and H. W. Reesink. "Variation of Ph-Measurement in Platelet Concentrates." *Transfus Med* 11, no. 1 (2001): 49-54
  50. Vassallo, R. R., J. W. Adamson, J. L. Gottschall, E. L. Snyder, W. Lee, J. Houghton, and M. D. Elfath. "In Vitro and in Vivo Evaluation of Apheresis Platelets Stored for 5 Days in 65% Platelet Additive Solution/35% Plasma." *Transfusion* 50, no. 11 (2010): 2376-85.
  51. Goodrich, R. P., J. Li, H. Pieters, R. Crookes, J. Roodt, and P. Heyns Adu. "Correlation of in Vitro Platelet Quality Measurements with in Vivo Platelet Viability in Human Subjects." *Vox Sang* 90, no. 4 (2006): 279-85
  52. Coelho, M. J., C. Monteiro Tde, F. G. Vasquez, K. L. Silva, K. S. Dos Santos, V. M. de Oliveira, and O. Cavalcante Fde. "Platelet Aggregation and Quality Control of Platelet Concentrates Produced in the Amazon Blood Bank." *Rev Bras Hematol Hemoter* 33, no. 2 (2011): 110-4
  53. Johnson, L., S. Reid, S. Tan, D. Vidovic, and D. C. Marks. "Pas-G Supports Platelet Reconstitution after Cryopreservation in the Absence of Plasma." *Transfusion* 24, no. 10 (2013): 12084
  54. Landi, E. P. Junior M., José F. C.. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. 2003, vol.25, n.1, pp. 39-46. ISSN 1516-8484.
  55. Khuri, S. F., N. Healey, H. MacGregor, M. R. Barnard, I. O. Szymanski, V. Birjiniuk, A. D. Michelson, D. R. Gagnon, and C. R. Valeri. "Comparison of the Effects of Transfusions of Cryopreserved and Liquid-Preserved Platelets on Hemostasis and Blood Loss after Cardiopulmonary Bypass." [In eng]. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117, no. 1 (Jan 1999): 172-83; discussion 83-4

56. Lazarus HM, Kaniecki-Green EA, Wam SE, Aikawa M, Herzig RH. "Therapeutic effectiveness of

frozen platelet concentrates for transfusion". Blood. Vol. 57, No. 2 (February). 1981